

La obtención de variedades: desde la mejora clásica hasta la mejora genética molecular

Editores: Rafel Socías i Company
María J. Rubio-Cabetas
Ana Garcés-Claver
Cristina Mallor
José M^a Álvarez



La obtención de variedades: desde la mejora clásica hasta la mejora genética molecular

Editores: Rafel Socias i Company
María J. Rubio-Cabetas
Ana Garcés-Claver
Cristina Mallor
José M^a Álvarez

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)
Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SECH)
Sociedad Española de Genética (SEG)

Agradecimientos

Los editores agradecen el esfuerzo y la dedicación de los autores así como la financiación parcial de esta publicación por parte de INVEGEN.

© textos: autores

Edita: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

Imprime: INO Reproducciones, S.A.

ISBN: 978-84-8380-320-2

D.L.: Z-1260-2014

Prólogo

El objetivo de todo programa de mejora es la obtención de nuevas variedades con el fin de resolver los problemas de las actuales variedades, ya sea en el aspecto agronómico de su cultivo, de su adaptación a diferentes condiciones climáticas o edafológicas, en la calidad del producto o en sus posibilidades de almacenaje y transformación. En las anteriores publicaciones promovidas desde las Secciones de Mejora Genética Vegetal de la Sociedad Española de Genética y de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas no se habían abordado aspectos relacionados directamente con la obtención de variedades y los problemas y soluciones que presentan las nuevas herramientas biotecnológicas en la mejora vegetal, así como el proceso de registro de las nuevas variedades.

Desde los años 70 asistimos a una revolución verde para la producción de variedades más productivas, pero en la última década se ha producido un cambio en los objetivos de los programas de mejora, ya que se ha hecho más hincapié en la calidad. De nuevo los retos de la sociedad del siglo XXI están en la producción de más alimentos para la creciente población mundial enfrentándose a los retos de producir alimentos en la misma cantidad de tierra arable, con variedades adaptadas al cambio climático y con un coste de agua, fertilizantes y mano de obra más eficientes.

Para ello la producción de nuevas variedades debe adaptarse a estos nuevos retos haciendo uso de las herramientas biotecnológicas disponibles. Norman Borlaug, Premio Nobel de la Paz, habla de la necesidad de una 'Revolución Azul' en el siglo XXI, que complemente la 'Revolución Verde' del siglo XX:

*"Humankind in the 21st century will need to bring about a 'Blue Revolution' to complement the so-called Green Revolution of the 20th century. In the new Blue Revolution, water-use productivity must be wedded to land-use productivity. **New science and technology must lead the way**".*

Por ello este libro tiene por objeto dar una visión general de la obtención de nuevas variedades en el proceso de mejora, desde el planteamiento del programa hasta el registro de la nueva variedad, pasando por la aplicación de la biotecnología a disposición del mejorador en la consecución de este objetivo, así como de los condicionantes que se presentan en este camino. Esperamos haber conseguido estos objetivos.

El Comité Editorial

Índice

1. Las bases de la mejora: la detección del problema y estrategia a aplicar Rafel Socias i Company, Amando Ordás y M ^a Luisa Gómez Guillamón	9
2. Las variedades tradicionales en el panorama actual de la mejora y la producción sostenible Cristina Mallor, Ernesto Igartua y Pilar Errea	35
3. Las variedades transgénicas..... José Ignacio Cubero	63
4. Aplicación de la biotecnología en los programas actuales de mejora M ^a José Rubio-Cabetas, Belén Picó, Ana Casas y M ^a Luisa Badenes	97
5. Las patentes de genes: ejemplo de su utilización en la mejora ge- nética vegetal Teresa Capell y Paul Christou	139
6. La identificación para el registro de variedades: examen técnico y descriptores morfológicos y moleculares José M. Alonso, David Calvache, Jesús Mérida, Luis Salaíces y Ángel Fernández i Martí	159
7. Los centros públicos y las empresas privadas en la obtención de nuevas variedades José M ^a Fontán del Junco, Marisol Arnedo Andrés, Juan Negueroles y Andrés Stewart	187
8. Registros de variedades y protección de obtenciones vegetales en la Unión Europea José M ^a Elena	221

1 Las bases de la mejora: la detección del problema y estrategia a aplicar

Rafel Socias i Company¹, Amando Ordás² y M^a Luisa Gómez Guillamón³

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

² Misión Biológica de Galicia, CSIC

³ Estación Experimental de la Mayora, CSIC

1.1 Antecedentes

1.2. Detección del problema y elección de parentales

1.3. Objetivos de mejora

1.3.1. Cultivos extensivos

1.3.1.1. Rendimiento

1.3.1.2. Adaptación

1.3.1.3. Resistencia a estreses (abióticos y bióticos)

1.3.1.4. Calidad y valor añadido

1.3.2. Especies horticolas

1.3.2.1. Resistencias

1.3.2.2. Calidad

1.3.2.3. Otros caracteres

1.3.3. Frutales

1.3.3.1. Cultivares

1.3.3.2. Patrones

1.4. Proceso de selección

1.4.1. Cultivos extensivos.

1.4.1.1. Especies autógamas

1.4.1.2. Especies alógamas

1.4.1.3. Selección genómica

1.4.2. Especies horticolas

1.4.3. Frutales

1.5. Referencias

1.1. Antecedentes

La mejora genética se ha venido practicando continuamente desde que el hombre primitivo dejó de lado la recolección nómada de los productos vegetales para su alimentación y se estableció en sitios fijos para empezar a cultivar sus alimentos. Nuestros antepasados seleccionaron prácticamente todas las especies vegetales actualmente en cultivo y las propagaron. La domesticación de las plantas ha sido un importante logro para la humanidad y las plantas agrícolas pueden representar una de las mejores herencias del pasado. Ésta es la conducta seguida de modo general, aunque no universal, por las civilizaciones primitivas.

La mejora primitiva fue realizada de manera empírica, con la simple selección de las mejores plantas observadas, que eran fruto del azar, pasando posteriormente a la selección entre las descendencias de las mismas, con la esperanza de obtener otras aún mejores, aunque sin el conocimiento de la utilidad de los cruzamientos entre parentales. El conocimiento de las leyes de Mendel en el siglo XX hizo que la mejora genética tuviera unas bases científicas que superaran el empirismo de la etapa anterior. Todo ello ha llevado a un avance continuo en la mejora genética que, en algunas especies, ha conllevado una renovación casi completa de su cultivo. Así mismo, la intensificación de los cultivos, una especial atención a su rentabilidad y mayores conocimientos científicos han impulsado la resolución de los problemas de tipo técnico que tiene planteados la producción agraria. Muchos de estos problemas tienen una base biológica y los cultivares actuales no reúnen todas las características ideales para superarlos. La mejora genética va encaminada a obtener nuevos cultivares que faciliten la resolución de estos problemas.

1.2. Detección del problema y elección de parentales

Todo programa de mejora genética debe partir del conocimiento de los problemas que presenta el cultivo a mejorar. Por todo ello, el contacto con el sector es básico para conocer estos problemas y detectar las necesidades de cada especie antes de diseñar un programa de mejora. Al mismo tiempo se deben tener en cuenta los estudios previos que pueda haber sobre el problema que se intenta resolver, porque a veces por un defecto de información no se conocen algunas soluciones, incluso de tipo parcial, que se hayan propuesto en el pasado. Cualquiera que sea el objetivo de la mejora, hay que partir de la evaluación de una amplia colección de material vegetal, que se debe conocer profundamente. Se trata de la estrategia más importante, ya que la ausencia de suficiente variabilidad para un carácter constituye la principal limitación para la mejora del mismo. Una vez explorada la variabilidad natural existente en la especie cultivada, y si ésta no es de utilidad, se puede acudir a evaluar la variabilidad en especies silvestres relacionadas, si no existen barreras de incompatibilidad con la cultivada; si tampoco ésta es utilizable habría que generar variabilidad utilizando para ello métodos clásicos y biotecnológicos, solos o combinados, como los cruzamientos, las mutagénesis y el cultivo de tejidos.

Entre estos tres conceptos, los problemas a resolver, los estudios previos y el material vegetal, existe una interacción que no se puede obviar a la hora de buscar la solución más adecuada para el problema existente (Figura 1.1). Con esta base se puede proceder a la elección de parentales para iniciar el programa de cruzamientos en el caso de la mejora clásica o a la elección de los donantes de los genes de interés cuando se pueda proceder a su transferencia.

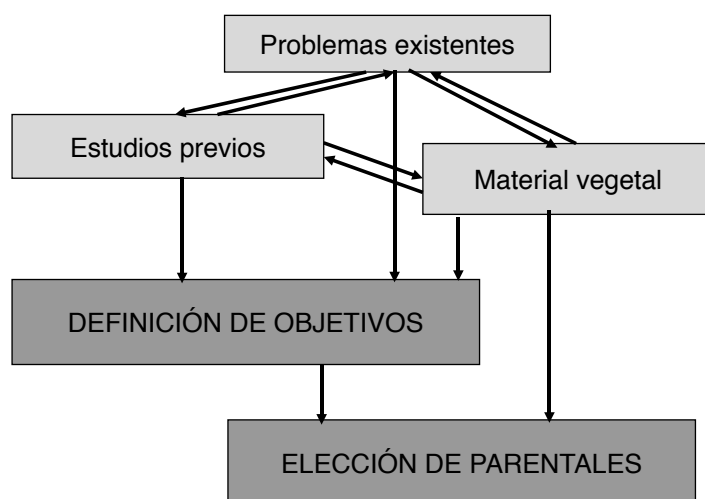


Figura 1.1.—Esquema para la definición de objetivos y elección de parentales en un programa de mejora genética.

1.3. Objetivos de mejora

1.3.1. Cultivos extensivos

La elección de unos objetivos apropiados es fundamental para desarrollar variedades que sean superiores a las habituales en uso y que estén bien adaptadas a la zona a la que se destinan. La correcta elección de objetivos debe basarse en un cuidadoso estudio de las características que se necesita mejorar junto con una valoración precisa de los beneficios que el agricultor obtendrá al cultivar la nueva variedad.

La mejora de unas características determinadas puede afectar al comportamiento de la planta de diversas formas. Por ejemplo, en el caso del maíz la resistencia al taladro disminuirá la cantidad de encamado, reducirá el número de mazorcas caídas y retardará la entrada de patógenos en el tallo, todo lo cual afecta finalmente al rendimiento.

El mejorador debe conocer perfectamente las condiciones de su zona (por ejemplo las condiciones ambientales que limitan el rendimiento o las enfermedades o plagas más importantes) y concentrarse en las mejoras que sean más beneficiosas para reducir las pérdidas de rendimiento.

De un modo general podemos clasificar los objetivos de mejora de las plantas de gran cultivo en cuatro grandes apartados:

1. Rendimiento
2. Adaptación
3. Resistencia a estreses (abióticos y bióticos)
4. Calidad y valor añadido

En muchos casos estos objetivos coincidirán con los buscados por los mejoradores de especies hortícolas. La principal diferencia radica que en las plantas hortícolas podemos decir, de modo general, que prima la calidad sobre la cantidad, en tanto que en los cultivos extensivos es al revés.

1.3.1.1 Rendimiento

El rendimiento es un término muy general usado por los agricultores para designar la parte de la planta que les interesa y que cosechan cuando el producto deseado está listo para utilizar o almacenar. El producto de interés puede ser la semilla (trigo, soja, lenteja...), la planta verde (alfalfa, por ejemplo), la fibra (algodón), las hojas (tabaco, té), tubérculos (patata), etc.

El rendimiento de los principales cultivos ha crecido de modo espectacular gracias a los esfuerzos de los mejoradores, fueran éstos los primitivos agricultores o los profesionales de la mejora que basan su trabajo en la aplicación de la genética a la selección. Tomando como ejemplo el maíz, Russell (1984) comparó el comportamiento de diversos cultivares que representaban las distintas épocas de la mejora en Iowa desde 1922 a 1980, variedades de polinización libre al principio e híbridos simples desde 1930, concluyendo que el 78,8% (4,21 t/ha) de la ganancia total (5,34 t/ha) en rendimiento experimentada por los agricultores de Iowa de 1922 a 1980 era genética. Troyer (2004) señala que desde el advenimiento del maíz híbrido la producción total de maíz de EEUU se incrementó en 176 millones de toneladas mientras que la superficie dedicada al cultivo se redujo, en cambio, en un 20% debido a que los rendimientos aumentaron 6.271 kg/ha.

El rendimiento es probablemente el objetivo más complejo con que tiene que trabajar el mejorador. Está determinado por la expresión e interacción de numerosos genes que afectan a prácticamente todos los procesos vitales de la planta, tales como la nutrición, fotosíntesis, transpiración, translocación, etc. También se ve afectado directa o indirectamente por los genes que controlan la maduración y la resistencia al encamado, plagas y enfermedades. Desde la generalización del uso de marcadores moleculares en la mejora genética, se han identificado numerosos QTL para diversos caracteres. Es posible que con el abaratamiento de técnicas como

la de los SNIP se pueda, en un futuro más o menos lejano, llegar a tener un mapa con la localización de los genes que controlan el rendimiento.

1.3.1.2. Adaptación

La adaptación, como el rendimiento, es una característica muy compleja dado que engloba muchas y diferentes respuestas de la planta. Algunos de los factores más importantes que afectan la adaptación de un genotipo a un área determinada son:

- Vigor temprano, tanto en la emergencia (Egli, 2012) como en la fase del primer crecimiento
- Maduración suficiente que permita al cultivo encajar adecuadamente en el área de producción
- Respuesta a los niveles de fertilizantes en el suelo
- Resistencia al calor y a la sequía
- Resistencia al frío, carácter de gran importancia en muchas especies para favorecer siembras tempranas (Rodríguez et al., 2010) y así escapar indirectamente a la acción de diversos estreses

1.3.1.3. Resistencia a estreses (abióticos y bióticos)

Entre los primeros los más importantes o comunes son la sequía, el encharcamiento, el frío, el calor, la salinidad y la toxicidad debida a metales. En cuanto a los bióticos, es decir plagas y enfermedades, cada cultivo está afectado por una gran cantidad de ellos. En este apartado suelen jugar un papel importante las variedades antiguas (conservadas en los bancos de germoplasma), en las que se encuentran genes de resistencia o tolerancia a las principales plagas y enfermedades de la zona.

1.3.1.4. Calidad y valor añadido

El concepto de calidad varía notablemente en función del cultivo y del consumidor. Una característica de gran importancia en los cultivos alimenticios es la calidad de la proteína. Desgraciadamente, los principales cultivos que se usan para alimentar a la humanidad sufren de deficiencia de algún aminoácido esencial (Cuadro 1), lo que disminuye su valor como alimento, especialmente en las comunidades que se basan en el monocultivo. Sin embargo, la mejora puede jugar un gran papel en la corrección de esas deficiencias. Un ejemplo muy conocido es el del maíz *opaco* que se expone a continuación.

La composición de la proteína del endospermo del maíz normal muestra que la mayor parte es zeína (un 60%), una fracción pobre en lisina y triptófano (Vasal, 2001). Ello invalida al maíz como posible único aporte proteico para animales monogástricos y puede provocar problemas de malnutrición en las comunidades humanas que tienen el maíz como principal alimento.

Cuadro 1.1.—Aminoácidos esenciales que se encuentran en baja proporción en algunos cultivos importantes (adaptado de Acquah, 2007, Tabla 22.1).

Cultivo	Aminoácido deficiente
Maíz	Triptófano Lisina
Trigo	Lisina
Centeno	Triptófano Lisina
Arroz blanco	Lisina Treonina
Soja	Metionina Cisteína Valina
Cacahuete	Lisina Metionina Cisteína Treonina
Judía común	Triptófano
Patata	Metionina Cisteína

Tras el conocido descubrimiento por el equipo del Prof. Mertz de la Universidad de Purdue de que el gen *o2* (*opaco-2*) eleva considerablemente la proporción de lisina y triptófano, numerosos programas en todo el mundo se dedicaron a trabajar con este mutante. Sin embargo, los problemas surgidos con los maíces opacos han hecho que muchos de ellos fueran abandonados. Los principales obstáculos encontrados fueron:

- Una reducción del rendimiento, en comparación con el maíz normal, que se puede cifrar en un 10-15%
- Aspecto inaceptable del grano
- Gran susceptibilidad a las podredumbres de mazorca y, durante el almacenamiento, a los ataques de insectos
- Secado lento del grano después de la maduración fisiológica

A fin de resolver estos problemas el CIMMYT emprendió un extenso programa de mejora involucrando mejoradores, patólogos, entomólogos, fisiólogos y bioquímicos, con énfasis, primordialmente, en el desarrollo de variedades con proteína

de alta calidad y buenas características del endospermo, a las que denominaron QPM (Vivek et al., 2008).

1.3.2. Especies hortícolas

Las hortícolas clásicas llevan muchos años de cultivo especializado. Aunque la primera hibridación consciente se realizó sobre el año 1717 entre un clavel silvestre y otro cultivado, el cruzamiento como técnica en mejora se generalizó en la obtención de hortícolas a finales del siglo XVIII. A lo largo de este siglo y del XIX se intensificó la introducción y aclimatación de especies exóticas, la selección de nuevas variedades, y la investigación sobre nuevos métodos de selección (Cubero, 2003). Prácticamente hoy día no existen hortícolas introducidas recientemente en cultivo. Lo que sí se ha producido es la expansión del cultivo de ciertas hortícolas a países diferentes a aquellos en los que su consumo ha sido tradicional como consecuencia de la dispersión de ciertas comunidades desde sus países de origen a los de trabajo y al asentamiento y crecimiento de dichas comunidades. Un ejemplo de ello son las hortalizas orientales, en su mayoría Brassicas, que se cultivan prácticamente en todo el mundo. Esta expansión ha requerido la adaptación de ciertas especies a condiciones ambientales diferentes de las de su lugar de origen.

La principal técnica de mejora para la obtención de nuevas variedades o híbridos la constituyen los cruzamientos dirigidos. Haciendo uso de las técnicas tradicionales de la mejora se ha desarrollado en prácticamente todas las especies una variedad enorme de tipos, formas, colores y de adaptaciones a diferentes épocas del año y formas de cultivo. Así existen cebollas blancas, amarillas, rojas, para manojos, dulces, para días cortos, intermedios o largos; lechugas romanas, mantecosas, crujientes, hoja de roble, hojas de mulo, en cogollos, de hojas verdes o rojas, para cultivo al aire libre o invernadero; tomates de diversos calibres, tipo pera, tipo cereza, en ramillete, de porte determinado, semideterminado o indeterminado, para cultivo entutorado o rastrero. De algunas especies se han desarrollado además variedades para su utilización como portainjertos (sandía, melón, pepino y calabaza) o para su uso industrial (tomate, pimiento...) (Marín, 2011).

Los objetivos en la mejora genética de hortícolas hoy día van dirigidos fundamentalmente y en general a mantener en lo posible los techos de producción ya alcanzados mediante la introducción de resistencias a enfermedades y plagas, así como la adaptación del cultivo a nuevas técnicas culturales y condiciones ambientales adversas; pero especialmente, cada día es más importante la mejora de la calidad, no sólo en sus características organolépticas sino en el contenido de elementos minerales y vitaminas que contribuyan a mejorar la dieta. No obstante, en algunas especies se invierten todavía muchos recursos en aumentar la diversidad de la oferta al consumidor.

1.3.2.1. Resistencias

Dependiendo de la especie hortícola de que se trate, los trabajos de mejora para la introducción de resistencia irán enfocados a un patógeno u otro. Así en lechuga la gran mayoría de las variedades que están en el mercado llevan resistencia a *Bremia lactucae*, hongo del que se han descrito más de 20 razas fisiológicas diferentes; en judía la mayor parte de las variedades llevan resistencia, aunque no total, al virus del Mosaico Común de la Judía (BCMV). Para un buen número de hortalizas el factor limitante hoy día son las plagas, por los daños directos que causan y en especial porque la mayoría de los insectos que las constituyen actúan como vectores de virus causantes de importantes pérdidas. Ejemplos de ello son el virus de la cuchara, Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV), en tomate o el Cucurbit Yellows Stunting Disorder Virus (CYSDV) y otros amarilleos en cucurbitáceas, transmitidos por *Bemisia tabaci*, el virus del bronceado, Tomato Spotted Wilt virus (TSWV) en pimiento y tomate, transmitido por *Frankliniella occidentalis*, el virus del mosaico del pepino, Cucumis Mosaic Virus (CMV) en varias hortalizas transmitido por varias especies de áfidos. Para la mayor parte de las plagas y gran parte de los virus que transmiten no existen aún en el mercado variedades/híbridos comerciales con resistencia o tolerancia incorporada. La no disponibilidad de fuentes de resistencia/tolerancia adecuadas es una de las razones, bien porque sean resistencias cuya genética es de difícil manejo o bien porque se encuentran en especies alejadas de la cultivada y las barreras de incompatibilidad existentes impiden su uso de forma tradicional. Además, de algunos patógenos se han descrito varios aislados, razas fisiológicas, o clones capaces de sobrepasar las resistencias existentes. En algunos casos la resistencia que se maneja es solamente parcial, por lo que la localización de nuevas fuentes de resistencia y los trabajos de introducción de la misma son continuos además de laboriosos. La resistencia a enfermedades y plagas es pues un objetivo claro y necesario para mantener la producción de un cultivo; como valor adicional, el cultivo comercial de estas variedades resistentes reduce sensiblemente los tratamientos fitosanitarios, además de abaratar los costes de producción, favorece la seguridad alimentaria de los productos y constituye una estrategia de lucha respetuosa con el ambiente.

1.3.2.2. Calidad

La calidad es otro de los objetivos prioritarios ya que el aumento de la calidad llevará consigo una mejora en el precio y una estabilidad del producto en el mercado. Se trata de un concepto muy amplio que incluye características externas e internas de un producto, unas que se aprecian en el expositor de una tienda y otras que sólo aparecen al consumirlo. En hortalizas hay que considerar que hay especies que se consumen por sus frutos, hojas, tallos, flores, o raíces. Por ello los órganos de la planta y los objetivos relacionados con la mejora de su calidad son muy diversos. En cuanto a las características externas, y como se ha dicho anteriormente, hoy día podemos acceder a una extensa variedad de la mayoría de los

productos hortícolas. Para muchas de las especies hortícolas no parece que se pueda avanzar mucho en la mejora de las características externas si bien hay que tener en cuenta la enorme capacidad que tiene el hombre para idear la presentación y apariencia de un determinado producto. De cara al futuro, la calidad en su aspecto nutritivo es uno de los objetivos más importantes en la mejora de hortícolas. En el siglo pasado, con el desarrollo de la fisiología y la nutrición humanas se han determinado las necesidades alimenticias del hombre; al mismo tiempo el conocimiento de la fisiología y la genética de las plantas ha proporcionado las herramientas necesarias para modificar la composición y concentración de los elementos nutritivos presentes en las distintas especies. Con ello, se han sentado las bases para producir hortícolas que satisfagan la creciente demanda de alimentos adaptados a las necesidades nutritivas de la población. Existe una demanda social por alimentos que aporten mayor contenido en elementos nutritivos, demanda que ha sido recogida por los productores de semillas de hortícolas y agricultores. Dependiendo de la especie hortícola de que se trate el aporte de minerales, vitaminas y otras sustancias como fibras, a la dieta humana varía. El tomate, por ejemplo, aporta hasta un 21% de las cantidades diarias recomendadas por la Unión Europea en vitamina C, alrededor de un 7% en licopeno, provitamina A y folatos (vitamina B9) y un 5% en potasio y manganeso. Sin embargo, aun dentro de ofrecer calidad nutritiva o visual es cada vez más importante que el mejorador de hortícolas no pierda de vista caracteres como el sabor y la palatabilidad de ciertos productos. El tomate Raf es uno de los ejemplos en los que cuando se ha primado la apariencia y otras características externas como el tamaño, la vida poscosecha y la producción frente a sabor, su atractivo comercial ha disminuido (Escobar et al., 2012).

1.3.2.3. Otros caracteres

Otro de los objetivos es la adaptación de algunas variedades para su cultivo forzado bajo túnel o bajo invernadero. Dada la precocidad que puede obtenerse, algunos productores de semilla dedican esfuerzos a la mejora de la adaptación de ciertas hortícolas a estas formas de cultivo. Así, existe un aceptable número de variedades de lechuga adaptadas a cultivos en otoño e invierno en invernadero.

Una tendencia actual en los mercados son los productos de IV gama. Entre los productos hortícolas que más se trabajan en IV gama están la lechuga, zanahoria, espinaca, coliflor, alcachofa, apio y puerro. Se incluyen aquí también los llamados productos 'mini' por su especial atractivo y sabor: espinacas baby, mini zanahorias, apios pequeños o lechugas baby son algunos ejemplos. El requisito más importante para esta presentación es la calidad del producto, de la materia prima. Para la obtención de productos de alta calidad para este mercado se necesita cultivar variedades más específicas con unos controles y condiciones de cultivo determinadas. La larga vida, textura, sabor, aroma, contenido en vitaminas y fibra pueden considerarse como los caracteres objeto de mejora para este tipo de mercado.

La adaptación a la recolección mecánica en algunas hortalizas y en aquellas variedades dedicadas fundamentalmente a la industria requiere la mejora de caracteres adicionales a la calidad o la resistencia, como son la concentración espacial de los frutos y la maduración agrupada; este es el caso de las variedades de tomate para industria o el pimiento para industria o pimentón; para algunas especies existen además características indispensables como el porte determinado de la planta como en el caso de los tomates o las judías verdes para industria.

1.3.3. Frutales

Los únicos frutales que se han introducido recientemente en cultivo han sido solamente algunos arbustos, especialmente del género *Vaccinium* y *Actinidia*, algunos de ellos con menos de un siglo de plantaciones comerciales. Los frutales clásicos, como los de hueso, de pepita y los cítricos, por no mencionar la vid y el olivo, llevan siglos de cultivo especializado. Parece ser que los primeros cruzamientos dirigidos en la mejora genética de frutales se realizaron hacia 1800 en Inglaterra por Thomas A. Knight. Ello condujo a una selección más racional, en la que intervinieron una gran cantidad de aficionados en la mayoría de los países europeos, especialmente Francia, Bélgica e Inglaterra, con el desarrollo de una gran cantidad de cultivares de manzano y peral, y posteriormente los grandes trabajos de finales del siglo XIX por Burbank en Estados Unidos y Michurin en Rusia. En algunas especies se ha producido una gran explosión de cultivares que ha provocado una renovación total del panorama varietal, especialmente en el melocotonero, a pesar de que una plantación frutal puede tener una larga vida productiva.

Teniendo en cuenta que los árboles frutales constan casi siempre de dos componentes genéticos distintos, el cultivar y el patrón, la mejora genética debe enfocar ambos componentes de manera totalmente independiente, ya que los problemas que presentan son distintos y requieren objetivos de mejora diferentes (Socias i Company, 1989).

1.3.3.1. Cultivares

Desde el punto de vista de los cultivares, los objetivos de mejora con los que se puede emprender un programa de mejora son diversos:

1.-Mejora de la calidad del fruto, aunque éste es un aspecto fundamental en todo programa de mejora que se debe priorizar al mismo tiempo que cualquiera de los otros criterios de selección, como los expuestos a continuación. Teniendo en cuenta que la calidad es un concepto difícil de definir, y a menudo efímero (Janick, 2005), la definición de este objetivo es compleja y cambiante. Desde la calidad visual, basada fundamentalmente en el tamaño y el color, a la organoléptica, la comercial y la industrial, se ha ido evolucionando en la definición y valoración de objetivos, primando cada vez más calidad organoléptica, sin descuidar otros aspectos, como su capacidad a la transformación industrial (para zumos, mermeladas y otros productos derivados), adaptación a su preparación para productos de IV

gama, etc. Actualmente se está dando también importancia a la calidad nutricional de algunas frutas, por la presencia de antioxidantes, vitaminas, etc., así como por la composición en ácidos grasos en los distintos frutos secos.

2.-Resistencia a plagas y enfermedades, tanto para evitar los daños que estos problemas fitopatológicos causan por sí mismos, como también para evitar la transmisión de otras enfermedades, como determinadas virosis, por vectores. Igualmente estas resistencias son fundamentales para reducir los tratamientos fitosanitarios para un cultivo más sostenible e incluso para una producción biológica.

3.-Regulación de la época de maduración, con el fin de obtener cultivares de maduración más temprana o más tardía para extender la época de recolección y con ello la de comercialización de la especie, así mismo con un mejor aprovechamiento de la mano de obra de recogida, de la maquinaria de recolección y de las instalaciones de acondicionamiento.

4.-Obtención de variedades autocompatibles en aquellas especies con necesidad de polinización cruzada con el fin de evitar los problemas que esta polinización implica, como la presencia de cultivares inter-compatibles de floración simultánea, correcta disposición en la plantación, presencia de insectos polinizadores y tiempo atmosférico adecuado para su actividad. Ejemplo de este tipo de mejora son las nuevas variedades de cerezo y almendro.

5.-Simplificación del cultivo, con variedades compactas, de pocas necesidades en poda, de fácil formación, de rápida entrada en producción, de fácil recolección mecánica en su caso, etc...

6.-Adaptación a posibles nuevas zonas de cultivo, reguladas fundamentalmente por el clima. Entre estos objetivos se pueden distinguir algunos relacionados con el cambio climático, como puede ser la disminución de las necesidades en frío para permitir el cultivo en zonas más cálidas, tanto en las condiciones actuales como con las previsiones de futuro. También el retraso en la floración por medio de la regulación de las necesidades en frío y calor para permitir el cultivo en zonas con alto riesgo de heladas. Aumento de la resistencia intrínseca al frío, para el cultivo en zonas frías, así como la disminución de las necesidades en calor en el período reproductivo para el cultivo en zonas de ciclo vegetativo más corto.

1.3.3.2. Patrones

La mejora genética de los patrones frutales responde a la misma filosofía que la mejora de cultivares: la resolución de problemas técnicos que plantea la producción frutal. Su consideración, sin embargo, siempre ha sido posterior por el hecho de que la importancia de los patrones fue detectada más tarde. En primer lugar hubo de superarse la propagación generalizada por semilla de la mayoría de los frutales que no se propagaban fácilmente por estaquilla. Sólo algunas especies como el ciruelo, el olivo, la vid, la higuera o el granado pueden propagarse fácilmente, por lo que para las otras hubo que acudir al injerto con el fin de preservar

las buenas características de los cultivares seleccionados. Con este fin se utilizaron en principio patrones francos, empezando por árboles de la misma especie que se reinjertaban debido a sus cualidades deficientes.

No puede hablarse de mejora genética de patrones frutales hasta que en la Estación Experimental de East Malling (Inglaterra) se inició con éxito la selección de una gama de patrones con distinto vigor para el manzano, que realmente ha sido un buen ejemplo, aunque el éxito obtenido en el manzano no se ha repetido en otras especies. Desde el punto de vista de los patrones los objetivos de selección para un programa de mejora pueden ser:

1.-La compatibilidad con los cultivares de la especie elegida, teniendo en cuenta que a veces se usan como patrones sujetos de una especie diferente a la del cultivar. Por ello la compatibilidad es un componente obligatorio de la mejora de patrones, como la calidad para los cultivares.

2.-Ligado al concepto de compatibilidad puede considerarse la interrelación patrón/injerto, que presenta una serie compleja de efectos frecuentemente muy difíciles de analizar, pero que en algunos casos concretos puede afectar ciertas características propias del cultivar, muy importantes desde el punto de vista agronómico, como es el de la influencia del patrón en el tamaño y la calidad del fruto y en el momento de su maduración. Si un patrón induce un pequeño retraso en la maduración puede ser negativo de cara a la comercialización de la producción por cuanto la precocidad es un factor de mercado a tener en cuenta.

3.-Facilidad de propagación, ya que un patrón debe utilizarse en grandes cantidades, para lo cual se debe propagar de la manera más sencilla y económica, tanto si se propaga por semilla, que debe ser de fácil germinación, como si es de propagación vegetativa, por estaquilla leñosa, herbácea o, más recientemente, *in vitro*.

4.-Adaptación a determinados tipos de suelo, especialmente para extender el cultivo a suelos no muy adecuados para los frutales. Un factor muy importante, especialmente en España, por la gran extensión de suelos calizos, es el de la tolerancia a la clorosis férrica que acompaña a este tipo de suelos. Otra característica es la de suelos compactos, especialmente por su elevada retención de agua que puede causar problemas de asfixia. Otro problema del suelo, relacionado también con el agua de riego, es la salinidad.

5.-Resistencia a plagas y enfermedades propias del suelo o que se manifiesten en la zona del cuello, entre los que destacan los hongos y los insectos del suelo, así como los nematodos.

6.-Resistencia a plagas y enfermedades propias del cultivar que también pueden afectar al patrón, ya que no sería operativo injertar un cultivar resistente sobre un patrón sensible.

7.-Resistencia a factores climáticos y de suelo, como puede ser el escaldado por el sol y especialmente los daños por frío, resistencia a la sequía, etc... Todo ello va ligado a obtener una mayor eficacia en la utilización de los recursos, como el agua, los nutrientes, etc...

8.-Regulación del vigor del conjunto patrón/injerto, que puede implicar en algunos casos la utilización adicional de un tercer componente, el intermediario.

9.-Obtención de patrones claramente diferenciados del injerto para facilitar el manejo en vivero y evitar confusiones entre ambos componentes de la planta, como son los patrones de hoja roja (Felipe, 2009).

En cuanto a la obtención de patrones hay dos vías claramente diferenciadas en su técnica, pero con los mismos fines: obtención de plantas homogéneas que proporcionen un vigor determinado, compatibles con la mayoría de cultivares comerciales (o con alguna en particular), con buena adaptación a ciertas condiciones de medio (suelo y clima principalmente) y/o resistentes a ciertas plagas y enfermedades. Estas dos vías son:

1.-Obtención de semillas procedentes de especies o cultivares especialmente seleccionados porque libremente polinizados o con polinización dirigida dan lugar a descendencias homogéneas en cuanto a vigor y comportamiento agronómico. Este sistema es un perfeccionamiento del sistema clásico de reproducción por patrones francos por siembra indiscriminada de semillas procedentes de diversos orígenes: fábricas conserveras, plantas silvestres, etc...

2.-Obtención de plantas a través de cruzamientos o prospecciones que se seleccionan por sus caracteres agronómicos y que sirven como cabeza de clon para su propagación vegetativa. El mayor problema que se encuentra en este método es precisamente la técnica de reproducción vegetativa. La gran ventaja de este método es la fijación de los caracteres favorables y el comportamiento homogéneo de estos patrones clonales en relación con el medio y el clima en la plantación. Es conveniente la selección sanitaria de este tipo de patrones para difundir desde el primer momento un material sano.

1.4. Proceso de selección

1.4.1. Cultivos extensivos

En su clásico libro Allard (1960) describe los métodos de mejora dividiendo las plantas en dos grandes grupos según su método de reproducción: especies autóгамas (la reproducción tiene lugar mediante autofecundación) y especies alógamas (la reproducción tiene lugar mediante polinización cruzada). Existe una gradación entre ambos tipos de tal manera que hay alógamas con una proporción, más o menos alta, de autofecundación y viceversa. Este método de estudio, sin detenerse en la mejora de cultivos concretos, ha sido seguido por la mayoría de los

textos de mejora vegetal hasta la actualidad; así, por ejemplo y hablando de textos recientes, Cubero (2003) y Acquaah (2007), si bien en este último hay, además, una parte en la que se describen los cultivos herbáceos extensivos más importantes (trigo, maíz, arroz...).

En general, las especies alógamas sufren una gran depresión consanguínea cuando se las somete a autofecundación, si bien hay algunas (como las cucurbitáceas) que la soportan sin pérdida aparente de vigor, en tanto que otras (como la alfalfa) son extremadamente intolerantes. Hay que indicar que esta división en especies autógamas y alógamas (aplicable, por otra parte, a las especies horticolas) no es completa dado que hay cultivos cuyo modo usual de reproducción es vegetativo.

En todos los casos, y de un modo muy simplificado, el método de mejora consta de dos pasos: 1) generación de variabilidad (o búsqueda de la ya existente en el cultivo); 2) detección de los genotipos superiores. Esto sentado, hay unos métodos propios de las especies autógamas y otros de las alógamas que a continuación se describirán de forma muy sucinta (una descripción detallada puede verse en los textos citados anteriormente).

1.4.1.1. Especies autógamas

Las variedades tradicionales de las especies completamente autógamas (el trigo, por ejemplo) son homocigóticas como consecuencia de la continua autofecundación. Esto hace que dichas variedades tradicionales sean una mezcla de líneas puras (líneas homocigóticas). Debido a que estas variedades suelen llevar muchos años (cientos de años en muchas ocasiones) cultivándose en un área determinada, están muy bien adaptadas a unas condiciones ambientales concretas. El hecho de estar constituidas por una mezcla de líneas les da una gran estabilidad, derivada del poder amortiguador que tales mezclas tienen: si una línea falla en un año determinado, otra línea servirá para compensar ese fallo. En una agricultura avanzada este tipo de variedad no se acepta por su heterogeneidad que, entre otras cosas, dificulta su manejo mecanizado.

El método más sencillo de mejora es la selección masal que se puede llevar a cabo mediante dos métodos. Uno es la eliminación de los tipos indeseables; otro la selección de los genotipos que se ajustan a lo que el mejorador busca. En ambos casos el resultado final es el mismo: se reproducen sólo las mejores plantas de la variedad.

El siguiente método es obvio: selección de líneas puras. Por ejemplo, se seleccionan las mejores plantas de una de estas variedades-mezcla, se evalúan sus descendencias al año siguiente y se forma una nueva variedad con la mejor de ellas.

Hasta ahora todo lo descrito se basa en la explotación de la variabilidad existente. Pero, ¿qué se puede hacer cuando esa variabilidad, digamos natural, se agota o no encontramos un genotipo adecuado? La respuesta es inmediata: se genera

nueva variabilidad mediante el cruzamiento de dos líneas puras y se trata de encontrar en las generaciones segregantes los genotipos que se ajustan a lo deseado. Es fundamental realizar una buena selección de los genitores del cruzamiento. Las generaciones segregantes se pueden manejar por dos métodos: el genealógico y el masal. En el primero se guarda un registro detallado de cada una de las generaciones; bajo el segundo se cultiva la F_2 y generaciones sucesivas en masa antes de comenzar la selección de plantas individuales.

Un último método de estos que podríamos llamar clásicos es el de retrocruzamiento, es decir el cruzamiento de una F_1 con uno de sus parentales. Como Cubero (2003) claramente señala, cuando este método se emplea en mejora hay que añadir el adjetivo *recurrente* pues se sigue cruzando con el parental con el objeto de incluir en éste una característica que no posee, recuperando al final del proceso todo el resto de su propio genotipo.

1.4.1.2. Especies alógamas

La mayoría de los métodos que siguen fueron desarrollados en el maíz por diversos motivos. Es uno de los principales cultivos del mundo. Además, tiene la ventaja de ser una especie monoica, fácil de autofecundar y de cruzar, por lo que puede ser manejada como autógena o como alógama. Una planta produce normalmente cientos de descendientes. Finalmente, aunque sufre depresión consanguínea muy acusada con la autofecundación, se pueden conseguir líneas completamente homocigóticas con un vigor que, aunque es muy inferior al de una planta heterocigótica, es suficiente para poder ser manipuladas sin mayores problemas. Todo ello hace que el maíz sea una planta modelo ideal para el estudio de los métodos de mejora de las plantas alógamas.

El primer método de mejora es la selección masal, que es el método por el que seguramente los agricultores primitivos domesticaron los cultivos actuales. La selección masal puede hacerse de numerosas formas, todas ellas consistiendo, en esencia, en la recolección de semilla en masa de varias plantas. Aún hoy la selección masal sigue siendo empleada en agriculturas poco avanzadas por los agricultores que cultivan las antiguas variedades de polinización libre. El agricultor elige las mejores plantas para su uso como proveedoras de semilla para la cosecha siguiente. En muchos casos el número de plantas seleccionadas es pequeño, lo que origina en pocos años un aumento considerable de la consanguinidad en la variedad con la consiguiente disminución de rendimiento que ello conlleva. Además, al no controlar la polinización, el agricultor sólo ejerce selección sobre el parental femenino, lo que hace que el ritmo de mejora del rendimiento sea, si lo hay, bastante lento. La selección masal sí puede ser útil, en cambio, para caracteres que tienen una heredabilidad alta como, por ejemplo, la fecha de floración en el maíz (Ordás et al., 1996).

Un método de mejora ampliamente usado en plantas alógamas es el de las variedades híbridas. Este método, que tuvo un tremendo éxito en el maíz, se ha ex-

tendido a otras especies, tanto alógamas como autógamas. Se llaman variedades híbridas aquéllas en las que el cultivo comercial se obtiene a partir de una F_1 . Los parentales de esta F_1 pueden ser líneas puras, clones, otras poblaciones o, incluso, otras F_1 (caso de los híbridos dobles). Aparte de la mejora de rendimiento que se obtiene con las variedades híbridas, un beneficio adicional es su uniformidad, lo que facilita la mecanización del cultivo.

Hay básicamente dos métodos de obtención de líneas puras en especies alógamas: la autofecundación con selección visual a lo largo de las diversas generaciones de autofecundación y el desarrollo de haploides dobles. Ordás et al. (2012) demuestran las ventajas del primer método. La obtención de haploides dobles se usa ampliamente en muchas especies autógamas como trigo, cebada, canola... (Forster et al., 2007). En maíz, en los últimos años se ha despertado un interés, que parece que va creciendo, por esta técnica que, aparentemente, es mucho más rápida que la convencional de autofecundación con selección por el método de mazorca-a-surco. Independientemente del método de generación de haploides, hay que duplicarlos lo cual puede conseguirse de modo espontáneo o mediante el uso de óxido nítrico o colchicina (Lee y Tracy, 2009).

El clásico sistema de «líneas puras-híbridos» logró un avance espectacular en el maíz con relación a las variedades de polinización libre. Sin embargo, una vez que se alcanzó la primera ganancia, los posteriores aumentos de producción fueron mucho menores y más lentos. ¿Qué explicación tiene esto? La experiencia ha mostrado que los mejores híbridos se obtienen cruzando líneas procedentes de material genéticamente distinto. Supongamos entonces que desarrollamos una serie de líneas puras al azar de cada una de dos variedades y que cruzamos las líneas de una variedad con las de la otra, también al azar. El genotipo de cada híbrido obtenido será uno de los posibles genotipos del cruzamiento de las dos variedades y, por otra parte, la probabilidad de que un genotipo aparezca en un híbrido entre líneas será la misma que cuando crucemos las variedades originarias de dichas líneas. En otras palabras: el sistema no genera nuevos genotipos.

¿Cuál ha sido entonces la razón del éxito del sistema «líneas puras-híbridos»? La respuesta es sencilla: los genotipos producidos por el cruzamiento de líneas puras son reproducibles, lo que no ocurre con los de las plantas de la variedad original. Aunque en la variedad de polinización libre original fuésemos capaces de identificar un genotipo ideal, seríamos incapaces de mantenerlo debido al mecanismo reproductivo de la especie alógama. Añadamos, además, la precisión obtenida en los ensayos de rendimiento para identificar los mejores híbridos y la facilidad de explotación comercial, todo ello debido a la exacta reproducción de cada genotipo.

Una vez alcanzada la primera ganancia mediante el sistema «líneas puras-híbridos» se ha comprobado que, mediante ciclos sucesivos similares, no se consiguen nuevas ganancias. ¿Por qué? Supongamos que se extrae un nuevo grupo de líneas

de las mismas poblaciones utilizadas anteriormente. Lo que estamos haciendo es muestrear de nuevo las mismas poblaciones por lo que la probabilidad de contener los individuos más extremos es la misma para todas las muestras.

Nos encontramos, pues, con un problema en el sistema «líneas puras-híbridos». Una vez que se ha conseguido una gran ganancia inicial, los avances siguientes tienen que conseguirse a partir de cambios genéticos en las poblaciones base lo cual se puede conseguir mediante los diversos métodos de selección recurrente. Tal como su nombre indica, la selección recurrente implica el uso de métodos de selección que se ejecutan de una manera repetitiva. Independientemente del carácter que se trata de mejorar, la selección recurrente tiene siempre dos objetivos: (i) aumentar la frecuencia de los alelos favorables; (ii) mantener la variabilidad genética (Hallauer et al., 1988).

Todos los sistemas de selección recurrente son, por naturaleza, cíclicos. Cada ciclo comprende tres fases: (i) desarrollo de progenies; (ii) evaluación de estas progenies; (iii) recombinación de las familias o progenies seleccionadas. Aunque la mayoría de los métodos de selección recurrente incluye estas tres fases, hay una gran variación en diversos aspectos: tipos y número de progenies evaluadas, número de familias seleccionadas, control de los parentales y tipo de progenies que se recombinan (Weyhrich et al., 1998).

Los distintos esquemas de selección recurrente se pueden agrupar en dos grandes categorías: selección intrapoblacional, cuando el objetivo es mejorar una población "per se" y de las líneas puras que de ella se deriven, y selección interpoblacional, en que el objetivo buscado es la mejora del híbrido varietal entre dos poblaciones y de los híbridos entre líneas que procedan de cada una de ellas. El primer tipo de selección explota la varianza aditiva, en tanto que el segundo aprovecha a la vez las varianzas aditiva y dominante.

1.4.1.3. Selección genómica

En los últimos años, y tras la publicación del artículo seminal de Meuwissen et al. (2001), se ha despertado un gran interés por la selección genómica. Estos autores indican que los valores mejorantes se pueden predecir como la suma de los efectos de todos los marcadores llevando a cabo una regresión de los valores fenotípicos sobre todos los marcadores disponibles.

En plantas el mapeo de QTL comenzó hace más de 20 años y ha sido usado con éxito en el análisis genético de caracteres poco complejos, particularmente en la tolerancia a estreses abióticos y bióticos, donde una gran parte de la variación genética se debe a uno o a unos pocos loci. Sin embargo, el uso de QTL en el caso de caracteres complejos ha tenido un impacto limitado debido principalmente a la pequeña proporción de varianza genética explicada por los QTL y, además, al hecho de que muchos QTL detectados son específicos de un determinado fondo genético.

El mapeo de alta densidad con SNIP permite predecir valores genéticos que pueden ser la base de la selección genómica (Crossa et al., 2014).

1.4.2. Especies hortícolas

La realización de cruzamientos entre diferentes genotipos seguida de selección en subsecuentes generaciones es sin duda la técnica más ampliamente utilizada en mejora de hortícolas para crear variabilidad y para el desarrollo de híbridos o variedades comerciales. En la mejora de autógamias, cuando en la población de la que se parte ya existe alguna planta con el carácter o caracteres deseados, se multiplica y se obtendrá una línea pura. Si no existe habrá que crear una población mediante cruzamientos y luego llegar a la homocigosis al cabo de una serie de autofecundaciones. Sea como fuere el objetivo es obtener una línea pura que se utilizará como tal, como parental de híbridos, o como componente de una multilínea. Las plantas de una especie alógama son fuertemente heterocigóticas por lo que las poblaciones se deberán manejar manteniéndolas siempre en polinización abierta, utilizando diversas variantes de selección masal para los caracteres deseados. Si las alógamas se utilizan en polinización libre se podrán obtener variedades población, genéticamente heterogéneas, con una gran riqueza genética, flexibles, adaptables y competitivas en ambientes desfavorables, con mayor producción que las variedades locales. Como ejemplos se pueden citar la cebolla, la borraja, el pimiento tipo piquillo y el pimiento para pimentón. También en alógamas, mediante autofecundaciones forzadas pueden obtenerse líneas puras y el cruce de dos líneas puras dará lugar a un híbrido con un grado de vigor y producción generalmente superior al de las líneas de partida.

Son muchas las mutaciones inducidas por tratamientos físicos o químicos e incluso espontáneas que han dado lugar a cultivos comerciales y no solamente en ornamentales; así la coliflor, el brócoli, el repollo o las coles de Bruselas son productos originados a partir de mutaciones de su especie silvestre ancestral, *Brassica oleracea*. En lechuga, la utilización de mutagénesis química seguida de cruzamientos sigue dando lugar a obtenciones, por ejemplo los tipos mini de la lechuga y tolerancia a herbicidas (Mou, 2011). Más recientemente, y desde un punto de vista experimental, se recurre a técnicas modernas, mucho más dirigidas, como la mutagénesis insercional, que ha permitido, por ejemplo, la identificación y clonación de genes que controlan procesos bioquímicos relacionados con la resistencia o tolerancia a condiciones de sequía o de salinidad en tomate (Moyano, 2013).

El cultivo de tejidos, aunque con menor importancia, ha sido también fuente de variabilidad para algunas especies, debido principalmente a la aparición de variación somaclonal; se puede citar la obtención de apios con alto rendimiento y resistencia a *Fusarium wilt* (Heath-Pagliuso et al, 1989) o tomate con alto contenido en materia seca o con resistencia a raza 2 de *Fusarium oxysporum* (Evans et al, 1984). Otras técnicas de cultivo de tejidos han constituido una importante herramienta en la mejora de hortícolas; así, el rescate de embriones ha permitido con-

seguir con éxito cruzamientos interespecíficos entre *Solanum lycopersicon* y *S. peruvianum* realizados para la introducción de resistencias a TYLCV y TSWV en el tomate cultivado (Julian et al., 2013).

La poliploidía, como técnica tradicional seguida de cruzamientos, se ha utilizado también en la mejora de algunas especies hortícolas. Así, en sandía ha sido posible la consecución de una sandía sin semillas, de la que actualmente ya existe una aceptable diversidad de tipos; se trata de una sandía triploide obtenida mediante el cruce entre una sandía tetraploide, obtenida a su vez por duplicación cromosómica, que actúa como parental femenino y una diploide, parental masculino.

En la mejora para las resistencias a enfermedades y plagas el paso más importante es poner a punto unas técnicas de inoculación o infestación artificial que permitan hacer una selección eficaz de los genotipos de interés. Estos métodos han de ser fiables y rápidos, deben suponer un ahorro en espacio y tiempo y evitar en lo posible la influencia ambiental en la expresión del carácter. Independientemente, los programas de mejora para la resistencia se pueden ver seriamente dificultados en la evaluación de la misma por el tipo y genética de dicha resistencia y del tipo de patógeno.

Muchos de los caracteres de calidad carecen o han carecido de métodos precisos y rápidos de evaluación, no se conoce muy bien su control genético, la mayoría son caracteres cuantitativos y suelen estar ligados a características desfavorables. Para el contenido en elementos nutritivos y vitaminas la dificultad es menor y se recurre a métodos analíticos precisos para determinar su presencia y concentración en el producto. Pero existen otros, de suma importancia, como son el sabor y el aroma, de gran complejidad, determinados no solo por la cantidad de los compuestos químicos implicados sino también por las proporciones en las que éstos se encuentran. Se utilizan determinaciones analíticas de los principales compuestos, de diversas variables (contenido en sólidos solubles, °Brix, pH, acidez titulable); se hacen determinaciones químicas más precisas para los compuestos no volátiles involucrados (HPLZ, CZE...); se utiliza la cartografía de gases y espectrometría de masas para los volátiles; estos métodos son novedosos, caros y requieren personal cualificado. Además hay que tener en cuenta la influencia ambiental en estos caracteres, lo que requiere el desarrollo de métodos que permitan modelizar las fluctuaciones causadas por los factores ambientales y las variables agronómicas.

Para la mejora de las hortícolas adaptadas a la IV gama uno de los caracteres más importantes es la larga vida. Se trata de un carácter difícil de manejar si se quiere combinar con calidad organoléptica. Los frutos de melón de tipo Cantaloupe Charentais por ejemplo, son climatéricos siendo el etileno el factor regulador del proceso de maduración. Los melones de tipo Charentais con larga vida obtenidos mediante cruzamientos entre climatéricos y no climatéricos pierden la producción de volátiles responsables del aroma. Las evaluaciones de hasta 28 volátiles en diferentes cultivares de tipo Charentais y evaluaciones de diferentes variedades de

melón llevaron a la conclusión de que el carácter larga-vida lleva asociado una fuerte pérdida de aroma de los frutos y otros caracteres de calidad (Aubert y Bourger, 2004; Liu et al., 2004). Otro método utilizado ha sido la inhibición de la síntesis de etileno mediante silenciamiento génico del gen que codifica para la ACC oxidasa pero esto ha conducido a una pérdida importante del aroma y si bien el reblandecimiento de la carne se ha ralentizado, no ha podido ser evitado por completo. Más recientemente se han iniciado abordajes que contemplan el aislamiento y clonación de genes implicados en la síntesis de ésteres volátiles responsables del aroma (Manriquez et al., 2007).

El desarrollo de las nuevas técnicas de biología molecular ha supuesto para los mejoradores la posibilidad de utilizar material vegetal idóneo y herramientas únicas y precisas para ser usadas en las evaluaciones de caracteres complejos relacionados con la resistencia a enfermedades y plagas o los componentes de la calidad. La obtención de poblaciones especiales (RILs, NILs, etc...), la creación de mapas genéticos, la secuenciación del genoma de algunas de las especies más cultivadas (tomate, melón, pepino), la localización de QTLs implicados en el control del carácter, la identificación de marcadores ligados a los genes de interés y su utilización en la selección asistida por marcadores (MAS), o el conocimiento de la influencia ambiental en el control de un carácter ha permitido una mayor precisión y eficiencia en el desarrollo de los programas de mejora en diversas hortalizas (Oumouloud et al., 2013). Para un gran número de caracteres de resistencia, principalmente monogénicos u oligogénicos, se dispone de marcadores moleculares que acortan y abaratan sensiblemente todo el proceso de selección de los genotipos de interés. La identificación y aplicación de marcadores moleculares ligados a muchas de las resistencias existentes ha simplificado sobremanera todo el proceso, fundamentalmente en lo relativo al mantenimiento del patógeno y plaga y a la aplicación de las técnicas artificiales de infección e infestación. Los caracteres poligénicos o de baja heredabilidad necesitan de un mayor esfuerzo en este terreno para poder ser utilizados de forma rutinaria. Este es el caso de la mayoría de los caracteres relacionados con la calidad, donde todo el proceso hasta acceder al uso de marcadores necesita todavía una mayor dedicación por los problemas inherentes a la propia evaluación del carácter y que se han expuesto más arriba.

El uso de la ingeniería genética ha permitido progresos en la obtención de diferentes hortalizas mejoradas para diferentes caracteres bien por el aumento de determinadas sustancias de valor nutritivo o bien por la introducción de genes no existentes en la especie objeto de mejora que permiten luchar contra plagas y enfermedades. Mediante distintas estrategias de ingeniería genética se ha conseguido aumentar el contenido en azúcares en tomate, melón, zanahorias... (Nookaraju et al. 2010), carotenoides y polifenoles en tomate, folatos en tomate y lechuga, tocoferol en lechuga (Mattoo et al., 2010) o aroma en tomate (Lewinsohn et al., 2010).

En el primer caso se ha demostrado, por ejemplo en lechuga, que la biofortificación mediante el uso de ingeniería genética tiene un potencial enorme para me-

jorar el contenido en vitamina C, compuestos fenólicos y de actividad antioxidante. En cuanto a la introducción de genes que otorgan resistencia a insectos, como el gen Bt, esta estrategia no ha tenido aplicación comercial en hortalizas. Curiosamente, la primera hortaliza Bt fue el tomate, en el que a través de ingeniería genética se obtuvieron tomates resistentes a dos especies de lepidópteros (*Manduca sexta* y *Heliothis virescens*) (Fischhof et al., 1987). Desde entonces se han desarrollado otras hortalizas Bt, pero no se ha comercializado ninguna, excepto la patata y el maíz dulce. Los impedimentos más importantes han sido, por un lado la complejidad de la mejora de hortalizas ya que existen multitud de tipos para la mayoría de las especies, por lo que la introducción del gen en cada uno de estos tipos llevaría a un coste económico importante; por otro lado y que constituye el impedimento más gravoso es el sistema de legislación existente que requiere que hayan de registrarse, con todo lo que lleva consigo, todos los pasos que impliquen transformación a lo largo del proceso de obtención de una nueva variedad modificada y esto supone un coste económico muy importante (Shelton, 2012). Independientemente de los problemas metodológicos y económicos existen otro tipo de consideraciones ecológicas y sociales liderados por algunos sectores de la sociedad que han llevado a legislaciones que impiden, por ejemplo en la Unión Europea, las autorizaciones pertinentes para el cultivo y consumo de hortalizas transgénicas; es por ello por lo que estas técnicas de ingeniería genética no se utilizan en la práctica para el desarrollo de nuevas variedades.

1.4.3. Frutales

En la mejora genética frutal la diferenciación entre especies autóгамas y alógamas no puede establecerse en razón a la propagación vegetativa de estas especies, una vez que se ha seleccionado el genotipo correspondiente a los objetivos de la mejora, con el cual se establece la cabeza de clon. En todo caso, como se ha mencionado anteriormente, la autogamia puede ser un objetivo de la mejora, como han sido los casos enormemente significativos del almendro (Socias i Company, 1996) y del cerezo (Kappel et al., 2012).

Por ello, una vez obtenidas las plantas por cualquier método, básicamente por cruzamientos, pero también por transformación o irradiación, se debe proceder a su evaluación. Recientemente en la obtención de plantas mediante cruzamientos se han introducido nuevas herramientas para facilitar su obtención, como puede ser la mayor eficacia de los cruzamientos en un sentido que en el inverso, como en los híbridos melocotonero \times almendro. En algunos casos no pueden obtenerse semillas, o su poder germinativo es muy bajo o nulo, como en los casos de las uvas apiremas o de los frutales de hueso de maduración muy temprana, como los cerezos y los melocotoneros de maduración precoz. Teniendo en cuentas que estas características son objetivos prioritarios de muchos programas de mejora, en estos casos se debe proceder al cultivo de embriones o incluso al rescate de óvulos, cuando ni siquiera el embrión se llega a desarrollar.

En algunos casos se pueden plantar directamente las plantas en campo o previamente en el invernadero, y en ellas se aplican los criterios de selección definidos por los objetivos del programa de mejora. En este proceso se pueden seguir distintos sistemas de selección, desde los clásicos de simple evaluación del comportamiento de las plantas, al estudio de algún carácter concreto para el que la selección es prioritaria (como la autocompatibilidad por crecimiento de los tubos polínicos o cuajado), o la inoculación artificial de agentes patógenos para la selección por resistencia a estos patógenos, etc... En cada caso hay que valorar la correlación entre el carácter a evaluar y su expresión en las plantas que se evalúan, con el fin de evitar problemas como el que se presentó en la evaluación de la resistencia al fuego bacteriano en plántulas en invernadero, donde la resistencia medida en brote joven no se corresponde a la resistencia en inflorescencia, punto de infección por la bacteria en plantaciones comerciales (Layne y Quamme, 1975).

Igualmente en este proceso de selección se ha introducido la selección genómica, mediante marcadores moleculares de caracteres de interés, aunque el desarrollo de estas herramientas en frutales ha sido más lento que en los otros grupos de plantas. Cada vez es más frecuente el conocimiento de la secuenciación de algunas especies, como ya se ha hecho con el manzano y la vid. También se van describiendo QTL para distintos caracteres de interés en la mejora. Sin embargo, estas herramientas pueden presentar algunos problemas en cuanto a su interpretación. Como ejemplo, en el almendro se han desarrollado marcadores que indican la presencia del alelo S_f de la autocompatibilidad en las descendencias de los programas de mejora, aunque la presencia de este alelo no implica necesariamente el comportamiento autógamo de las plantas, por lo que en el proceso de selección deben intervenir otros elementos (Socias i Company et al., 2010).

Después de esta primera eliminación, que debe ser tan drástica como sea posible, se eligen aquellas plantas que se distinguen por sus buenas características y que merecen seguir en el proceso de selección. Dependiendo del tipo de planta, estas plantas élite sirven para obtener la siguiente generación o se injertan en vivero para proseguir con ensayos de campo (Figura 1.2).

Los ensayos de campo permiten proseguir con la observación del comportamiento de las plantas seleccionadas, sobre las cuales se continúan aplicando los mismos criterios de selección definidos por los objetivos del programa. Con ello se consigue reducir el número de plantas selectas, con las se procede a los ensayos exteriores, fundamentalmente en campos de agricultores en los que se aplican los sistemas normales de cultivo, de cuyo estudio se procede a la selección final, teniendo en cuenta que un nuevo cultivar debe cubrir las expectativas del agricultor en un explotación comercial. Finalmente se procede al registro del nuevo cultivar y su distribución comercial (Figura 1.3).

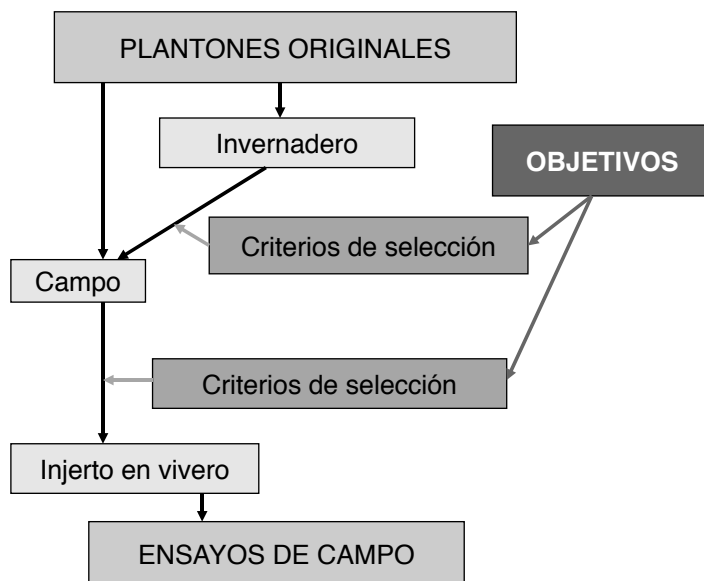


Figura 1.2.—Esquema de aplicación de los criterios de selección en las primeras fases de un programa de mejora genética.

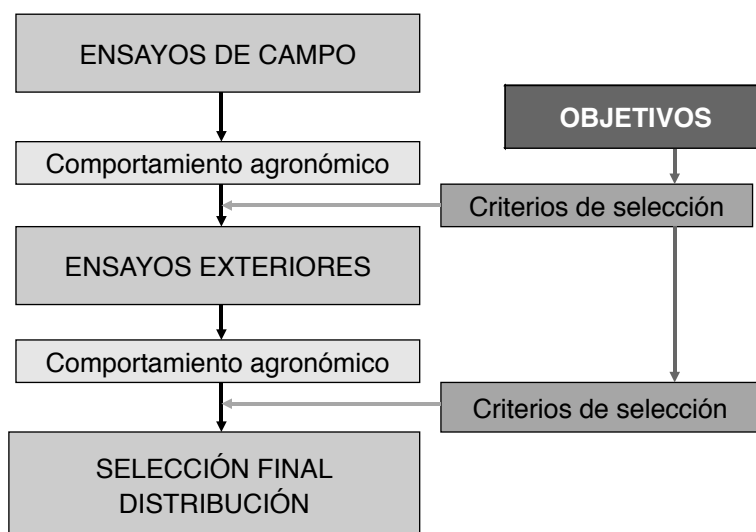


Figura 1.3.—Esquema de aplicación de los criterios de selección en las últimas fases de un programa de mejora genética.

1.5. Referencias

- Acquaah G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, EE UU.
- Allard RW. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley and Sons, Nueva York, EE UU.
- Aubert C, Bourger N. 2004. Investigation of volatiles in charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars. J. Agric. Food Chem. 52: 4522-4528.
- Crossa J, Pérez P, Hickey J, Burgueño J, Cerón-Rojas J, Zhang X, Dreisigacker S, Babu R, Li Y, Bonnett D, Mathews K. 2014. Genomic prediction in CIMMYT maize and wheat breeding programs. Heredity 112: 48-60.
- Cubero JI. 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Egli DB, Rucker M. 2012. Seed vigor and the uniformity of emergence of corn seedlings. Crop Sci. 52: 2774-2782.
- Escobar I, Berenguer JJ, Navarro M, Cuartero J. 2012. La calidad gustativa y nutricional como atributos para liderar el mercado de tomate en fresco. Caja Rural de Granada, Granada, España.
- Evans DA, Sharp WR, Medina-Filho HP. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Amer. J. Bot. 71: 759-774.
- Felipe AJ. 2009. 'Felinem', 'Garnem', and 'Monegro' almond x peach hybrid rootstocks. HortScience 44: 196-197.
- Fischhoff DA, Bowditch KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester, Rogers SG, Fraley RT. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio-Technol. 5: 807-813.
- Forster BP, Heberle-Bors, Kasha KJ, Touraev A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci. 12: 368-375.
- Hallauer AR, Russell WA, Lamkey KR. 1988. Corn breeding. En Sprague GF, Dudley JW (eds.) Corn and corn improvement, 3^a ed. ASA-CSSA-SSA, Madison Wisconsin, EE UU, pp. 463-564.
- Heath-Pagliuso S, Pullman J, Rappaport L. 1989. 'UC-T3 Somaclone': Celery germplasm resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*, race 2. HortScience 24: 711-712.
- Janick J. 2005. Breeding intractable traits in fruit crops: dream the impossible dream. Introduction. HortScience 40: 1944.
- Julian O, Herraiz J, Corella S, Di Lolli I, Soler S, Díez MJ, Pérez de Castro A. 2013. Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: exploitation of resistance to viruses. Euphytica 193: 183-196.
- Kapple F, Granger A., Hrotkó K, Schuster M. 2012. Cherry. En: Badenes ML, Byrne DH (eds.) Fruit Breeding. Springer, New York, EE UU. pp. 459-504.
- Layne REC, Quamme HA. 1975. Pears. En: Janick J, Moore JN (eds.) Advances in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette, IN, EE UU. pp. 38-70.
- Lee EA, Tracy WF. 2009. Modern maize breeding. En: Bennetzen JL, Hake S (eds.) Maize handbook: Genetics and genomics. Springer Science+Business Media LLC. pp. 141-160.
- Lewinsohn E, Davidovich-Rikanati R, Iijima Y, Pichersky E, Sitrit Y. 2010. Functional genomics for the discovery of genes affecting lemon basil aroma and their use in flavor engineering of tomato. Acta Hort. 860: 205-209.
- Liu L, Kakihara F, Kato M. 2004. Characterization of six varieties of *Cucumis melo* L. based on morphological and physiological characters, including shelf-life of fruit. Euphytica 135: 305-313.

- Manríquez D, Flores FB, El Sharkawy I, Latché A, Pech JC. 2007. Molecular control of fruit ripening and sensory quality of Charentais melon. *Acta Hort.* 731: 413-420.
- Marín J. 2011. *Vademecum de variedades hortícolas. Portagrano 2011-2012.* Marín Rodríguez Ed., Madrid, España.
- Mattoo AK, Shukla V, Fatima T, Handa AK, Yachha S. 2010. Genetic engineering to enhance crop-based phytonutrients (nutraceuticals) to alleviate diet-related diseases. En: In Giardi, Rea, Berra (eds.) *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors.* pp. 122-143.
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145: 279-280.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829.
- Mou B. 2011. Mutations in lettuce improvement. *Int. J. Plant Genomics* 201: 1.
- Moyano E. 2013. Sobreexpresión de genes en tomate y generación de líneas T-DNA en la especie silvestre *Solanum pennelli* para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad. Tesis Doctoral. Universidad Murcia-CSIC.
- Nookaraju A, Upadhyaya CP, Pandey SK, Young KE, Hong SJ, Park SK, Park SW. 2010. Molecular approaches for enhancing sweetness in fruits and vegetables. *Scientia Hort.* 127: 1-15.
- Ordás A, Santiago I, Malvar RA, Vales MI. 1996. Six cycles of selection for adaptation in two exotic populations of maize. *Euphytica* 92: 241-247.
- Ordás B, Caicedo M, Romay MC, Revilla P, Ordás A. 2012. Effect of visual selection during the development of inbred lines of maize. *Crop Sci.* 52: 2538-2545.
- Oumouloud ME, Chikh-Rouhou H, Garcés Claver A, González Torres R, Perl-Treves R, Álvarez JM. 2013. Breeding melon for resistance to *Fusarium* wilt: recent developments. *Euphytica* 192: 155-169.
- Rodríguez VM, Romay MC, Ordás A, Revilla P. 2010. Evaluation of European maize (*Zea mays* L.) under cold conditions. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57: 329-335.
- Russell WA. 1984. Agronomic performance of maize cultivars representing different eras of maize breeding. *Maydica* 29: 375-390.
- Shelton AM. 2012. Genetically engineered vegetables expressing proteins from *Bacillus thuringiensis* for insect resistance: successes, disappointments, challenges and ways to move forward. *GM Crops & Food* 3: 175-183.
- Socias i Company R. 1989. La mejora genética de los frutales. *Frutic. Prof.* 21: 73-78.
- Socias i Company R. 1996. L'autogamia nel migloramento genetico del mandorlo. *Frutticoltura* 48(12): 67-70.
- Socias i Company R, Fernández i Martí A, Kodad O, Alonso JM. 2009. Self-compatibility evaluation in almond: strategies, achievements and failures. *HortScience* 45: 1155-1159.
- Troyer AF. 2004. Background of U.S. hybrid corn II: Breeding, climate, and food. *Crop Sci.* 44: 370-380.
- Vasal SK. 2001. High quality protein maize. En: Hallauer AR (ed.) *Specialty corns.* CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU. pp. 85-129.
- Vivek BS, Krivanek AF, Palacios-Rojas N, Twumasi-Afriyie S, Diallo AO. 2008. Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM. CIMMYT, México D.F.
- Weyhrich RA, Lamkey KR, Hallauer AR. 1998. Responses to seven methods of recurrent selection in the BS11 maize population. *Crop Sci.* 38: 308-321.

2 Las variedades tradicionales en el panorama actual de la mejora y la producción sostenible

Cristina Mallor¹, Ernesto Igartua² y Pilar Errea¹

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

² Estación Experimental de Aula Dei, CSIC

2.1. El valor de las variedades tradicionales

2.1.1. Adaptación

2.1.2. Diversidad

2.1.3. Casos de estudio

2.1.3.1. *Berenjena de Almagro*

2.1.3.2. *Cebolla Dulce de Fuentes*

2.1.3.3. *Melocotón de Calanda*

2.1.3.4. *Cerezas del Jerte*

2.1.3.5. *Trigo Aragón 03*

2.1.3.6. *Cebada Albacete*

2.2. Las variedades tradicionales en España

2.2.1. Procedencia

2.2.2. Dónde se conservan

2.2.3. Causas de desuso

2.3. Utilidad para la mejora genética y la producción sostenible

2.3.1. Colecciones nucleares

2.3.2. Acceso a la diversidad con herramientas genómicas

2.3.3. Uso directo

2.3.3.1. *Agricultura ecológica*

2.3.3.2. *Cultivos de proximidad y mercados locales*

2.3.3.3. *Huertos lúdicos urbanos*

2.3.3.4. *Alimentos funcionales*

2.4. Métodos de mejora

2.5. Marco legal

2.6. Referencias

2.1. El valor de las variedades tradicionales

Las variedades tradicionales o locales, también conocidas por su denominación en inglés *landraces*, son variedades originadas en sistemas de agricultura de subsistencia como resultado de un largo proceso de selección humana (selección empírica por parte de los agricultores) y selección natural, desde los orígenes de la agricultura hasta nuestros días (Harlan, 1975). Estas variedades suelen poseer alta variabilidad, son genéticamente dinámicas y están en equilibrio con el medio ambiente y los patógenos. La dispersión de los cultivos desde sus centros de origen produjo necesariamente adaptaciones a las nuevas condiciones a las que iban enfrentándose. Este proceso ha favorecido la fijación de mutaciones para cada especie, distintas en cada caso y lugar, hasta llegar a la situación de enorme diversidad que había al comienzo de la mejora moderna para la mayoría de cultivos. Así, las variedades locales son una de las fuentes de diversidad disponibles para la mejora, además de las especies silvestres emparentadas, la mutagénesis y la transgénesis.

2.1.1. Adaptación

Desde la aparición de la agricultura, las variedades locales se desarrollaron según las necesidades y preferencias de los agricultores y consumidores, acumulando características de adaptación a condiciones específicas tanto bióticas como abióticas.

En general, su adaptación y evolución se produjo en unas condiciones de prácticas culturales tradicionales y escasa fertilización y protección sanitaria, lo que les ha conferido una gran estabilidad productiva. La agricultura de subsistencia ha favorecido la aparición de variedades "seguras", que no "fallen" casi nunca, más que el aumento del potencial productivo.

La selección, tanto natural como artificial, ha actuado sobre los materiales introducidos en nuevos hábitats generando adaptación específica. Así, un mismo cultivar producido en diferentes hábitats, con el tiempo puede dar lugar a cultivares diferenciados por su adaptación a los hábitats de cultivo. En este proceso de diferenciación no actúa exclusivamente la selección natural. Variaciones introducidas por el hombre en las prácticas culturales ejercen presiones de selección diferenciales. La selección artificial promueve la fijación de la diversidad varietal en función de los objetivos de mejora. La variación en la forma y el color de los frutos, o en sus características organolépticas son, en gran parte, consecuencia de la acción selectiva del agricultor sobre mutaciones naturales (Harlan, 1992). Gracias al proceso continuo de mejora, estas variedades, están adaptadas a las condiciones locales de clima, suelo, plagas, enfermedades y condiciones locales. Además, muestran una mayor adaptación a las condiciones de cultivo de la agricultura ecológica, ya que han sido seleccionadas en la agricultura tradicional, con bajo aporte de insumos externos, buscando su adaptación a las condiciones edafoclimáticas y

de patógenos locales. La acción selectiva, intencionada o no, del agricultor en ambientes específicos contribuye, pues, a generar variedades o razas locales, base de las variedades tradicionales. Se trata, siguiendo el criterio de Mansholt, de "variedades con una alta capacidad para tolerar estreses bióticos y abióticos, que proporcionan una gran estabilidad para el rendimiento y una producción media en un sistema agrícola de bajos insumos" (Zeven, 1999).

2.1.2. Diversidad

La adaptación de las variedades locales a diferentes condiciones agroclimáticas de cultivo, a veces condiciones extremas, ha sido posible gracias a la diversidad genética existente dentro de ellas. Eso las hace ser una fuente de variabilidad para la mejora, con la ventaja añadida de pertenecer al acervo genético primario, por lo que suelen poseer el síndrome de domesticación completo, es decir, carecen de genes indeseables para el cultivo que se dan en las formas silvestres y mantienen una considerable variabilidad genética (Carrillo et al., 2010). Los cultivos primitivos se fueron extendiendo desde sus lugares de origen, transportados por migraciones primero y rutas comerciales después, encontrándose condiciones diversas de clima, suelo, vegetación y otros factores ambientales. De esta forma, las poblaciones de plantas cultivadas evolucionaron de forma diferente, acumulando mutaciones favorables según las características de las nuevas zonas y las distintas prácticas agrícolas utilizadas y, en numerosos casos, se produjeron intercambios de genes o hibridaciones con las especies silvestres de las nuevas localidades (Jarvis y Hodgkin, 2003). El resultado de esta acción del hombre y de la selección natural, ha sido el establecimiento de una diversidad vegetal constituida por un enorme número de variedades y genotipos locales, caracterizados por su adaptación a las necesidades humanas y al medio ambiente.

Las variedades locales constituyen los reservorios más cercanos de genes "útiles" para la mejora genética vegetal. En ellas se encuentran los genes que han sido seleccionados por los agricultores, o por la naturaleza, por su adaptación, productividad o resistencia a diferentes estreses (Zeven, 1998). La arquitectura genética de estas variedades se caracteriza no sólo por sus genes sino por sus combinaciones de genes o haplotipos. Mediante el cruzamiento no intencionado entre variedades se produce recombinación de información genética que genera nuevas combinaciones de genes. Esta recombinación es muy clara en especies alógamas pero sucede también en especies autógamias si el lapso temporal es suficientemente largo. La selección permite elegir aquellas que confieren elevadas prestaciones a las correspondientes variedades. Así surgen valiosas combinaciones de genes después de un largo proceso de cultivo.

En España la variada orografía y las distintas condiciones climáticas han propiciado la adaptación de los cultivares a múltiples condiciones agroclimáticas y, como consecuencia, la generación de una gran cantidad de variedades tradicionales. Se puede afirmar que España es el país europeo con mayor diversidad agrí-

cola, un acervo cultural, genético y económico de gran valor. Se pueden poner como ejemplo el trigo (Ruiz et al., 2007, 2012) y la cebada (Harlan, 1957; Yahiaoui et al., 2008), de los cuales existe tal cantidad y diversidad de entradas españolas que los colocan en una posición única en cuanto a representación completa de la diversidad genética de grandes cultivos de una gran zona ecogeográfica a nivel europeo. La existencia de numerosas publicaciones y catálogos nacionales de variedades tradicionales demuestran esta gran riqueza (Aguiriano et al., 2006; Álvarez y Lasa, 1987, 1990; Carrera, 1998; Carravedo, 2006; Carravedo y Mallor, 2007 y 2008; Carravedo y Ruiz de Galarreta, 2005; Carravedo et al., 2005; 2011; Castell y Díez, 2000; Pérez de la Vega et al. 1994; Lasa et al., 2001; Moreno y Trujillo, 2006; Moreno et al., 2010; Nuez et al., 1996a; 1996b; 1998a; 1998b; 1999; 2000a; 2000b; 2000c; 2001a; 2001b; 2001c; Ochoa y Carravedo, 1999, Pereira et al., 2002; Ruiz de Galarreta y Álvarez, 1990; 2001; Sánchez-Monge, 1962).

Además, existe un número importante de trabajos que ponen de manifiesto la elevada diversidad existente entre las variedades locales españolas de diversas especies, tanto a nivel morfológico como molecular. Algunos de estos trabajos más recientes incluyen especies como la cebolla (Mallor et al., 2014), la judía (Lázaro et al., 2013), el tomate (Cebolla-Cornejo et al., 2013), el melón (Escribano et al., 2012), el calabacín (Formisano et al., 2012), el manzano (Urrestarazu, 2012), el peral (Miranda et al., 2010), el castaño (Pereira-Lorenzo, 2010), el almendro (Fernández i Martí et al., 2009), el cerezo (Wünsch y Hormaza, 2004), el manzano (Pina et al., 2014), la cebada (Yahiaoui et al., 2014), el trigo duro (Ruiz et al., 2013), o el guisante (Martín-Sanz, 2011).

2.1.3. Casos de estudio

Para que sea sostenible la recuperación del cultivo de una variedad local es necesario buscarle una salida económica. Las puestas en valor locales, las denominaciones de origen y otras muchas formas de buscar un nicho de mercado son parte importante de este tipo de conservación. En España, existen múltiples ejemplos de valorización de cultivares autóctonos, algunos de ellos se detallan a continuación:

2.1.3.1. Berenjena de Almagro

Un ejemplo de valorización de cultivares autóctonos es el de la berenjena de Almagro (*Solanum melongena* L.). En la comarca del Campo de Calatrava se cultiva esta variedad tradicional para la elaboración de encurtidos, siendo la única variedad de berenjena reconocida en Europa con una Indicación Geográfica Protegida. Es una berenjena con muy buena consistencia, pero con el inconveniente de que presenta una menor productividad y una mayor espinosidad que otras berenjenas de encurtido, como la berenjena andaluza de encurtido. Por ello, la recolección resulta costosa, así como su comercialización. Durante los últimos años, se han llevado a cabo trabajos de caracterización, selección y mejora genética de la berenjena de

Almagro encaminados a la puesta en valor de esta variedad tradicional (Prohens et al., 2009; 2013). Los resultados obtenidos indican que la berenjena de Almagro presenta características morfológicas y genéticas que la distinguen del resto de variedades de berenjena. Asimismo, los altos valores de contenido en polifenoles indican que presenta un alto valor nutracéutico, lo cual le confiere un valor añadido. Por otra parte, la diversidad existente en esta variedad ha hecho posible la selección de una línea pura con mayor producción y baja espinosidad. Este estudio muestra que mediante la caracterización, selección y mejora genética se puede mejorar el valor de las variedades locales (Hurtado et al., 2013).

2.1.3.2. Cebolla Dulce de Fuentes

La cebolla Dulce de Fuentes es una variedad autóctona aragonesa, que goza de gran prestigio por sus cualidades organolépticas, caracterizándose principalmente por su escaso picor. Recientemente, esta cebolla ha conseguido la Denominación de Origen Protegida "D.O.P. Cebolla Fuentes de Ebro", que es el nombre que reciben las cebollas cultivadas, elaboradas, almacenadas y envasadas en 6 municipios de la zona de Fuentes de Ebro (Zaragoza, España), de la variedad "Cebolla Dulce de Fuentes", también llamada "Cebolla Blanca gruesa de Fuentes", inscrita en el Catálogo Común de Variedades de Especies de Plantas Hortícolas. Esta variedad ha sido seleccionada y conservada tradicionalmente por los propios agricultores. Estudios realizados con este material vegetal pusieron de manifiesto su heterogeneidad, particularmente en el nivel de picor, y la necesidad de iniciar un programa de selección con esta variedad (Mallor et al., 2008). La variabilidad encontrada probablemente se deba al carácter alógamo de la especie, que se ha podido cruzar con otras variedades al no haberse tomado las debidas precauciones de aislamiento en su multiplicación. De este modo, se parte de una variedad tradicional de prestigio que es preciso depurar para obtener un producto que siga los estándares de la demanda actual, principalmente en lo referente a uniformidad de forma, tamaño y nivel de picor, pero que mantenga sus características históricas. El programa se inició con material vegetal procedente de los agricultores locales, aplicando métodos de selección masal y genealógica (Mallor et al., 2011; 2012). Como resultado de este programa de selección, se ha conseguido una semilla seleccionada y de calidad, que ha sido transferida al Consejo Regulador de la D.O.P. para realizar los ensayos demostrativos en campo.

2.1.3.3. Melocotón de Calanda

El Melocotón de Calanda procede de la variedad población autóctona "Amarillo tardío" y sus clones seleccionados 'Jesca', 'Evaisa' y 'Calante', cultivados en la zona suroriental de la depresión del Ebro entre las provincias de Teruel y Zaragoza. En su producción se emplea la técnica tradicional del embolsado individual de los frutos en el árbol, el cual se realiza entre los meses de junio y julio, debiendo permanecer la bolsa de papel parafinado hasta el momento de la manipulación, protegiendo de esta forma al producto de tratamientos, caídas y plagas. Las con-

diciones geográficas y climáticas de esta zona del Bajo Aragón, hacen que se produzca un fruto dulce, consistente y carnoso. El fruto es acondicionado, envasado y transformado en la zona de producción. La producción de este singular fruto aparece ya descrita en documentos medievales bajo la denominación de *présec* o *priscos*. En 1895 el botánico J. Pardo Sastrón realiza una descripción de la producción del "Melocotón de Calanda". La expansión de este cultivo, originario de árboles autóctonos, se inició en los años 50 coincidiendo con el tradicional embolsado del fruto, con un incremento máximo de superficie en las décadas de los años 70 y 80, donde se llegaron a rozar las 3.000 Has. Desde 1999, el Melocotón de Calanda está reconocido con el aval de la Denominación de Origen, siendo muy valorado entre los consumidores.

2.1.3.4. Cerezas del Jerte

Estas cerezas son el resultado de un largo proceso de selección clonal a partir de dos estirpes locales de *Prunus avium* L., de fruto rojo y fruto negro, y de sus cruzamientos o combinaciones sucesivas. La Denominación de Origen Protegida ampara bajo su aval de garantía exclusivamente cerezas frescas para mesa originarias de la demarcación geográfica de la zona del Valle del Jerte principalmente.

Los frutos obtenidos pertenecen en su mayor parte al grupo de las "Picotas" o cerezas que físicamente tienen como diferencia esencial la de desprender de forma natural el pedúnculo en el momento de la recolección, sin que ello suponga una merma de la calidad o reste resistencia a las manipulaciones y a la vida útil del producto. La firmeza de la pulpa es un aspecto muy importante en la determinación de la calidad ya que permite conocer si la cereza ha sido recolectada en el momento óptimo. El sabor, aporta las características diferenciadoras principales a las cerezas del Jerte, tanto por su alto contenido en azúcares, como por la equilibrada relación existente entre azúcares y acidez. Las cerezas amparadas por la Denominación de Origen Cereza del Jerte, pertenecen exclusivamente a las variedades 'Navalinda', 'Ambrunés', 'Pico Limón Negro', 'Pico Negro' y 'Pico Colorado'.

2.1.3.5. Trigo Aragón 03

La variedad de trigo Aragón 03 fue directamente seleccionada en los años 40 del siglo pasado en la granja de Ejea (Zaragoza), por D. Manuel Gadea, a partir de la variedad local Catalán de Monte (Sánchez-García et al., 2012; Magdalena Ruiz, comunicación personal). Existen estimaciones de que, al menos entre 1951 y 1973, fue la principal variedad de trigo panadero cultivada en España, ocupando entre un 18 y un 30% de la superficie total dedicada a este cultivo (Pujol-Andreu, 2011, y las fuentes citadas en él). Fue desplazada paulatinamente por otras variedades más modernas y su cultivo declinó en los años 80 del siglo pasado. Existe un dato más reciente, de la campaña 1987-88, que indica que aún se cultivaba al menos sobre un 3% de la superficie nacional (Carrillo et al., 1988). Los motivos de su éxito, y también de su declive, están bien resumidos en la descripción que hizo de la va-

riedad Jordana de Pozas (1950): "tiene la capacidad de producir gran número de espigas, tolera la sequía y tiene buena adaptación a los suelos pobres y las fluctuaciones climáticas... Sin embargo, con buena fertilización y agua abundante tiende al encamado, por lo que otras variedades más productivas son preferidas en esas condiciones".

No obstante, la variedad Aragón 03 continuó siendo utilizada minoritariamente en la zona monegrina de Zaragoza. El interés del trigo Aragón 03 se ha reavivado recientemente por su buen comportamiento en secanos semiáridos, por su alto rendimiento de harina, buena calidad panadera y el alto contenido en proteína de la harina, aunque ésta no sea de la mejor calidad (Vallejo Acevedo et al., 1969; Carrillo et al., 1988). La historia de su recuperación en el siglo XXI, impulsada por Juan José Marcén, fue recogida por Germán (2000), y se resume también en la web de la empresa (www.ecomonegros.com) que comercializa los productos de panadería y repostería realizados con la harina producida a partir de este trigo.

2.1.3.6. Cebada Albacete

Es curioso que la descripción agronómica del trigo Aragón 03 se ajuste como un guante a la cebada 'Albacete', aunque se trate de una especie distinta. La sorprendente similitud apunta a la presencia de adaptaciones convergentes en los dos cultivos, sometidos a las mismas condiciones ambientales durante siglos o, probablemente, milenios. La cebada 'Albacete' fue obtenida en la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza) durante los años 50 del siglo pasado por el Prof. D. Enrique Sánchez-Monge, también a partir de una variedad local, dentro de un estudio exhaustivo de cientos de variedades locales españolas. Esta variedad fue la más cultivada en España durante décadas. Se estima que a mediados de los años 80 del siglo pasado aún ocupaba más de un millón de hectáreas (Prieto, 1985, citado por Lasa y Romagosa, 1988) y que el beneficio económico total para la agricultura española había sido, ya en 1982, de unos 50.000 millones de pesetas o cerca de 900 millones de euros en valor actual (Lasa y Romagosa, 1988). Todavía al borde del siglo XXI, esta variedad ocupaba el 28% (93.000 ha) de la superficie dedicada a la cebada en Aragón (DGA, 2002), y aún hoy no ha desaparecido completamente, por lo que su longevidad ha superado el medio siglo, un hito notable para una variedad de cereal.

2.2. Las variedades tradicionales en España

2.2.1. Procedencia

Tradicionalmente, la agricultura ha respondido a los retos de la seguridad alimentaria aprovechando al máximo los recursos disponibles, cultivando un máximo de especies, ocupando todo tipo de terrenos y aprovechando todas las épocas del año (Lasanta, 1990).

Un resultado de este proceso son los huertos, que aún encontramos en muchas zonas de nuestro territorio, donde se han desarrollado especies y variedades tradicionales durante décadas en sistemas primitivos de agricultura, bien adaptados a su medio ambiente, a las condiciones culturales y económicas y en equilibrio con su entorno (García-Ruiz, 1988). Así, la selección efectuada por los agricultores durante generaciones ha dado lugar a una gran diversidad de material vegetal que constituye un importante patrimonio genético.

Nikolai Ivanovitch Vavilov fue el gran pionero del estudio sistemático de los recursos fitogenéticos y comprendió y explicó su variedad a la luz de los postulados de la teoría evolutiva, durante la primera mitad del siglo XX. Introdujo los conceptos de centros de origen (lugar de domesticación) y diversidad (zonas de radiación adaptativa, a nivel varietal) de los cultivos (Vavilov, 1951). Los centros de origen y diversidad indican dónde hay que dirigirse en primer lugar para formar colecciones o para buscar algún carácter concreto. Al realizar un programa de mejora genética, las posibilidades de éxito están en función tanto del material de partida como de la elección del método apropiado. Una eficaz prospección de la variación disponible y del conocimiento de los lugares en que podemos encontrarla facilitará sin duda el programa de mejora. Por ello, la formación, mantenimiento y estudio de colecciones resulta esencial para futuras obtenciones vegetales. Además, la erosión genética ha eliminado gran parte de la riqueza de recursos fitogenéticos existente en el mundo. De ahí que sea tan importante salvar dicha riqueza para el futuro, siendo la primera labor a realizar la exploración a fondo de los centros de diversidad.

La cuenca mediterránea se considera centro primario para las especies de altramuces (*Lupinus albus*, *angustifolius*, *luteus*), lechuga, zanahoria, rábano, ajos, cebolla y otros *Allium*, condimentos (comino, hinojo, perejil), anís, verdolaga, forrajeras (*Lolium* spp., tréboles, alpiste, fleo, vezas), drogas (belladona, digital, regaliz, mandrágora), rosa (*R. gallica*, *damascena*, *alba*), narcisos, clavel y alhelí. Esta zona mediterránea comparte varias especies con la del Próximo oriente (de Egipto al Cáucaso y Persia), con la que terminó formando una unidad cultural. Además, la cuenca Mediterránea se considera centro secundario de numerosos frutales, incluyendo cítricos, y de muchas hortícolas (Cubero, 2003).

La cuenca mediterránea es, según Vavilov, una de las diez regiones principales de diversidad de plantas cultivadas del planeta. No son muchas las especies originadas en esta zona, pero sí es ésta un importante centro secundario de diversificación genética debido a las múltiples culturas que a lo largo de la historia han pasado dejando su huella en la agricultura (Vellvé, 1992). El territorio peninsular, por su gran variedad física, económico-productiva y sociocultural, contiene la mayor biodiversidad de toda Europa. En el caso de las especies hortícolas, debido a la gran diversidad agroclimática del país, a las variadas influencias culturales y al cultivo en pequeños huertos familiares, se ha generado una enorme variabilidad genética. Es decir, las variedades locales tradicionales no solo contienen la herencia

de una diversidad genética importante, sino la peculiaridad histórica y cultural de esta región contenida en su agricultura (Díaz del Cañizo et al., 1998).

2.2.2. Dónde se conservan

Desde mitad del siglo XX todos los países tomaron conciencia de la necesidad de recolectar y preservar sus recursos genéticos, tanto de plantas cultivadas como silvestres, antes de que la acelerada erosión que estaba sufriendo el planeta hiciera imposible esta actividad. La FAO inició en Roma en 1946 las primeras discusiones sobre recursos genéticos vegetales y desde entonces, especialmente por actividades de la FAO y de *Bioversity International* (anteriormente IPGRI y IBPGR), también ubicado en Roma, se ha avanzado hasta la organización de un sistema mundial para la conservación y la utilización de los recursos fitogenéticos (van Sloten y Holle, 1988).

Durante los años 70 y 80 se realizaron numerosos viajes de recolección y se establecieron bancos de germoplasma en un gran número de países, de modo que en 1996 había en el Mundo unos 1.300 bancos que conservaban más de 6 millones de entradas (FAO, 1996). Nuestro país no fue ajeno a este movimiento y, desde que se iniciaron en España las actividades de recolección de recursos fitogenéticos, las colecciones mantenidas en los banco de germoplasma han aumentado de forma espectacular.

En España, la iniciativa más importante a nivel nacional es el Programa de Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos (PCURF) creado en 1993, gestionado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), que se desarrolla a través de Planes de Actuación mediante convocatorias de proyectos. A los efectos de este plan, se entiende por recursos fitogenéticos autóctonos aquellos de carácter agrícola cuyo centro de origen o dispersión está en España y también los de aquellas plantas que por su prolongado cultivo durante generaciones han originado una variabilidad genética en las condiciones agroclimáticas de nuestro país. En este contexto, durante los últimos años se han considerado líneas prioritarias la prospección, recogida, multiplicación y conservación de estos recursos fitogenéticos autóctonos o de importancia socioeconómica de especies agrícolas, y silvestres emparentadas, en riesgo de extinción todavía no recolectados, en particular los de especies menores y en desuso y los existentes en zonas marginales para su cultivo. Todo este material vegetal se encuentra conservado *ex situ* en los bancos de germoplasma de la red, como se verá más adelante.

El citado Programa de Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos (PCURF) tiene por objetivos: 1) evitar la pérdida de diversidad genética de las especies, variedades y ecotipos vegetales autóctonos y cultivables en desuso cuyo potencial genético sea susceptible de ser empleado en los procesos de mejora de especies vegetales agroalimentarias, agroenergéticas, agroindustriales y ornamentales y 2) caracterizar y documentar los recursos para facilitarlos a los potenciales

usuarios. Simultáneamente, este programa creó el Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF), asignándole la función de centro de documentación de los recursos fitogenéticos de la Red de Colecciones del PCURF. Siguiendo este mandato, el CRF mantiene y actualiza periódicamente el Inventario Nacional (IN) con los datos de pasaporte de las entradas conservadas *ex situ* en las colecciones de la Red, y desde el año 2000 lo publica a través de la web del INIA. La información proporcionada por los diferentes bancos españoles de germoplasma se estandariza y procesa en el CRF para su incorporación en el IN. Cada entrada se identifica por un número de inventario (NC), único e intransferible para cada registro aunque el material esté conservado en más de un banco con diferentes códigos.

Actualmente, el IN recoge información de 67.606 entradas conservadas en 34 instituciones españolas y pertenecientes a 990 géneros y 3.745 especies. Si bien una elevada proporción de estas entradas son de origen español (66,9% en total), hay entradas de 138 países. La mayor parte de las entradas (51%) corresponden a variedades locales, siguiéndole en importancia el grupo de las silvestres (30,3%) (Fajardo y De la Rosa, 2010). Estas entradas están disponibles para investigadores y usuarios en general en las condiciones descritas en la propia página web.

Aunque tradicionalmente los esfuerzos de conservación de los recursos fitogenéticos se han centrado en la conservación *ex situ*, en la actualidad se está potenciando a su vez la conservación *in situ*, que incluye la conservación en finca. La conservación en finca consiste en el mantenimiento o recuperación del cultivo de variedades locales en su zona de origen. Esta modalidad de conservación implica la gestión sostenible de la diversidad genética de las variedades tradicionales, desarrolladas localmente por el agricultor, junto a especies silvestres y leñosas, en sistemas tradicionales de agricultura. La conservación en finca es, en definitiva, la recuperación del cultivo de variedades locales en el lugar en que se desarrollaron sus características específicas y dentro de una agricultura sostenible. Las ventajas de esta conservación incluyen la continuidad de la evolución natural, dado que la conservación *ex situ* congela el proceso evolutivo de estas variedades, y la conservación de especies pertenecientes a los ecosistemas agrícolas junto con los cuales han evolucionado las plantas cultivadas. La conveniencia de mantener estas variedades locales, pero manteniendo al mismo tiempo el proceso adaptativo, justifica el coste y la laboriosidad de la conservación en finca. Otra alternativa es la mejora genética de las propias variedades locales. La mejora participativa, como se verá más adelante, es una buena opción para el mantenimiento de las variedades locales en sus lugares de cultivo.

2.2.3. Causas de desuso

Hasta fechas relativamente recientes la diversidad de las plantas cultivadas se ha mantenido e incrementado de forma eficaz en los ecosistemas agrarios. Sin embargo, desde hace 200 años, como consecuencia del desarrollo agrícola e industrial y la progresiva unificación de hábitos culturales y alimenticios, el número de cul-

tivos y la heterogeneidad dentro de los mismos han ido descendiendo progresivamente y, en la actualidad, no se cultivan más de 150 especies con fines alimenticios, de las cuales sólo doce representan más del 70% del consumo humano, siendo cuatro especies (maíz, arroz, trigo y patatas) las que constituyen el 60% de los alimentos (Esquinas-Alcázar, 2006).

Esta biodiversidad agrícola se ha visto gravemente afectada durante el siglo XX, desapareciendo más del 75% de las variedades tradicionales utilizadas en la agricultura a nivel mundial (FAO, 1998). Las causas de esta pérdida han sido diversas, pero de acuerdo con el Estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo, publicado por la FAO, la causa principal es la sustitución de las variedades locales por variedades modernas. Dado que en los campos de los agricultores se sustituyen las variedades más antiguas por otras nuevas, la erosión genética se produce frecuentemente porque los caracteres encontrados en las variedades de los agricultores no se encuentran presentes en su totalidad en las variedades modernas. Además, con frecuencia, el elevado número de variedades existentes se reduce cuando se introducen variedades comerciales en sistemas de cultivo tradicionales. Otras causas de la erosión genética comprenden el surgimiento de nuevas plagas, malas hierbas y enfermedades, el deterioro ambiental, la urbanización y el desbrozo de tierras, mediante la deforestación y la quema de matorrales (FAO, 2009). Esta pérdida es más grave en especies de propagación vegetativa, como la mayoría de los frutales, en las que la desaparición de una variedad local puede suponer la pérdida definitiva de variantes genéticas únicas. En menor medida, la erosión genética es también grave en cultivos de estructura genética tan fragmentada como los hortícolas. Es menos grave, sin embargo, en cultivos extensivos, en los que los cruzamientos entre estirpes de zonas geográficas diversas han frenado la pérdida de diversidad. En este sentido, cabe pensar que la mecanización tardía del campo español retrasó la adopción de variedades modernas de cultivos extensivos, que resultaban más aptas para las labores mecanizadas. Este retraso sin duda alargó la vida de las variedades locales lo suficiente para que fueran recolectadas por los investigadores que ya empezaban a darse cuenta del valor de los recursos fitogenéticos, a lo largo de la primera mitad del siglo XX. Pero este pudo no ser el único motivo de la larga vida de las variedades locales de cultivos extensivos. Los mejoradores de finales del siglo XIX y principios del XX intentaron introducir variedades de otros orígenes europeos, directamente o en cruzamientos, con escaso éxito en comparación con las variedades locales. Este hecho fue citado por Pujol-Andreu (2011), quien se hace eco de fuentes originales de la época. Aventurándose en el terreno de la especulación, estas referencias sugieren que los síndromes de adaptación de las variedades locales posiblemente tenían una causa poligénica y eran difíciles de capturar a través de esquemas simples de mejora.

Sin embargo, la pérdida de diversidad se acentuó en general entre los años 1940-50, cuando el desarrollo imparables de la mejora dio lugar a variedades pro-

ductivas, uniformes y más adaptadas a las técnicas modernas de cultivo y a los nuevos sistemas de comercialización, siendo incuestionable el beneficio obtenido de ello por una población mundial creciente y subalimentada. La consecuencia paradójica es que la aplicación masiva de los logros de la mejora vegetal ha puesto en marcha un proceso que destruye los materiales esenciales de abastecimiento de los propios mejoradores de plantas. De este modo, la pérdida de variabilidad genética supone una limitación de la capacidad de responder a nuevas necesidades y un incremento de la vulnerabilidad de nuestros cultivos frente a cambios ambientales o aparición de nuevas plagas o enfermedades. Esta pérdida de variedades tradicionales, con las valiosas combinaciones de genes que contienen, así como de poblaciones silvestres de plantas, fuentes potenciales de genes de interés, produce un empobrecimiento irrecuperable del patrimonio genético español que es preciso conservar.

2.3. Utilidad para la mejora genética y la producción sostenible

2.3.1. Colecciones nucleares

Dada la diversidad genética que existe en España (o en la Península Ibérica), es sorprendente el escaso desarrollo de colecciones nucleares que faciliten su estudio. No es el propósito de este capítulo la revisión del concepto y la utilidad de las colecciones nucleares. Esto se ha llevado a cabo en un libro anterior de esta serie, al que remitimos (Igartua y Ruiz, 2010). La construcción de colecciones nucleares tiene un doble fin, científico y práctico. El interés científico radica en la necesaria sistematización de un área de estudio que ofrece la posibilidad de desentrañar y comprender los mecanismos evolutivos y selectivos que han dado forma a los cultivos actuales. Las lecciones aprendidas se podrán proyectar hacia el futuro y aplicar a la nueva mejora que se necesita para adaptar los cultivos al cambio climático. El interés práctico de los recursos fitogenéticos locales como puntal de la seguridad alimentaria es evidente. La riqueza de recursos fitogenéticos de nuestro país supone una fortaleza científica y económica, a la espera del crecimiento de un tejido investigador insuficiente, y de iniciativas ambiciosas que sean capaces de explotarla. La riqueza de la diversidad genética española es una fuente de seguridad alimentaria, desarrollo científico y estímulo económico de primera magnitud. Nuestro país debería aprovechar la riqueza de la diversidad fitogenética española para convertir su estudio y explotación en una de sus máximas prioridades, con un claro potencial de situarse en vanguardia de un área de importancia estratégica mundial. En este sentido, las iniciativas de desarrollo de colecciones nucleares, actualmente potenciadas desde el CRF-INIA, son el paso inicial necesario para emprender ese camino.

En la literatura, aparecen bien documentadas colecciones nucleares de cebada (Igartua et al., 1998), judía (Rodiño et al., 2003), trigo duro (Ruiz et al., 2013), olivo (Belaj et al., 2012) y almendro (Socias i Company et al., 2011). Estas colecciones se

están empleando ya en estudios científicos y agronómicos y también se usan en programas de mejora, como el cribado de la colección de judía para búsqueda de resistencia a oídio (Trabanco et al., 2012) o el trabajo de búsqueda de resistencia a enfermedades en la colección de cebada (Silvar et al., 2011).

2.3.2. Acceso a la diversidad con herramientas genómicas

El uso de la diversidad genética de las variedades locales se ha visto afectado por el fenómeno conocido como carga genética, o sea, el arrastre de genes que confieren características negativas junto con los responsables de los caracteres favorables. Casi con seguridad, esas características favorables están bajo control genético de un conjunto de genes distribuidos por todo el genoma de cada especie. A medida que la mejora moderna refina las variedades, se van fijando complejos de genes que es fácil romper cuando se introduce germoplasma muy distinto, como puede ser el de las variedades locales antiguas. Es por esto que se acuñó en el Reino Unido el ya viejo aforismo de los mejoradores que dice "*cross the best by the best and hope for the best*". La existencia de estos complejos de genes, fijados bien por el proceso de domesticación y diseminación de las especies, bien por la mejora moderna, dificulta la obtención de buenos resultados en la mejora cuando se cruzan parentales alejados. En estos casos, los cruzamientos combinan muchos genes favorables y desfavorables, con lo que la probabilidad de obtener variedades mejoradas en poblaciones de progenies del tamaño que pueden manejar los mejoradores disminuye dramáticamente. Por este motivo, los mejoradores suelen ser muy prudentes e incluso remisos a la hora de incorporar variedades locales al germoplasma élite en sus programas de selección. En este sentido, han proliferado en las últimas décadas los programas de pre-mejora, que persiguen una incorporación gradual de las características favorables de materiales alejados del programa, como suelen ser las variedades locales. En estos programas, primero se intenta identificar donantes de caracteres favorables y luego se transfieren esas características a materiales con mejor comportamiento agronómico, antes de introducirlas en material élite (Shimelis y Laing, 2012).

Las tecnologías actuales de marcadores moleculares y de secuenciación, unido a la existencia de genomas de referencia para un número creciente de especies, facilitan un acceso cada vez más preciso a casi cualquier parte del genoma (Feuillet et al., 2011). Los programas de pre-mejora son unos de los grandes beneficiarios de estas tecnologías, por el incremento de precisión en la identificación y transferencia de material genético y también por la aceleración de los procesos.

2.3.3. Uso directo

Aunque la utilización de las variedades locales tiene un protagonismo principal en la mejora genética, existen otras posibilidades de uso en otras actividades como la agricultura ecológica, los cultivos de proximidad y mercados locales, los huertos lúdicos o urbanos y también para su utilización como alimentos funcionales.

2.3.3.1. Agricultura ecológica

En todos los sistemas de agricultura de bajos insumos, entre los que se incluye la agricultura ecológica, se emplean pocos fitoquímicos y las resistencias a patógenos dependen en mucha mayor medida de los mecanismos genéticos de las variedades. Es un hecho reconocido desde hace tiempo que las variedades heterogéneas (mezclas, multilíneas, poblaciones) presentan claras ventajas para el control de las enfermedades de los cultivos. De hecho, las variedades locales, allí donde todavía existen, presentan frecuentemente diversidad genética relacionada con resistencias a distintos patógenos (Finckh, 2008). Sin embargo, no se ha progresado demasiado en la adopción de variedades heterogéneas por los problemas económicos inherentes a su desarrollo y mantenimiento (Finckh, 2008), aunque la gran atención que están recibiendo actualmente los métodos de mejora evolutiva y participativa, como se verá más adelante, pueden ayudar a que resurja el interés sobre ellas.

La mejora participativa puede tener un nicho en la obtención de variedades adaptadas a las prácticas conocidas como "agricultura ecológica". Los productores que han adoptado estas prácticas de cultivo se quejan del problema que supone la falta de semillas y variedades adaptadas a sus necesidades. En países como Francia, agrupaciones de productores han tornado a la mejora participativa como la fuente de variedades para la agricultura ecológica (Chable et al., 2014), especialmente para aprovechar el potencial de obtener productos diferenciados y adaptados al medio ambiente específico. Los esquemas de mejora participativa óptimos para cada especie y lugar variarán en función de parámetros genéticos, socioeconómicos y legislativos.

2.3.3.2. Cultivos de proximidad y mercados locales

La preservación y puesta en valor del patrimonio genético relacionado con las variedades vegetales locales, pueden ser la base de obtención de productos alimentarios de calidad y valor diferencial con interés para el ciudadano, así como de génesis de estructuras de negocio que apoyen la diversificación de fuentes de ingresos en el medio rural. Lo importante no es tanto la diferenciación de la producción, como encontrar nuevos productos para estos mercados en los que las empresas locales puedan mantener sus ventajas competitivas. El interés radica en que aportan ventajas medioambientales, económicas, y sociales para las zonas rurales y las ciudades donde se ubican (Varquez-Barquero, 2009). El caso de los 'Farmer's markets' del Reino Unido han sido ampliamente estudiados. En un trabajo realizado por The Countryside Agency (2001), tras analizar 18 mercados del sureste de Inglaterra, se concluye que estos mejoran los ingresos de los productores, refuerzan la economía agraria, apoyan a la agricultura familiar, mantienen empleos en el medio rural, crean nuevas oportunidades empresariales, favorecen la producción de alimentos en armonía con el medio ambiente, rompen el aislamiento de los agricultores al aumentar el contacto directo con el consumidor, y aumentan la

vitalidad de los centros de las ciudades. El consumidor aprecia una información alternativa a la actual sobre los alimentos, y acude a estos Mercados pensando en su salud, pero también le mueven otras razones más solidarias como la preservación del medio ambiente o los bajos precios que perciben los productores de los intermediarios (Mauleón, 2010)

2.3.3.3. Huertos lúdicos urbanos

Lo mismo sucede con los huertos urbanos, que han ido ganado importancia y adquirido nuevas características relacionadas tanto con la soberanía alimentaria, la calidad de los productos que consumimos y la generación de empleo, como con la mejora de la calidad de vida, la educación ambiental, las relaciones sociales, la transformación social y la regeneración urbana (Zaar, 2011). Las personas interesadas en los huertos lo están a menudo también en el modelo alimentario, y buscan modos de tener acceso a alimentos frescos, ecológicos y de calidad.

2.3.3.4. Alimentos funcionales

La creciente demanda de los consumidores por alimentos con mayores contenidos en compuestos fitoquímicos está estimulando el desarrollo de programas de mejora para el contenido en compuestos bioactivos, denominados fitoquímicos cuando se encuentran en los vegetales, cuya presencia permite considerar a los alimentos que los contienen como funcionales. Las variedades modernas suelen tener una base genética reducida por lo que los mejoradores suelen recurrir a materiales que presenten una mayor diversidad genética (Prohens, 2014). A este respecto, entre las variedades tradicionales es posible encontrar una amplia variación en el contenido en compuestos fitoquímicos, con valores muy superiores a los de las variedades comerciales (Rodríguez-Burruezo et al., 2005; Prohens et al., 2007).

2.4. Métodos de mejora

Los métodos tradicionales de mejora empleados en cada especie son también apropiados para la mejora empleando variedades locales. No obstante, hay tres métodos que merece la pena destacar por ser especialmente adecuados al trabajo con estos materiales: el retrocruzamiento asistido por marcadores, la mejora evolutiva y la mejora participativa.

El retrocruzamiento asistido por marcadores es el mejor método para incorporar características favorables controladas por pocos genes, eliminando caracteres desfavorables aportados por el resto del genoma. Como ejemplos, se pueden citar trabajos en cebada, encaminados a transferir la características de bajo requerimiento de vernalización, procedente de una variedad local española, a una variedad de invierno (Casao et al., 2011), o la incorporación simultánea de resistencias a tres virus distintos en la variedad de tomate Muchamiel (García-Martínez et al., 2011).

La mejora participativa intenta paliar el problema, que se da ocasionalmente, de la escasa adopción de las variedades mejoradas por parte de los productores. Este rechazo se debe a una falta de adaptación de las variedades obtenidas por mejora tradicional, debido a la falta de selección de adaptaciones específicas, una evaluación insuficiente a nivel de explotaciones agrícolas, y poca implicación del usuario final (Morris y Bellon, 2004). La mejora participativa se planteó a finales del siglo pasado, como un proceso en el que se integraran los criterios de científicos y agricultores y la selección en centros experimentales y en explotaciones (Witcombe et al., 1996). Esta iniciativa surgió como una manera de responder a necesidades de países en desarrollo, para condiciones relativamente adversas, en las que la mejora tradicional no terminaba de tener el impacto deseado (Haugerud y Collinson, 1990). La novedad esencial de este método es tener en cuenta las preferencias de los agricultores sobre ensayos realizados en sus propios ambientes, en el ensayo más realista posible en cuanto a las condiciones finales de producción (Ceccarelli et al., 2000).

Los mejoradores de plantas y los agricultores tienen ventajas comparativas que pueden contribuir a definir las divisiones funcionales de trabajo en la mejora de los recursos fitogenéticos. Los mejoradores tienen la ventaja del acceso a una amplia gama de diversidad genética y al conocimiento científico y los métodos para trabajar con eficacia en el aprovechamiento del germoplasma mejorado. Los agricultores pueden seleccionar material para sus medios particulares y para unas necesidades de mercado especiales. El mejoramiento participativo, con la intervención de los agricultores de manera más directa en el proceso de mejora, puede aumentar el éxito de éste para los sistemas agrícolas complejos en medios cuyas condiciones son más diversas y marginales. Estos métodos exigen a los agricultores llevar su labor de mejora hasta el final, seleccionando material en las fincas en función de sus propias necesidades (FAO, 1996).

Este método se ha empleado mucho en ICARDA, para sus cultivos de cebadilla, cebada y leguminosas, con resultados prometedores. Los métodos de mejora participativa están bien descritos en un buen número de publicaciones (por ejemplo, Ceccarelli, 2012), como las citadas en estos párrafos, a las que remitimos a los interesados en los detalles técnicos. La mejora participativa puede despertar suspicacias por la confianza puesta en el criterio de personas no formadas en el método científico. Sin embargo, bien aplicado, con investigadores estrictos y competentes al cargo, el método se aprovecha de ciertas ventajas que lo hacen particularmente apropiado para condiciones adversas y agricultura de subsistencia. Una de las desventajas de la mejora tradicional en esas condiciones es la presencia de un gran componente de interacción genotipo por ambiente, difícilmente capturable en programas de mejora clásicos, incluso con las redes de ensayos más extendidas. El modelo descentralizado de la mejora participativa es más favorable para que las redes de ensayos sean realmente tupidas y representativas, por lo que se podría modelizar mejor la interacción genotipo por ambiente y aumentar la eficiencia de

la selección. Por otro lado, es un método con dos ventajas claras sobre la mejora convencional. Por un lado, los usuarios finales adquieren un fuerte vínculo con las variedades que ayudan a seleccionar, facilitando su adopción. Este proceso se ve facilitado y acelerado aún más si el propio esquema de mejora incorpora también las fases iniciales de un sistema de producción de semillas por parte de los agricultores. Por otro lado, el modelo final de variedad es flexible: la mejora participativa se puede orientar hacia líneas puras o mezclas de líneas en autógamias, y hacia poblaciones de polinización cruzada o híbridos en alógamas (Ceccarelli y Grando, 2007). Sin embargo, existe el peligro de que las variedades heterogéneas que se produzcan no puedan protegerse amparadas en la legislación actual en la mayoría de países, que suelen exigir requisitos de distinción, homogeneidad y estabilidad que difícilmente podrán cumplir (Morris y Bellon, 2004).

La mejora participativa ha saltado ya a todo tipo de cultivos y zonas geográficas, y hay muchos ejemplos de su uso en distintas especies y sistemas agrícolas. Como ejemplos ilustrativos y exitosos se pueden citar el sorgo en Nicaragua (Trouche et al., 2012) y la berenjena en España (Hurtado et al., 2014), precisamente para la denominación "berenjena de Almagro" mencionada más arriba. Este último artículo, de hecho, sirve para ilustrar la utilidad de este método en una agricultura desarrollada y en un contexto de producciones elevadas. Los propios autores indican que "el enfoque que hemos utilizado también puede ser utilizado como un modelo para la mejora de otras variedades locales de cultivos de hortalizas", opinión con la que estamos de acuerdo.

Aunque parece muy apropiada para cubrir ciertos nichos que la mejora convencional había dejado al margen, aún hay pocos datos para saber si su práctica llevará a obtener mejores variedades para esos nichos u otros de una manera económicamente eficiente.

La mejora evolutiva es un término antiguo, ya acuñado por Suneson (1956), que describe un proceso similar a la selección en masa (en "bulk") de Nilsson-Ehle (1908), y que ha sido recuperado recientemente (Murphy et al., 2005). Consiste en dejar que la selección natural actúe sobre poblaciones segregantes creadas entrecruzando un conjunto de líneas, asumiendo que el éxito reproductivo (*fitness*) coincide con buenas características agronómicas. Este enfoque tuvo un éxito importante en las poblaciones compuestas de cebada (Harlan y Martini, 1929; Allard, 1990), fuente de gran cantidad de variedades durante décadas (Finckh, 2008). El interés sobre este método ha renacido, al igual que por la mejora participativa, por la necesidad de encontrar variedades con adaptaciones a nichos específicos, mal cubiertos por la mejora convencional. Murphy et al. (2005) abogan por la combinación de los métodos de mejora evolutiva y participativa para obtener variedades adaptadas para la agricultura de bajos insumos en general, y para la agricultura orgánica en particular, que hace 10 años englobaba aproximadamente 1,4 millones de personas. Estos mismos autores proponen imitar el trabajo pionero de las poblaciones compuestas de la cebada, planteando la síntesis de "variedades

locales modernas", mediante el cruzamiento de mezcla de variedades con caracteres favorables sobre las que se proceda a seleccionar localmente, con el concurso de mejoradores y agricultores.

El método de la mejora evolutiva aplicado a las variedades locales también resulta interesante desde otros dos puntos de vista: la adaptación al cambio global (Joshi et al., 2001) y la mejora para resistencia a estreses bióticos.

Como bien describen Ceccarelli et al. (2013), el cambio climático es un blanco móvil al que conviene afrontar con estrategias de mejora que favorezcan la existencia de sistemas dinámicos y eficientes de respuesta. La mejora participativa aplicada a conjuntos de variedades locales ofrece la posibilidad de aumentar la producción en las explotaciones agrícolas mediante la explotación de adaptaciones específicas, aumentando al mismo tiempo la diversidad biológica agrícola. De hecho, estos mismos autores preconizan la integración de la mejora participativa con la mejora evolutiva como el modelo principal de mejora a adoptar por los centros del CGIAR (*Consultative Group for International Agricultural Research*).

2.5. Marco legal

Para poder comercializar semillas de una variedad o producir semillas con fines de comercialización, según el artículo 5 de la ley 30/2006 de semillas, plantas de vivero y recursos fitogenéticos, es un requisito indispensable su inscripción en el Registro de variedades comerciales.

De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura de la Plantas Cultivadas, una variedad comercial puede ser:

- Variedad comercial seleccionada (cultivar seleccionado o cultivar de obtentor), que es la obtenida como resultado de trabajos de selección.
- Variedad comercial local (cultivar local), es la que procede de una región geográfica claramente definida, que en ensayos oficialmente comprobados ha demostrado poseer suficiente uniformidad, estabilidad y caracteres distintivos para permitir su identificación, pero que no ha sido obtenida como resultado de trabajos controlados de selección.
- Variedad de conservación, es, sin perjuicio de lo previsto en el artículo 3.5. de la ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos, aquella variedad local adaptada de forma natural a las condiciones locales y regionales y, amenazadas por la erosión genética.
- Variedad de especie hortícola desarrollada para ser cultivada en condiciones determinadas es, aquella variedad de especie hortícola sin valor intrínseco para la producción comercial, pero desarrollada para su cultivo en condiciones agro-técnicas, climatológicas o edafológicas determinadas (También llamadas "variedades de aficionado").

En general, son pocas las variedades tradicionales que cumplen los requisitos de distinción, uniformidad y estabilidad necesarios para su registro como Variedades Comerciales. Por ello, la ley 30/2006 describe una serie de excepciones referentes a la producción y comercialización de las "variedades de conservación" y las "variedades de aficionado". El Real Decreto 170/2011, que desarrolla el título II de la ley 30/2006, establece que la admisión de las solicitudes de inscripción de variedades de conservación queda condicionada a que la misma tenga un interés para la conservación de los recursos fitogenéticos y que haya sido tradicionalmente cultivada en localidades y regiones amenazadas por la erosión genética. Para determinar el interés de la conservación de la variedad, así como las localidades y regiones donde la variedad ha sido tradicionalmente cultivada, se tendrá en cuenta la información del Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos y de las comunidades autónomas. Las solicitudes deberán aportar información de la región o regiones en la que históricamente se haya cultivado y a las que se encuentra adaptada de forma natural. Además, se deberá de adjuntar, si se dispone de ello, la descripción de la variedad de conservación y su denominación, características y requisitos de calidad sólo en el caso de especies agrícolas, así como los resultados de pruebas no oficiales y los conocimientos adquiridos con la experiencia práctica del cultivo, la reproducción y la utilización, así como otros datos en particular los aportados por el Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos o por las comunidades autónomas. No se llevará a cabo el examen oficial para variedades de conservación y para variedades de especies hortícolas desarrolladas para su cultivo en condiciones determinadas, si se considera suficiente la documentación aportada. La admisión de una solicitud de variedades de especies hortícolas desarrollada para su cultivo en condiciones determinadas, queda condicionada a que el solicitante demuestre que la misma no tiene valor intrínseco para la producción comercial.

El Reglamento Técnico de Control de la Producción y Comercialización de Plántones de Hortalizas y Material de Multiplicación de Hortalizas distinto de semillas, adopta una serie de excepciones que abren la posibilidad de comercializar plántones de variedades tradicionales como medida encaminada a la conservación genética. En el Apartado 1 del Artículo 7 establece que los materiales de multiplicación y los plántones de hortalizas sólo podrán ser comercializados por proveedores autorizados y siempre que cumplan los requisitos establecidos en el artículo 4. Sin embargo, el apartado 1 no se aplicará, siempre que se cumpla lo dispuesto en el Real Decreto 2071/1993, a los materiales de multiplicación de hortalizas y plántones de hortalizas destinados a uno o varios de los fines siguientes:

- a) Pruebas o fines científicos
- b) Labores de selección
- c) Medidas encaminadas a la conservación de la diversidad genética

Actualmente, en el catálogo nacional de variedades comerciales y protegidas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, hay registradas 43 variedades de conservación y 26 sin valor intrínseco. Las especies registradas son:

berenjena (1), cebolla (1), col forrajera o berza (1), col-repollo (1), judía de enrame (12), judía de mata baja (5), lechuga (1), maíz (5), nabicol (1), patata (8), patata andígena (9), patata chaucha (1), pimiento (4), repollo (1), sandía (1), tomate (16) y zanahoria de mesa (1) (MAGRAMA, 2014).

2.6. Referencias

- Aguiriano E, Ruiz M, Fité R, Carrillo JM. 2006. Analysis of genetic variability in a sample of the durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Spanish collection based on gliadin markers. *Gen. Resour. Crop Evol.* 53: 1543-1552.
- Allard RW. 1990. *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EE UU.
- Alvarez A, Lasa JM. 1990. Populations of maize from Cantabria. I. Morphological evaluation and variability. *An. Est. Exper. Aula Dei* 20: 41-49.
- Alvarez A, Lasa J M. 1987. Asturian populations of maize. I. Morphological-vegetative description and variability. *An. Est. Exper. Aula Dei* 18: 177-186.
- Belaj A, Dominguez-García M, Atienza SG, Martín-Urdiroz N, De la Rosa R, Satovic Z, Martín A, Kilian A, Trujillo I, Valpuesta V, Del Río, C. 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DARts, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Gen. Genomes* 8: 365-378.
- Carravedo M. 2006. Variedades autóctonas de tomate de Aragón. Gobierno de Aragón, Zaragoza, España.
- Carravedo M, Mallor C. 2007. Variedades autóctonas de cebollas españolas. Gobierno de Aragón, Zaragoza, España.
- Carravedo M, Mallor C. 2008. Variedades autóctonas de legumbres españolas. Gobierno de Aragón, Zaragoza, España.
- Carravedo M, Ruiz de Galarreta JI. 2005. Variedades autóctonas de tomate del País Vasco. Gobierno Vasco, Vitoria, España.
- Carravedo M, Ochoa MJ, Gil R. 2005. Catálogo genético de pimientos autóctonos. Gobierno de Aragón, Zaragoza, España.
- Carravedo M, Mallor C, Garcés A. 2011. Evaluación morfológica y molecular de variedades autóctonas aragonesas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y especies silvestres emparentadas (*Lactuca* spp.). Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza, España.
- Carrera M. 1998. Variedades y calidad de las manzanas de Aragón. APEPH (Asociación profesional de empresarios de productos hortofrutícolas de la provincia de Zaragoza), Zaragoza, España.
- Carrillo JM, Rodríguez de Quijano A, Galiano A, Hamie B, Vázquez JF, Orellana J. 1988. Composición de gluteninas de alto peso molecular de variedades de trigo blando registradas en España y su relación con la calidad panadera. *An. Estac. Exper. Aula Dei* 19: 239-250.
- Carrillo JM, Díez-Niclós MJ, Pérez de la Vega M, Nuez F. 2010. Los Recursos Fitogenéticos en la Mejora Genética Vegetal. En: Carrillo JM, Díez MJ, Pérez de la vega M, Nuez F (eds.) *Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: Nuevos Avances en la Conservación y Utilización de los Recursos Fitogenéticos*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España. pp. 9-49.
- Casao MC, Igartua E, Karsai I, Bhat PR, Cuadrado N, Gracia MP, Lasa JM, Casas AM. 2011. Introgression of an intermediate VRNH1 allele in barley (*Hordeum vulgare* L.) leads to reduced vernalization requirement without affecting freezing tolerance. *Mol. Breed.* 28: 475-484.

- Castell V, Díez MJ. 2000. Colección de semillas de cebolla del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana. Monografías INIA: Agrícola Nº 8, Madrid, España.
- Cebolla-Cornejo J, Roselló S, Nuez F. 2013. Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces. *Scientia Hort.* 162: 150-164.
- Ceccarelli S. 2012. Landraces: Importance and Use in Breeding and Environmentally Friendly Agronomic Systems. En: *Agrobiodiversity Conservation: Securing the Diversity of Crop Wild Relatives and Landraces*. CAB International. Oxford, Reino Unido. pp 103-117.
- Ceccarelli S, Grando S. 2007. Decentralized-participatory plant breeding: an example of demand driven research. *Euphytica* 155: 349-360.
- Ceccarelli S, Grando S, Tutwiler R, Baha J, Martini AM, Salahieh H, Goodchlid M, Michael M. 2000. A methodological study on participatory barley breeding I. Selection phase. *Euphytica* 111: 91-104.
- Ceccarelli S, Galie A, Grando S. 2013. Participatory Breeding for Climate Change-Related Traits. En: Kole C (ed.) *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops*, vol. 1. Concepts and Strategies. Springer, Berlin Heidelberg, Alemania. pp. 331-376.
- Chable V, Dawson J, Bocci R, Goldringer I. 2014. Seeds for Organic Agriculture: Development of Participatory Plant Breeding and Farmers' Networks in France. En: Bellon S, Pervern S (eds). *Organic Farming, Prototype for Sustainable Agricultures*. Springer, Holanda. pp. 383-400.
- Cubero JI. 2003. *Introducción a la Mejora Genética Vegetal*. Mundi Prensa, Madrid, España.
- Díaz del Cañizo MA, Guzmán Casado GI, Soriano Niebla JJ, Álvarez Fables N. 1998. Recuperación de variedades tradicionales locales de cultivos y del conocimiento a ellas asociado, para su conservación, uso y manejo en las comarcas de Antequera (Málaga) y Estepa (Sevilla). III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Una alternativa para el mundo rural del tercer milenio. Valencia, Septiembre 21-26. pp 333-342.
- Diputación General de Aragón. 2002. Encuestas productivas de cultivos herbáceos de invierno. Campaña 1999-2000. Departamento de Agricultura del Gobierno de Aragón. http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Estadisticas_agrarias/Estadisticas_agricolas/Encuestas_Productivas/ENCUESTAS_CULTIVOS_HERBACEOS_INVIERNO_1999_2000.pdf
- Escribano S, Lázaro A, Cuevas HE, López-Sesé AI, Staub JE. 2012. Spanish melons (*Cucumis melo* L.) of the Madrid provenance: A unique germplasm reservoir. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 359-373.
- Esquinas-Alcázar JT. 2006. Una apuesta por el futuro agrícola, alimentario y medioambiental. *Ambienta* 57: 14-20.
- Fajardo J, De la Rosa L. 2010. El Inventario Nacional de Recursos Fitogenéticos. Estado actual y últimas incorporaciones. *Actas Hort.* 55: 23-24.
- FAO. 1996. Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos en el Mundo. FAO, Roma, Italia.
- FAO. 1998. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Roma, Italia.
- FAO. 2009. Draft second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Roma, Italia.
- Fernández i Martí A, Alonso JM, Espiau MT, Rubio-Cabetas MJ, Socias i Company R. 2009. Genetic diversity in Spanish and foreign almond germplasm assessed by molecular characterization with simple sequence repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134: 535-542.
- Feuillet C, Leach JE, Rogers J, Schnable PS, Eversole K. 2011. Crop genome sequencing: lessons and rationales. *Trends Plant Sci.* 16: 77-88.
- Finckh MR. 2008. Integration of breeding and technology into diversification strategies for disease control in modern agriculture. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 399-409.

- Formisano G, Roig C, Esteras C, Ercolano MR, Nuez F, Monforte AJ, Picó MB. 2012. Genetic diversity of Spanish *Cucurbita pepo* landraces: An unexploited resource for summer squash breeding. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 1169-1184.
- García-Ruiz, JM. 1988. La evolución de la agricultura de montaña y sus efectos sobre la dinámica del paisaje. *Rev. Estud. Agrosoc.* 146: 7-37.
- García-Martínez S, Grau A, Alonso A, Rubio F, Valero M, Ruiz JJ. 2011. UMH 1200, a breeding line within the Muchamiel tomato type resistant to three viruses. *HortScience* 46: 1054-1055.
- Germán C. 2000. El Proyecto Marcén y el rescate del trigo Aragón 03. La Fertilidad de la Tierra: *Rev. Agric. Ecol.* 2: 24-27.
- Harlan JR. 1992. *Crops and man*. American Society of Agronomy, Inc., and Crop Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, EE UU.
- Harlan HV. 1957. *One Man's Life with Barley*. Exposition Press, New York, EE UU.
- Harlan HV, Martini ML. 1929. A composite hybrid mixture. *J. Amer. Soc. Agron.* 21: 487-490.
- Harlan JR. 1975. Our vanishing genetic resources. *Science* 188: 618-621.
- Haugerud A, Collinson MP. 1990. Plants, genes and people: improving the relevance of plant breeding in Africa. *Exper. Agric.* 26: 341-362.
- Hurtado M, Vilanova S, Plazas M, Gramazio P, Andújar I, Herraiz FJ, Castro A, Prohens J. 2014. Enhancing conservation and use of local vegetable landraces: the Almagro eggplant (*Solanum melongena* L.) case study. *Genet. Resour. Crop Evol.* 61: 787-795.
- Hurtado M, Vilanova S, Plazas M, Gramazio P, Herraiz FJ, Andújar I, Castro A, Prohens J. 2013. Puesta en valor de la berenjena de Almagro a través de la caracterización y la mejora genética. VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas. Madrid, 26-29 Agosto 2013.
- Igartua E, Ruiz M. 2010. Colecciones nucleares. En: Carrillo JM, Díez MJ, Pérez de la Vega M, Nuez F (eds.). *Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: Nuevos Avances en la Conservación y Utilización de los Recursos Fitogenéticos*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España. pp. 581-608.
- Igartua E, Gracia MP, Lasa JM, Medina B, Molina-Cano JL, Montoya JL, Romagosa I. 1998. The Spanish barley core collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 45: 475-481.
- Jarvis DI, Hodgkin T. 1999. Wild relatives and crop cultivars: detecting natural introgression and farmer selection of new genetic combinations in agroecosystems. *Mol. Ecol.* 8: 159-173.
- Jordana de Pozas J. 1950. *Mapa Agronómico Nacional*. Comarca de Zaragoza, Tomo III, Madrid, Ministerio de Agricultura, Madrid, España.
- Joshi J, Schmid B, Caldeira MC, Dimitrakopoulos PG, Good J, Harris R, Hector A, Huss-Danell H, Jumpponen A, Minns A, Mulder CPH, Pereira S, Prinz A, Scherer-Lorenzen M, Siamantziouras ASD, Terry AC, Troumbis AY, Lawton JH. 2001. Local adaptation enhances performance of common plant species. *Ecol. Letters* 4: 536-544.
- Lasa JM, Igartua E, Ciudad FJ, Codesal P, García EV, Gracia MP, Medina B, Romagosa I, Molina-Cano JL, Montoya JL. 2001. Morphological and agronomical diversity patterns in the Spanish barley core collection. *Hereditas* 135: 217-225.
- Lasa JM, Romagosa I. 1988. Mejora de cebadas para secanos españoles en la Estación Experimental de Aula Dei. *An. Estac. Exper. Aula Dei* 19: 265-268.
- Lasanta Martínez T. 1990. Diversidad de usos e integración espacial en la gestión tradicional del territorio en las montañas de Europa occidental. En: García Ruiz JM (ed). *Geología de las áreas de montaña*. Geofoma, Logroño, España. pp 235-266.

- Lázaro A, Villar B, Aceituno-Mata L, Tardío J, De la Rosa L. 2013. The Sierra Norte of Madrid: An agrobiodiversity refuge for common bean landraces. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60: 1641-1654.
- MAGRAMA, 2014. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente <http://www.magrama.gob.es/app/regVar/default.aspx>
- Mallor C, Arnedo-Andrés MS, Garcés-Claver A. 2014. Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers. *Scientia Hort.* 170: 24-31.
- Mallor C, Balcells M, Mallor F, Sales E. 2011. Genetic variation for bulb size, soluble solids content and pungency in the Spanish sweet onion variety Fuentes de Ebro. Response to selection for low pungency. *Plant Breed.* 130: 55-59.
- Mallor C, Llamazares A, Gutiérrez M, Carravedo M, Mallor F. 2008. Comportamiento del material vegetal de Cebolla Fuentes de Ebro: inicio de un Programa de Mejora Genética. *Actas Hort.* 51: 329-330.
- Mallor C, Sales E. 2012. Yield and traits of bulb quality in the Spanish sweet onion cultivar 'Fuentes de Ebro' after selection for low pungency. *Scientia Hort.* 140: 60-65.
- Martin-Sanz A, Caminero C, Jing R, Flavell AJ, De la Vega MP. 2011. Genetic diversity among Spanish pea (*Pisum sativum* L.) landraces, pea cultivars and the world *Pisum* sp. core collection assessed by retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIPs). *Span. J. Agric. Res.* 9: 166-178.
- Mauleón JR. 2010. Mercados de Agricultores en España: Diagnóstico y Propuesta de Actuación. CEDDAR: DT 23 (2010-5).
- Miranda C, Urrestarazu J, Santesteban LG, Royo JB, Urbina V. 2010. Genetic diversity and structure in a collection of ancient Spanish pear cultivars assessed by microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135: 428-437.
- Moreno J, Trujillo I. 2006. Variedades tradicionales de cerezo (*Prunus avium* L.) del Valle del Jerte (Cáceres): prospección, caracterización e identificación morfológica y molecular. Monografías INIA Agrícola, nº 19, Madrid, España.
- Moreno MM, Meco R, Villena J, Mancebo I. 2010. Tomates tradicionales de Castilla-La Mancha. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Junta de Comunidades de Castilla La Mancha, Toledo, España.
- Morris ML, Bellon MR. 2004. Participatory plant breeding research: opportunities and challenges for the international crop improvement system. *Euphytica* 136: 21-35.
- Murphy K, Lammer D, Lyon S, Carter B, Jones SS. 2005. Breeding for organic and low-input farming systems: An evolutionary-participatory breeding method for inbred cereal grains. *Renew. Agric. Food Syst.* 20: 48-55.
- Nuez F, Campo PG, Fernández de Córdoba P, Soler S, Valcárcel JV. 1999. Colección de semillas de coliflor y brócoli. Monografías INIA-Agrícola, Nº 1, 120 pp. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, España.
- Nuez F, Díez MJ, Ruiz JJ, Fernández de Córdoba P, Costa J, Catalá MS, González JA, Rodríguez A. 1998. Catálogo de semillas de pimiento. Monografías INIA, Nº 105, Madrid, España.
- Nuez F, Díez MJ, Picó B, Fernández de Córdoba P. 1996. Catálogo de semillas de tomate. Monografías INIA Nº 95, 177 pp. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA); Madrid, España.
- Nuez F, Fernández de Córdoba P, Soler S, Valcárcel JV. 2000. Colección de semillas de lechuga del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana. Monografías INIA: Agrícola Nº 7, Madrid, España.
- Nuez F, Leiva-Brondo M, Valcárcel JV, Soler S. 2001. Colección de semillas de acelga del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana. Monografías INIA: Agrícola Nº 10, Madrid, España.

- Nuez F, Prohens J, Iglesias A, Fernández de Córdoba P. 1996. Catálogo de semillas de melón. Monografías INIA Nº 96, Madrid, España.
- Nuez F, Prohens J, Rodríguez A, González JA, Fernández de Córdoba P. 1998. Catálogo de semillas de sandía. Monografías INIA, Nº 106, Madrid, España.
- Nuez F, Prohens J, Valcárcel JV, Fernández de Córdoba P. 2001. Colección de semillas de berenjena del Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Monografías INIA: Agrícola Nº 11, Madrid, España.
- Nuez F, Ruiz JJ, Valcárcel JV, Fernández de Córdoba P. 2000. Colección de semillas de calabaza del Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Monografías INIA: Agrícola Nº 4, Madrid, España.
- Nuez F, Soler S, Fernández de Córdoba P, Valcárcel JV. 2001. Colección de semillas de col-repollo del Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Monografías INIA: Agrícola Nº 12, Madrid, España.
- Nuez F, Valcárcel JV, Fernández de Córdoba P, Castell V. 2000. Colección de semillas de otras especies hortícolas del Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Monografías INIA: Agrícola Nº 5, Madrid, España.
- Ochoa MJ, Carravedo M. 1999. Catálogo de semillas de tomate autóctonos. Diputación General de Aragón. Zaragoza, España.
- Pereira S, Asacasibar-Errasti J, Ramos Cabrer AM, Piñeiro-Andion J. 2002. Colección de cultivares autóctonos gallegos de manzano del Banco de Germoplasma de Mabegondo. Monografías INIA Agrícola, nº 9, Madrid, España.
- Pereira-Lorenzo S, Costa RML, Ramos-Cabrer AM, Ribeiro CAM, Da Silva MFS, Manzano G, Barreneche T. 2010. Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree Genet. Genomes* 6: 701-715.
- Pérez de la Vega M, Sáenz-de-Miera LE, Allard R W. 1994. Ecogeographical distribution and differential adaptedness of multilocus allelic associations in Spanish *Avena sativa* L. *Theor. Appl. Gen.* 88: 56-64.
- Pina A, Urrestrarazu J, Errea P. 2014. Analysis of the genetic diversity of local apple cultivars from mountainous areas from Aragón (Northeastern Spain). *Scientia Hort.* 174: 1-9.
- Prohens J, Muñoz-Falcón JE, Rodríguez-Burruezo A, Ribas F, Castro A, Nuez F. 2009. 'H15', an Almagro-type pickling eggplant with high yield and reduced prickliness. *HortScience* 44: 2017-2019.
- Prohens J. 2014. Mejora genética de la calidad nutracéutica en hortalizas. *Actas Hort.* 65: 26-32.
- Prohens J, Rodríguez-Burruezo A, Raigón MD, Nuez F. 2007. Total phenolics concentration and browning susceptibility in a collection of different varietal types and hybrids of eggplant: implications for breeding for higher nutritional quality and reduced browning. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132: 638-646.
- Prohens J, Whitaker BD, Plazas M, Vilanova S, Hurtado M, Blasco M, Gramazio P, Stommel JR. 2013. Genetic diversity in morphological characters and phenolic acids content resulting from an interspecific cross between eggplant, *Solanum melongena*, and its wild ancestor (*S. incanum*). *Ann. Appl. Biol.* 162: 242-257.
- Pujol-Andreu J. 2011. Wheat varieties and technological change in Europe, 19th and 20th centuries: New issues in economic history. *Historia Agraria* 54: 71-103.
- Rodiño AP, Santalla M, De Ron AM, Singh SP. 2003. A core collection of common bean from the Iberian peninsula. *Euphytica* 131: 165-175.
- Rodríguez-Barruezo A, Prohens J, Roselló S, Nuez F. 2005. "Heirloom" varieties as sources of variation for the improvement of fruit quality in greenhouse-grown tomatoes. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80: 453-460.

- Ruiz de Galarreta JI, Alvarez A. 1990. Guipuzcoan populations of maize. I. Morphological evaluation and correlation between quantitative traits. *An. Estac. Exper. Aula Dei* 20: 27-39.
- Ruiz de Galarreta JI, Alvarez A. 2001. Morphological classification of maize landraces from northern Spain. *Genet. Resour. Crop Evol.* 48: 391-400.
- Ruiz M, Aguiriano E, Fité R, Carrillo JM. 2007. Combined use of gliadins and SSRs to analyse the genetic variability of the Spanish collection of cultivated diploid wheat (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*). *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 1849-1860.
- Ruiz M, Giraldo P, Royo C, Carrillo JM. 2013. Creation and validation of the Spanish durum wheat core collection. *Crop Sci.* 53: 2530-2537.
- Ruiz M, Giraldo P, Royo C, Villegas D, Aranzana MJ, Carrillo JM. 2012. Diversity and genetic structure of a collection of Spanish durum wheat landraces. *Crop Sci.* 52: 2262-2275.
- Sánchez-García M, Alvaro F, Martín-Sánchez JA, Sillero JC, Escribano J, Royo C. 2012. Breeding effects on the genotype × environment interaction for yield of bread wheat grown in Spain during the 20th century. *Field Crops Res.* 126: 79-86.
- Sánchez-Monge E. 1962. Razas de maíz en España. Ministerio de Agricultura, Madrid, España.
- Shimelis H, Laing M. 2012. Timelines in conventional crop improvement: pre-breeding and breeding procedures. *Aust. J. Crop Sci.* 6: 1542-1549.
- Silvar C, Casas AM, Kopahnke D, Habekuß A, Schweizer G, Gracia MP, Lasa JM, Ciudad FJ, Molina-Cano JL, Igartua E, Ordon F. 2010. Screening the Spanish barley core collection for disease resistance. *Plant Breed.* 129: 45-52.
- Socias i Company R, Alonso JM, Espiau M, Kodad O, Fernández i Martí A, Avanzato D, Bacchetta L, Botta R, Drogoudi P, Duval H, Metzidakis I, Rovira M, Silva A, Solar A, Spera D. 2011. The definition of the European almond core collection. *Acta Hort.* 912: 445-448.
- The Countryside Agency. 2001. Farmers' markets in the south-east of England: their economic, environmental and social performance. *Res. Notes. CRN* 37.
- Trabanco N, Pérez-Vega E, Campa A, Rubiales D, Ferreira JJ. 2012. Genetic resistance to powdery mildew in common bean. *Euphytica* 186: 875-882.
- Trouche G, Lançon J, Aguirre Acuña S, Castro Briones B, Thomas G. 2012. Comparing decentralized participatory breeding with on-station conventional sorghum breeding in Nicaragua: II. Farmer acceptance and index of global value. *Field Crops Res.* 126: 70-78.
- Urrestarazu J, Miranda C, Santesteban LG, Royo JB. 2012. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. *Tree Genet. Genomes* 8: 1163-1180.
- Valilov NI. 1951. The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants (traducido por K. Starr Chester). The Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., and Stechert-Hafner Inc., New York, EE UU.
- Vallejo Acevedo JM, De Plaza Pérez S, Salto Andreu M, García Olmedo F. 1969. La calidad tecnológica de los trigos cultivados en España. Cosecha 1968. Grupo Nacional Harinero del Sindicato de Cereales, publicación n. 11, pp. 1-107.
- Van Sloten DH, Holle M. 1988. Temperate fruit genetic resources and the IBPGR. *HortScience* 23: 73-74.
- Vázquez-Barquero A. 2009. Desarrollo local, una estrategia para tiempos de crisis. *Universitas Forum*, Vol. 1, N° 2.
- Vellvé R. 1992. Saving the Seed. Genetic diversity and European agriculture. Earthscan, London, Reino Unido.
- Witcombe JR, Joshi A, Joshi KD, Sthapit BR. 1996. Farmer participatory crop improvement. I. Varietal selection and breeding methods and their impact on biodiversity. *Exper. Agric.* 32: 445-460.

- Wünsch A, Hormaza I. 2004. Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51: 635-641.
- Yahiaoui S, Cuesta Marcos A, Gracia MP, Medina B, Lasa JM, Casas AM, Ciudad FJ, Montoya JL, Moralejo M, Molina-Cano JL, Igartua E. 2014. Spanish barley landraces outperform modern cultivars at low-productivity sites. *Plant Breed.* 133: 218-226.
- Yahiaoui S, Igartua E, Moralejo M, Ramsay L, Molina-Cano JL, Ciudad FJ, Lasa JM, Gracia MP, Casas AM. 2008. Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barleys. *Theor. Appl. Genet.* 116: 271-282.
- Zaar MH. 2011. Agricultura urbana: algunas reflexiones sobre su origen e importancia actual. *Biblio 3w: revista bibliográfica de geografía y ciencias sociales*, vol 16.
- Zeven AC. 1998. Landraces: A review of definitions and classifications. *Euphytica* 104: 127-139.
- Zeven AC. 1999. The traditional inexplicable replacement of seed and seed wares of landraces and cultivars: a review. *Euphytica* 110: 181-191.

3 Las variedades transgénicas

José Ignacio Cubero

Departamento de Genética, ETSIAM. Universidad de Córdoba

3.1. Cultivos transgénicos: caracteres y superficies

3.1.1. Cultivos y caracteres

3.1.2. Superficies

3.2. Los métodos clásicos y las tendencias

3.2.1. La evolución de los métodos "clásicos"

3.2.2. Las nuevas técnicas

3.2.2.1. Técnicas enfocadas a mutagénesis dirigida

3.2.2.2. Variantes de las técnicas de transformación

3.2.2.3. Técnicas para conseguir "segregantes no MG"

3.2.2.4. Un comentario final sobre los nuevos métodos de Mejora

3.3. ¿Biotecnología o mejora clásica?

3.3.1. Un falso dilema

3.3.2. Lo que hay que saber sobre una variedad transgénica

3.3.3. El coste de obtención

3.4. La polémica

3.4.1. Consideraciones previas

3.4.2. Los argumentos

3.4.3. La coexistencia

3.5. Normativa sobre variedades transgénicas

3.6. Problemas adicionales

3.7. Europa contra el mundo

3.8. Referencias

3.1. Cultivos transgénicos: caracteres y superficies

Tras ya más de quince años de cultivo de variedades transgénicas en todo el mundo parece absurdo describir las técnicas de obtenerlas, algo que se puede encontrar en cualquier libro reciente de Mejora de Plantas o en alguno de los muchos dedicados al tema a causa, sobre todo, de la estéril polémica en torno a ellos. Parece lógico, pues, dedicar este capítulo a una puesta al día en cuanto a métodos novedosos que buscan o mayor eficacia o escapar de la negativa situación europea, así como a exponer brevemente la normativa actual, si bien, en lo que a esta concierne, no se debe dar por definitivo lo que aquí se diga, pues como toda normativa requiere una lectura continua de los textos legales nacionales e internacionales.

3.1.1. Cultivos y caracteres

Los cuatro cultivos principales siguen siendo maíz, soja, algodón y colza. Pero la nómina se ha alargado no sólo con cultivos extensivos sino con hortícolas, industriales y ornamentales.

La resistencia a herbicidas sigue siendo el carácter más ampliamente representado en las variedades actuales, existiendo plantas transgénicas con resistencia a varios herbicidas. Los genes de resistencia o tolerancia proceden fundamentalmente de bacterias, petunia y *Arabidopsis*. En explotación comercial se encuentran variedades de soja, colza, maíz, remolacha, alfalfa y algodón.

La resistencia a plagas, aunque aún en segundo lugar, registra un crecimiento notable con la inclusión de nuevos genes y la incorporación de dos o más en la misma variedad. No todo es ya de *Bacillus thuringiensis*, si bien la notable bacteria, conocida por sus propiedades insecticidas desde comienzos del siglo XX (fueron la base de insecticidas naturales llamados a veces *ecoinsecticidas* al no ser *tóxicos para otros organismos*) sigue siendo la principal fuente de proteínas insecticidas. Una limitación es que las proteínas *Bt* confieren resistencia a lepidópteros, a bastantes coleópteros y a algunos dípteros pero no, por ejemplo, a grupos temibles como hemípteros y ortópteros. Los portadores de genes *cry* ("Bt") son, especialmente, el algodón al gusano rosado y el maíz al taladro (tales como las variedades transgénicas de maíz en cultivo en España desde abril de 1998); en 1999 se aprobó en la India una berenjena Bt obtenida con tecnología propia y se ha comercializado un maíz dulce Bt en los EEUU; también, con limitada difusión hasta ahora, la patata (al escarabajo) y en fases tempranas tomate, soja y remolacha. Los genes *cry* se han modificado en laboratorio para conseguir la máxima especialización sobre los insectos diana. Brasil, con tecnología propia, ha lanzado al cultivo una variedad de judía resistente al gorgojo.

Aunque menos extendida, la resistencia a enfermedades conoció un éxito temprano en el caso de resistencias de la papaya al virus que estuvo a punto de sepultar el cultivo en Hawái; en las Canarias tales variedades están prohibidas, por lo que la papaya ha de cultivarse en invernaderos a prueba de insectos transmisio-

res del virus, con un coste añadido que repercute en su contra en el mercado mundial. La misma técnica se ha utilizado para patata (enrollamiento de la hoja), calabacín, calabaza, tomate, pimiento, soja (mosaico), alfalfa, trébol blanco (mosaico) y albaricoquero (*sharka*). Genes de proteínas antibacterianas como cecropinas y lizozimas se encuentran entre los candidatos a la transferencia.

Los híbridos comerciales de colza "doble cero" ("canola") representan el tercer carácter en importancia en los cultivos actuales: una tercera parte de la superficie mundial de colza está sembrada de colza transgénica. El procedimiento (destrucción de las células del tapete mediante un gen quimérico y su anulación por otro gen en la línea restauradora) podría ser teóricamente general pero hay que ponerlo a punto en cada especie. Dignas de mención son las variedades híbridas de arroz obtenidas por mejoradores chinos con tecnología propia, como también consiguieron maíz con fitasa para alimentación de cerdos, que eliminan los muy contaminantes fitatos.

Los productos industriales y farmacéuticos han estado siempre presentes en el campo de la ingeniería genética. De hecho, el primer producto comercializado fue, como bien se sabe, la insulina humana, única existente en el mercado en la actualidad. La industria farmacéutica ha producido además una gran cantidad de materias activas y de excipientes cuya lista es ya innecesaria; de la secuenciación del genoma humano se espera un gran avance en el desarrollo de la llamada *farmacogenómica*.

Una actividad relacionada, con frecuencia en las mismas manos que la producción de medicinas, es la aplicación de la ingeniería genética a la industria, en particular en la alimentaria. Numerosos microorganismos transgénicos producen las enzimas utilizadas en detergentes, los aditivos y colorantes alimentarios, y productos hasta ahora tradicionales como el cuajo para el queso (con la ventaja de eliminar el riesgo de la transmisión de la encefalopatía espongiforme o mal de las "vacas locas").

La utilización de microorganismos ha dado paso al de la producción de productos industriales y farmacéuticos en plantas superiores (*bioreactores*). Es conocida asimismo la aprobación de la patata "Amflora", aprobada incluso en la UE como fuente de almidón industrial (una deficiencia legal, que no afecta a los aspectos científicos, en la tramitación ha hecho que, recientemente, se suspenda su cultivo) y la de plásticos biodegradables con genes bacterianos. La insulina posiblemente se obtenga en el próximo futuro de plantas como el tabaco en lugar de en bacterias. La obtención de *vacunas orales* es un hecho, si bien la idea original de que fuera el mismo producto agrícola el que sirviera para "vacunar" al comerlo, está dando paso, dada la dificultad de dosificación por medio de la ingesta, a su utilización como fuente industrial de la que obtener la materia activa. Desde 1995 en que se obtuvo tabaco con la vacuna contra la hepatitis B, la *agricultura farmacológica* ("biopharming", "molecular pharming") ha progresado en consecuciones;

valgan los casos tempranos de la enterotoxina termolábil de *E. coli* en patata (1998), al virus Norwalk en tabaco y patata (1999-2001); desde el 2002, se han conseguido vacunas contra hepatitis B, Norwalk, cólera, tétanos y a distintas cepas de *E. coli* toxi y patogénicas en tabaco, patata, lechuga, maíz, tomate, zanahoria y banana

Asimismo en relación con lo dicho se encuentra la obtención de variedades con mayor calidad nutritiva. El "arroz dorado", capaz de sintetizar β -carotenos y de aliviar el grave problema de ceguera total o parcial infantil en el Extremo Oriente, se consiguió transfiriendo cuatro genes procedentes de bacterias y plantas superiores, es el ejemplo más espectacular, al haber introducido toda una cadena de síntesis en una especie que no la poseía, pero no el único. Se producen edulcorantes por microorganismos y por la remolacha (fructanos) y los genes responsables de la síntesis de aminoácidos azufrados en el girasol han sido transferidos a leguminosas como el guisante. El trigo para celíacos antes mencionado también puede traerse a colación aquí.

No puede dejarse de mencionar la consecución del ideal de los mejoradores de rosa al haberse obtenido una rosa de color azul transfiriendo el gen responsable de la síntesis de delphinidinas de la "espuela de caballero" (*Delphinium elatum*), aunque el brillante color azul del donante está aún lejos de haberse conseguido. También se había transferido al clavel un gen de antocianidinas, asimismo para color azul y también asimismo no del todo conseguido. Un gen es "un gen y sus circunstancias", y los pigmentos necesitan condiciones adecuadas del citoplasma (las vacuolas en los casos mencionados) para expresarse de modo perfecto, pero evidentemente se han dado los primeros pasos para una expresión completa del color deseado.

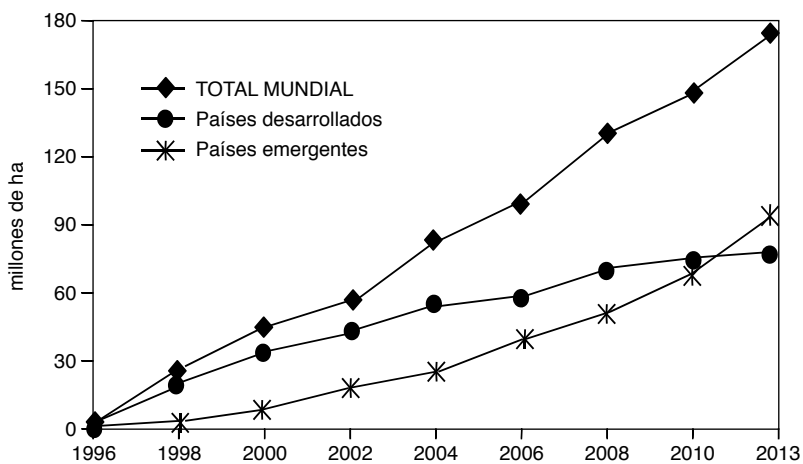
3.1.2. Superficies

Desde su aparición en 1996, el cultivo de variedades transgénicas se ha multiplicado; en tan sólo dieciocho años, en efecto, ha pasado de 1.7 a más de 175 millones de hectáreas (Fig. 3.1 y 3.2). La aceptación de la tecnología ha sido la más rápida habida en la Historia de la Agricultura). Además, en contra de los pronósticos ecofundamentalistas, en los últimos años los países en vías de desarrollo han adelantado a los industrializados. En particular, la subida en países como Brasil e India ha sido espectacular, como lo fue años atrás la de China; los tres países citados operan ya con tecnología propia en cultivos de su interés. En 2013, sembraron cultivos transgénicos más de 18 millones de agricultores de 27 países (19 de ellos en vías de desarrollo), de los cuales los diez primeros lo hicieron en más de un millón de hectáreas. De gran interés es el hecho de que las variedades transgénicas con más de un gen introducido representan más de la cuarta parte de la superficie total sembrada, excepto en la UE, donde, a causa de las barreras al registro y comercialización, se sigue con variedades de maíz de primera generación, y es muy posible que así siga sucediendo a corto y medio plazo.

	Millones de ha (*)				
	1996	2000	2007	2010	2013
TOTALES	1.7	44	114	148	175
EEUU		35.7	57.7	66.8	70.1
Brasil		–	15.0	25.4	40.3
Argentina		10.0	19.1	22.9	24.4
India		–	6.2	9.4	11.0
Canadá		3.0	7.0	8.8	10.8
China		0.5	3.8	3.5	4.2
Paraguay		–	2.6	2.6	3.6
Sudáfrica		–	1.8	2.2	2.9
Paquistán		–	–	2.4	2.8
Uruguay		–	–	1.1	1.5

(*) Fuente: Clive James, 2014. Sólo se incluyen los 10 primeros países en 2013

Figura 3.1.—Evolución de la superficie sembrada con variedades MG



Fuente: Clive James, 2014

Figura 3.2.—Evolución de la superficie de cultivos transgénicos (1996-2013)

Como ya se ha dicho, los cuatro principales siguen siendo soja, maíz, algodón y colza. Las proporciones de las variedades MG en los totales mundiales son, respectivamente, 80% (en 11 países), 32% (en 17), 70% (en 15) y 24% (en 4). Debe tenerse en cuenta, además, que en los países exportadores de los cuatro productos las variedades transgénicas respectivas alcanzan prácticamente el 100% de las superficies nacionales correspondientes, con clara repercusión en las importaciones que, para piensos, hace la UE desde dichos países.

La enorme difusión de estos productos se debe a la calidad de las variedades comercializadas, que se ofrecen como una oferta más para la agricultura, y a que las operaciones de control (véase más adelante) se han llevado con todo rigor desde el producto inicial hasta las manos del agricultor. No ha habido presiones sino razones de mercado, como sugiere continuamente la propaganda ecofundamentalista. Es evidente que las superficies llegarán a un máximo cuando se saturan con ellas las regiones donde han cubierto una necesidad.

En la Unión Europea, a pesar de todas las barreras administrativas establecidas a causa de la presión ecofundamentalista, la superficie de maíz Bt resistente al taldro, único evento aprobado para su comercialización, aumentó en un 15% respecto a 2012, llegando a rozar en 2013 las 150.000 ha, con España como líder con 137.000 ha. El número de variedades es pequeño, pero lo más importante o, mejor dicho, lo peor es que son variedades (unas 25-30 en la práctica) que incorporan un solo evento (o sea, un solo gen Bt) y antiguo, sin que se vea posibilidad próxima de que se acepten variedades de última generación para la siembra.

Lo verdaderamente penoso es que, para evitar el derrumbe de la ganadería europea por falta de piensos, la UE *sí autoriza la importación de harina de maíz y soja transgénicas autorizadas en otros países: autoriza la importación de harina maíz y soja transgénicas pero no la siembra en Europa de las mismas variedades*. Ya fue lamentable para el algodón español la no aceptación de variedades Bt resistentes al gusano rosado, algo ya sobrepasado en todos los países algodoneros que disponen de variedades con más de un gen de resistencia incorporado y, lo más importante, con distinto tipo de acción al ser no sólo codificadores de endotoxinas como las proteínas Bt sino también de exotoxinas.

Oponerse a la difusión de variedades transgénicas, sobre todo teniendo en cuenta que son los productos más analizados y ensayados de toda la Historia, es algo que se ha superado en todo el mundo excepto en la UE, donde la propaganda ecologista, incidiendo en aterrorizar al ciudadano ante un enemigo inexistente, sigue teniendo predicamento entre los políticos. Es absurdo considerar que las variedades Bt destruyen el medio ambiente cuando es patente el ahorro en poderosos insecticidas que sí destruyen toda vida animal y afectan la del propio hombre. Estudios llevados a cabo en Sudáfrica y en China muestran que los tratamientos contra el gusano rosado producen, en el agricultor, más de un 50% de afecciones en los ojos, más de un 10% en la piel, las dos en un 5% y vómitos en otro 5%. Sólo

por eso deberían ser recomendables, pero hay más; con datos de 2010 se calculó que el ahorro en fitosanitarios y en labores de cultivo por sembrar variedades tolerantes a herbicidas hizo que casi 20.000 millones de toneladas de CO₂ no hubieran ido a la atmósfera, equivalente a eliminar nueve millones de coches de las carreteras.

En un plano puramente económico, los estudios realizados en los últimos años indican que los precios mundiales de maíz, soja y colza serían superiores a los de hoy entre un 4 y un 10% de no haber existido las variedades transgénicas de dichos cultivos, y en proporción, lógicamente, el precio del pienso.

3.2. Los métodos clásicos y las tendencias

3.2.1. La evolución de los métodos "clásicos"

Como ya se ha dicho al comienzo de este capítulo, al cabo de casi veinte años de la siembra extensiva de la primera variedad transgénica y el doble desde la aparición de la insulina no tiene cabida describir las técnicas elementales, cuya descripción puede encontrarse en cualquier libro moderno. Hay que recordar que la ingeniería genética prescinde de la necesidad de cruzamiento para transferir un carácter, pero que en modo alguno tal circunstancia es nueva en la Mejora ni representa una auténtica ruptura con las técnicas del pasado. La mutagénesis y la poliploidización también prescinden de la reproducción sexual, y que se lograron transferir muy pequeños segmentos cromosómicos por medio del llamado *injerto cromosómico*; era posible, en casos muy concretos, el transporte de ADN entre células por medio de virus. La diferencia *cualitativa* con la ingeniería genética es que tales procedimientos no eran en absoluto universales, como tampoco la posibilidad de utilizar un mismo gen, por ejemplo, de resistencia, en muy distintas especies. Lo dicho se refiere, por supuesto, a la Mejora vegetal, pues las posibilidades en investigación son infinitas.

Tampoco hay que ceder ante la crítica de que los procedimientos son *antinaturales*. Aparte de todo lo que hace el Hombre utilizando su mente es tan *natural* como lo que hace cualquier otro animal utilizando la suya, no sólo los plásmidos y trasposones *naturales* realizan operaciones de ingeniería genética (incontroladas por el Hombre, evidentemente), también las ejecutan bacterias como *Agrobacterium* spp. de forma perfecta... para la bacteria. La biotecnología ha sabido utilizar esa técnica *natural*, y no es casualidad que los mayores éxitos en la transferencia se hayan conseguido, hasta ahora, con *A. tumefaciens* (casi un 80% de las plantas transgénicas obtenidas; sólo una pequeña proporción con *A. rhizogenes*). El cañón de ADN, pomposamente llamado "acelerador de partículas", cuenta un 10% y otro tanto la transformación directa de protoplastos; la microinyección en ovarios y el resto de procedimientos añaden el 2-3% restante de transformaciones conseguidas.

En la identificación y extracción de genes se están dando pasos de gigante gracias al increíble progreso, y abaratamiento, en la secuenciación de ADN. Las micromatrices ("microchips") de ADN que hace unos años se creía que tardaría en salir del campo exclusivo de la genética humana son hoy un instrumento de uso cada vez más extenso en la propia Mejora vegetal. De igual manera, técnicas que hoy nos parecen de lejana utilización práctica, como la de los cromosomas artificiales de bacterias y levaduras, podrán verse a medio plazo en las manos del mejorador, bien entendido que éste no es ya una simple persona, sino una cadena de especialistas que se extiende desde el ADN hasta la comercialización.

La presión ecofundamentalista hizo que, para la Mejora, se retiraran los marcadores de resistencia a antibióticos en la construcción de los vectores de transferencia. Se ha resuelto desde hace tiempo el problema de varias formas. Se puede mantener, por ejemplo, cada construcción en un plásmido distinto y *cotransformar* con dos plásmidos, el que lleva la del gen diana y otra con un marcador que, aunque fuera de resistencia a antibióticos (se utilizan en realidad de resistencia a herbicidas), no importaría, pues se insertarán en lugares distintos en el genoma del huésped y en la descendencia segregarán con independencia; la expresión de los marcadores permitirá seleccionar las plantas transformadas y, entre ellas, las portadoras del carácter perseguido con el transgén solitario. Otra posibilidad es cortar el plásmido portador de las construcciones necesarias, para prescindir del sector que lleva el marcador y transferir la parte portador del gen de interés con el cañón de ADN.

Los genes hoy transferidos son quiméricos, pues una vez extraídos se ven modificados por la adición de secuencias diversas que provienen de organismos muy distintos. Los promotores han recibido especial atención. Pueden ser *inducibles* (si se quiere que respondan a un estímulo externo) o *constitutivos* (si se quiere una expresión continua; de *funcionamiento general* (en toda la planta) o en *tejidos específicos* (por ejemplo, en el tapete de la antera, como el utilizado para conseguir androesterilidad en colza); *fuertes* o *débiles* (de alta o baja expresión respectivamente), etc. Muy utilizados son los de la fracción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y el de la ubiquitina de maíz, así como los de la actina del arroz y de las gluteninas de alto peso molecular de trigo; todos ellos son constitutivos. El campo de los promotores es de los que registra una investigación más activa. Por su parte, las secuencias de finalización de lectura (que, además, estabilizan el ARNm formado) pueden verse modificadas por secuencias que refuerzan su acción; entre las más utilizadas están la de la fracción 35S del virus del mosaico de la coliflor, la del gen inhibidor II de la proteinasa de la patata y las de algunos plásmidos. Hay, finalmente, un buen número de *secuencias auxiliares* (que pueden ser simples codones, intrones de efectos conocidos o secuencias no codificantes), con las que se busca la intensificación de la actividad del gen ("enhancers"), la optimización de transcripción y traducción y facilitar el tránsito al citoplasma u orgánulos donde se ha de expresar el gen introducido; proceden de organismos variados: maíz, *Ara-bidopsis*, plásmidos, virus, etc.

Una posibilidad aún poco extendida es la de transformar el ADN del cloroplasto, con lo que se eliminaría la crítica del "escape de genes" ("escape" que, por otra parte, siempre ha existido desde que se obtuvieron las primeras variedades domesticadas), ya que el cloroplasto no se transmite, o lo hace muy raramente, por el polen. La transformación ha de hacerse por medio del cañón de ADN o por fusión de protoplastos y esperar a que, por divisiones sucesivas, haya células con todos sus cloroplastos ya transformados.

De particular importancia está resultando la anulación de la expresión génica por medio de la síntesis de un ARNm complementario al natural por medio de un *gen antisentido* o del *silenciamiento génico*. Con un gen antisentido se produjo el primer alimento transgénico, el tomate "flavr savr", de maduración retardada. Se conocen hoy varios mecanismos de silenciamiento génico, más complejos y menos intuitivos que el antisentido mencionado, entre otros el de ARN de interferencia (RNAi), que aparece con el ARNm transcrito por sus secuencias complementarias e impiden su traducción; es una regulación, pues, post-transcripcional de la expresión génica. Ambos mecanismos son universales, pero, como en el caso de la androesterilidad, hay que ponerlos a punto para cada caso. El número de casos se incrementa cada año; entre ellos cabe citar el café sin cafeína al lograr silenciar el gen que codifica la xantosina transferasa, el tabaco sin nicotina y el clavel de larga duración para flor cortada por medio de una copia antisentido del gen de la ACC-sintasa de *Pseudomonas*. Por medio de un ARNm de interferencia, un equipo del Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC ha conseguido en Córdoba trigos sin las gliadinas que causan los síntomas celíacos.

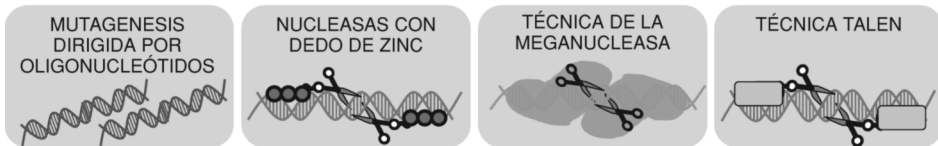
3.2.2. Las nuevas técnicas

Con objeto de evitar el acoso ecofundamentalista y su eco en los políticos de la UE, se están diseñando nuevos métodos que, con distinto éxito, se fundirán pronto con los "clásicos" ya mencionados. Lo que sigue, que se representa esquemáticamente en la Fig. 3.3, es una sucinta revisión de los que ya han producido resultados.

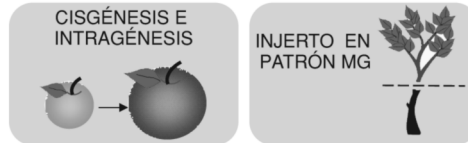
3.2.2.1. Técnicas enfocadas a mutagénesis dirigida

a) Mutagénesis dirigida por medio de oligonucleótidos (*reparación génica dirigida* y otros nombres). Se utilizan oligonucleótidos sintéticos para la inducción de cambios de uno o dos nucleótidos adyacentes. Se los prefiere con longitudes de 20 a 100 nucleótidos, con secuencia homóloga con el ADN diana excepto en el nucleótido que se quiere modificar; los oligos se degradan posteriormente en la célula. La mutación se produce en el punto de desajuste producido en el apareamiento del oligo con el ADN; la reparación subsiguiente puede reemplazar uno o unos cuantos pares de bases, producir una retromutación o causar una pequeña delección. Pueden usarse oligos de ADN de cadena sencilla o quiméricos de ARN y ADN. Se introducen en la célula con cualquier procedimiento, normalmente

1. NUEVAS TÉCNICAS EN MUTAGÉNESIS DIRIGIDA



2. VARIANTES DE LAS TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN



3. TÉCNICAS PARA CONSEGUIR SEGREGANTES NO MG



Fuente: Claudia Parisi, 2013

Figura 3.3.

con cañón de ADN o electroporación de protoplastos. Se ha desarrollado comercialmente en colza, maíz, lino, patata, tomate, tabaco y petunia.

b) Nucleasas con dedo de zinc. Son nucleasas (para cortar el ADN de doble cadena) con un dominio "dedo de zinc" (que localiza áreas precisas del ADN) que provocan cambios (mutaciones) al romper las dos hebras de ADN en un punto específico; la rotura activa el mecanismo de reparación, y si se introducen fragmentos de ADN que contengan secuencias del gen dañado a las que se han añadido los cambios deseados (por ejemplo, un nuevo gen o un simple cambio en la secuencia) se podrán generar cambios específicos en el ADN durante el proceso de reparación. Hay descritas al menos tres variantes del método. Se ha aplicado comercialmente en maíz, colza, tomate, tabaco, remolacha azucarera, patata para almidón, lechuga, petunia y chopo.

c) Meganucleasas. Parecida en todo a la anterior; utiliza enzimas de restricción que reconocen secuencias cortas de ADN que crean un corte en el dúplex y activan el mecanismo de reparación, con lo que o se origina una mutación en ese sitio o inserta una secuencia (un gen) dada. Tan sólo hay registradas aplicaciones en maíz y tabaco.

d) Técnica TALEN ("Transcription Activator Like Effector Nuclease"). Se parece a las de dedo de zinc por utilizar enzimas de restricción artificiales que constan de

activadores de transcripción (TAL) y endonucleasas para cortar secuencias específicas de ADN. Reconocen puntos específicos y actúan de manera similar. Solamente el tabaco, como planta modelo que es, ha sido objeto de esta técnica.

En estos métodos, los genes que codifican las enzimas hay que integrarlos en la célula por los procedimientos al uso, por lo que dichos sistemas caen dentro de la regulación anti-OMG.

3.2.2.2. Variantes de las técnicas de transformación

a) Cisgénesis e intragénesis. Si transformamos una variedad no con un ADN extraño sino de la misma especie (o de otra que pertenezca a un complejo génico compatible con ella) no debería llamarse "*transgénica*"; se han acuñado las palabras *cisgénesis* e *intragénesis* para esos casos con la esperanza de quedar fuera de la regulación europea, pues en definitiva la técnica equivale a un programa de retrocruzamiento. La diferencia entre ambas consiste en que, en el caso de la cisgénesis, lo que se transmite es un gen completo con todos los elementos necesarios para su expresión en una sola estructura, en tanto que en el de la intragénesis se inserta un ADN construido con fragmentos distintos aunque también de la misma especie. Pero Europa prefiere "marcar" la técnica y no los resultados; posiblemente, aunque nos mantengamos dentro de la misma especie o de su complejo génico, la etiqueta seguirá siendo "organismo transgénico" por manejarse ADN en laboratorio. Aplicado a patata, maíz, colza, cebada, trigo harinero y manzano; el gobierno holandés está a favor de excluir la cisgénesis de la estricta regulación anti-OMG de la UE, pero Bruselas aún no se ha definido en el momento de redactar este capítulo.

b) Injerto no-MG en patrón MG. La legislación de la UE admitirá el patrón pero no la variedad injertada si en su obtención ha intervenido la ingeniería genética. Aplicado en vid (para resistencia a virus), manzano, peral y naranjo (para patrones enanizantes y resistencia a hongos).

3.2.2.3. Técnicas para conseguir "segregantes no MG"

a) Mejora inversa. Se trata de *invertir* el proceso con el que se obtiene un híbrido comercial con objeto de obtener sus líneas parentales. Se ha aplicado hasta ahora solamente en tomate y brécol. Consiste en los siguientes pasos: (1) selección de un heterocigoto; por ejemplo, un buen híbrido del que se desea conseguir las líneas parentales; (2) supresión de la recombinación meiótica por cualquier procedimiento; en este paso hay que utilizar técnicas de ingeniería genética para la transformación; (3) producción de microsporas haploides de la planta resultante, cultivarlas para conseguir plantas haploides y, a partir de ellas, dobles haploides (homocigóticos) y (4) selección de plantas dobles haploides *sin* el gen introducido en el segundo paso y reconstrucción del híbrido.

b) Metilación de ADN dependiente de ARN. La metilación de ADN es un proceso natural en el desarrollo epigenético de los seres vivos. Puede utilizarse para silenciar genes por medio de la metilación de sus promotores. La secuencia del ADN no se altera, por lo que no produce OMGs y no habría que someter sus productos a regulación, pero en una fase del proceso hay que introducir genes que codifican ARN homólogo al ADN del promotor; el ARN producido es el agente que metila la región diana. En la descendencia se seleccionan las plantas que *no* llevan el transgén, por lo que el producto final es "limpio", pero el paso intermedio de obtención de una planta transgénica ofrece dudas normativas.

c) Floración extraprecoz. Es de particular utilidad en plantas de floración tardía como es la de las plantas leñosas. Si se logra hacerlas florecer en uno o dos años las habremos transformado *para el propósito de la Mejora* en plantas anuales o bianuales con toda la facilidad que eso implica para la realización de la mejora por cruzamiento. Se ha utilizado, por un equipo español, en el naranjo, pero el procedimiento es válido para cualquier especie. Se conocen varios genes, sobre todo en *Arabidopsis*, que producen floración precoz y se pueden utilizar técnicas de silenciamiento de genes que mantienen la fase juvenil sin floración o una sobreexpresión de genes de inducción de floración.

3.2.2.4. *Un comentario final sobre los nuevos métodos de Mejora*

En cada párrafo se han indicado los cultivos que han sido objeto de cada método, sin que se pueda saber todavía la eficacia práctica, entre otras cosas porque en estos nuevos métodos las empresas privadas están teniendo un papel muy activo motivado por la facilidad de patentarlos. De muchas otras especies hay referencias en la literatura, sin mayor indicación comercial. Hasta 2011, el número de publicaciones no era muy alto, pero de nuevo hay que considerar que los intereses de la investigación privada no coinciden a veces con los de la pública; dominaban, en ese año, la metilación de ADN dependiente de ARN, cisgénesis-intragénesis, dedo de zinc y TALEN, a pesar de su novedad en aquel momento. En cuanto a las patentes, dedo de zinc, meganucleasas, mutagénesis dirigida por medio de oligonucleótidos (la más continuada desde principio de los 90) y, en los últimos años, TALEN.

Aún hay poca experiencia. Pero es conveniente saber lo activa que es la investigación en este campo.

3.3. ¿Biotecnología o mejora clásica?

3.3.1. Un falso dilema

Porque la pregunta del encabezamiento no expresa más que un falso dilema. Si la frase "el fin justifica los medios" tiene una aplicación legítima es, precisamente, la que hacen los mejoradores que, en efecto, han aceptado siempre toda

técnica utilizable para conseguir una nueva variedad. Cada método tiene su ámbito de aplicación, y esto es válido no sólo al hablar de la ingeniería genética sino para hacerlo *dentro* de los métodos tradicionales: selección masal, cruzamientos, mutagénesis, etc., cada uno tiene sus ventajas y sus inconvenientes, y el mejorador ha de elegir el más conveniente en cada momento.

En particular, los grandes problemas actuales reflejan la necesidad de la integración de *todas las técnicas posibles*; valgan dos ejemplos: (1) el "Horizonte 2050" prevé que en el año 2050 la población alcanzará los nueve mil millones de personas y que hay que incrementar la producción en al menos el 50% de la actual; no es posible hacerlo con Mejora clásica o con Biotecnología, sino con ambas, unidas además a las de agricultura propiamente dicha (labores, mecanización, *manejo del agua*, etc.; (2) la producción de biocombustibles necesita no sólo ambas técnicas sino también las puramente industriales (purificación, manejo, etc.)

Entre los criterios para decidir sobre qué tecnología debe emplearse en cada caso hay que considerar:

- (1) si se quieren obtener variedades *plásticas* (de amplia adaptación) o bien adaptadas a condiciones concretas (no necesariamente lugares geográficos; piénsese en riego o secano, invernadero o aire libre, cultivo hidropónico o tradicional, etc.),
- (2) si la obtención es consecuencia de la demanda o de la conveniencia del obtentor,
- (3) el coste de la tecnología de obtención; coste para el obtentor y *para el agricultor*,
- (4) si el enfoque es para grandes o pequeñas explotaciones,
- (5) si va dirigida a un mercado desarrollado o a una agricultura tradicional (incluso de subsistencia),
- (6) los posibles efectos sobre el ambiente,
- (7) si el problema es resoluble por medio de una técnica más sencilla que la postulada.

Y quizá otras muchas facetas a considerar.

Como principio general cabe decir que la ingeniería genética es *insustituible* cuando la transferencia del gen de interés se realiza entre especies que no pueden en absoluto cruzar entre sí y *recomendable* cuando a la finalidad perseguida se llega más rápida o más económicamente que con métodos tradicionales, pero que muchas situaciones *pueden ser* resueltas por técnicas tradicionales de Mejora. Algo que aún no se puede conseguir es el manejo de caracteres cuantitativos, pues por ingeniería genética sólo se pueden transferir genes bien identificados, por lo que rendimiento, ciclos biológicos, muchas resistencias a plagas y enfermedades, sobre

todo las del tipo "horizontal" de Van der Plank, duraderas y estables, etc. Pero la auténtica creación de una nueva cadena de síntesis en una especie que no la poseía (la de β -carotenos en el arroz) mediante cuatro genes demuestra la potencia del método; el mayor conocimiento que se está adquiriendo en el análisis de QTLs y, por tanto, de los principales genes que lo componen, sugiere que podría bastar la transferencia de uno o pocos genes para conseguir cambios significativos en la expresión biométrica. Esta es la traducción a la nueva metodología del ataque clásico a un carácter cuantitativo: modificar alguno de sus componentes de genética más sencilla y menos modificable por el ambiente que el complejo carácter final.

3.3.2. Lo que hay que saber sobre una variedad transgénica

Cuando se ponen en el mercado productos obtenidos mediante una nueva tecnología es de todo punto necesario que se sepa en qué consiste y cómo hay que manejar el producto. Esto es válido para cualquier producto, incluyendo por supuesto a los puramente industriales, y los de la Mejora no son excepción. Pero tal necesidad *no es privativa de la ingeniería genética*. En efecto, no se maneja igual una variedad-población que una línea pura, una de reproducción sexual o de un híbrido comercial. Sorprende, sin embargo, la escasa preparación, en este sentido, de un gran número de agricultores que ignoran en qué casos pueden hacer uso del "privilegio del agricultor" y en qué otros casos *no deben hacerlo*, como por ejemplo en el caso de los híbridos, pues la semilla reservada, de entre la cosechada, para uso propio, producirá una descendencia heterogénea sin otro valor comercial que el de servir de pienso o poco más. El *privilegio del agricultor* está viéndose restringido en los últimos años para proteger los derechos de propiedad de los obtentores.

Tan grave al menos es la misma ignorancia en no pocos técnicos, agravada por la supresión de la Mejora genética como asignatura obligatoria en gran parte de las llamadas "Escuelas de Ingenieros Agrónomos" recientemente creadas: no saber qué naturaleza tiene el material a sembrar es como no saber qué piedra poner como cimiento de un edificio. Y un paso más, tan grave como los anteriores, es el desconocimiento sobre el tema manifestado por hombres de leyes a ambos lados de la mesa del juez; la tipificación de las variedades vegetales es algo recogido en las leyes nacionales e internacionales, y un conocimiento somero es esencial para saber actuar en el caso de la protección de derechos tanto del obtentor como del agricultor. Es lamentable oír en nuestros días, en boca de buenos juristas, que una variedad de trigo es "híbrida" porque procede de un cruzamiento realizado veinte o treinta generaciones atrás...

El caso de las variedades transgénicas une, al conocimiento que se ha de tener de las variedades obtenidas por métodos tradicionales, el correspondiente al gen o genes introducidos. He aquí una sucinta relación de las preguntas que un buen agricultor debería hacerle al técnico que le está aconsejando la siembra de una de tales variedades:

- De qué gen o genes se trata.
- Dónde se expresa: en toda la planta, en el capullo... Los primeros genes Bt contra el taladro del maíz no se expresaban satisfactoriamente, en condiciones españolas, en la mazorca; un gen de resistencia al gusano rosado en algodón que no se expresara en el capullo sería inútil.
- En qué variedad está el gen: el *transgén* es sólo un gen que se integra en todo un genotipo que, para todo lo demás, sigue siendo el mismo que antes; el rendimiento, por ejemplo, podría no ser superior si la variedad no está bien adaptada al ambiente en que se va a cultivar.
- Hasta cuándo se expresa: edad de la planta, fase del ciclo, nudos altos...
- Eficacia alta o baja.
- Cómo interacciona con el ambiente; esto es válido para cualquier gen; los genes de restauración de la androesterilidad, por ejemplo.
- En el caso de resistencias, cómo afecta al organismo diana y a los organismos auxiliares.
- Coste del cultivo de la variedad transgénica comparado con el de la misma variedad tradicional. No debería cultivarse allí donde el coste fuera superior al tradicional; es absurdo utilizar variedades resistentes, por novedosas que sean, allí donde no exista la plaga o la enfermedad.
- Posibilidad de dispersión ("escape" de genes) y problemas de coexistencia con agricultura tradicional (véase más adelante).

Téngase en cuenta que las variedades transgénicas *no son variedades milagrosas*: son una oferta más para tratar de resolver UN problema. Hay que seguir visitando el campo y seguir cuidando el cultivo. En el caso de genes de resistencia, *los transgenes tendrán el mismo destino que los tradicionales*: un mal manejo de los esquemas de siembra, y la norma es manejar mal todos los genes de resistencia (monocultivo continuo sin rotaciones, por ejemplo), podrá hacer que se creen resistencias en los organismos diana. En el caso de tolerancia a herbicidas se puede llegar a un mayor uso de estos, pero no si se los maneja con la técnica adecuada, con la que la experiencia está demostrando que *se ahorran* fitoquímicos. *El que se utilicen variedades modificadas genéticamente no soluciona por sí mismas el problema*. Es una ayuda más, importante desde luego, pero solo ayuda.

Una buena variedad, sea transgénica o no, debe ser utilizada con la mejor tecnología agrícola o industrial existente y en los ambientes a los que está destinada, que no tienen que ser los óptimos desde un punto de vista exclusivamente ambiental (no hay más que pensar en una variedad obtenida para climas extremos). La variedad transgénica exige la mayor atención en ese sentido, al haber estado obtenida por la integración de *procedimientos clásicos y biotecnológicos* y haber sido repetidamente ensayada para comprobar su estabilidad, sus efectos en el hombre y en el medio ambiente y su valor agronómico.

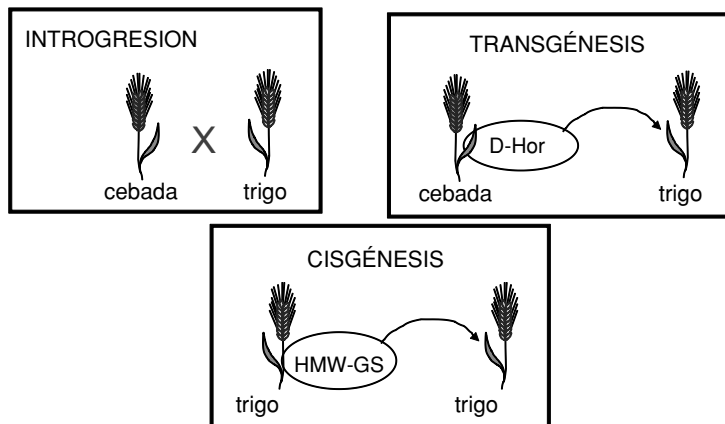
3.3.3. El coste de obtención

Pocos casos hay en que se haya podido comparar el coste de obtención de una variedad por métodos clásicos de Mejora y por ingeniería genética. Existen datos comparativos entre métodos de selección masal o por cruzamiento pero estrictamente fenotípica y la llevada a cabo con ayuda de marcadores moleculares (MAS) pero sin comparar los costes de los pasos de cada paso tecnológico. En conjunto, la segunda resulta ser más rápida, pero el coste depende del carácter, del momento del ciclo vegetativo en que se usan los marcadores y de la complejidad genética del carácter, esto es, de cuántos genes hay que marcar.

Pero son escasos, quizá por no publicados, los estudios de coste de la obtención de una variedad por dos métodos, tradicional y biotecnológico, llevados a cabo en paralelo analizando los pasos dados, el tiempo necesario y las barreras a los derechos de propiedad intelectual. Merecen ser citados dos de ellos (Parisi, 2013): la mejora de la calidad en el trigo harinero y la obtención de patrones transgénicos de *Citrus*, siendo ambos programas totalmente españoles desde su concepción hasta su finalización. Hay que partir del hecho de la escasez de datos sobre la labor de mejora, en especial la de la biotecnológica por haber sido hasta ahora mayoritariamente llevada a cabo por empresas privadas que no acostumbran a publicar sus datos. En particular, hay que prescindir de los costes previos a la transferencia propiamente dicha, esto es, la puesta a punto de la tecnología, lo que quizá sesgue los resultados salvo que se acepte que en los dos ejemplos estudiados dicho coste ha sido similar; se parte, pues, de la transformación.

(a) La mejora de la calidad panadera del trigo se ha llevado a cabo por un equipo cordobés por medio de introgresión (clásica), transgénesis y cisgénesis (Fig. 3.4). (1) La *introgresión* se llevó a cabo en el programa tras la introducción en el complemento cromosómico del trigo del cromosoma 1H de cebada portador del gen *HorD* que codifica las hordeínas D obteniendo previamente la línea de sustitución, lo que puede evitarse utilizando como donante del 1H tritórdeo en lugar de cebada. Tras varios retrocruzamientos y selección identificando los portadores de hordeína D, se consigue una línea de trigo con el brazo corto del cromosoma 1H. (2) *Por transgénesis*, las plantas se transforman con genes que codifican la hordeína D y marcadores moleculares adecuados; se cotransformó, utilizando el cañón de ADN, con dos plásmidos, uno de ellos portador el transgén de la hordeína D con su propio promotor y el otro con un gen para un herbicida (fosfinitricina) con el promotor de la ubiquitina de maíz. Como se describió más arriba, se seleccionan las plantas transformadas mediante un tratamiento con el herbicida y, en ese conjunto, se identifican por PCR las que llevan el gen de la hordeína D. (3) *Por cisgénesis*, las plantas de trigo se transformaron con el gen que codifica las proteínas de alto peso molecular (HMW) de las variedades de trigo que lo llevan. Se siguió un protocolo de cotransformación semejante al anterior salvo que en lugar de plasmidos se utilizaron dos fragmentos de ADN portadores respectivamente del gen de la hordeína D y del herbicida.

D-Hor D-hordeinas de cebada
 HMW-GS Subunidad de glutenina de trigo de alto peso molecular



Fuente: C. Parisi, 2013

Figura 3.4.—Mejora de la calidad panadera del trigo.

	CISGENESIS TRANSGENESIS	INTROGRESIÓN
TRANSFORMACIÓN		
Cañón de ADN	€1,417.56	/
SELECCIÓN		
Selección in vitro	€2,453.83	/
Selección molecular	€4,501.25	€2,576.25
OPERACIONES CULTIVO	€1,691.65	€1,850.00
MATERIAL EXTRA	€85.60	/
COSTES TÉCNICOS	€10,149.89	€4,426.25
MANO DE OBRA	€5,990.00	€5,340.00
COSTES TOTALES	€16,139.89	€9,766.25
TIEMPO	22 meses	30 meses

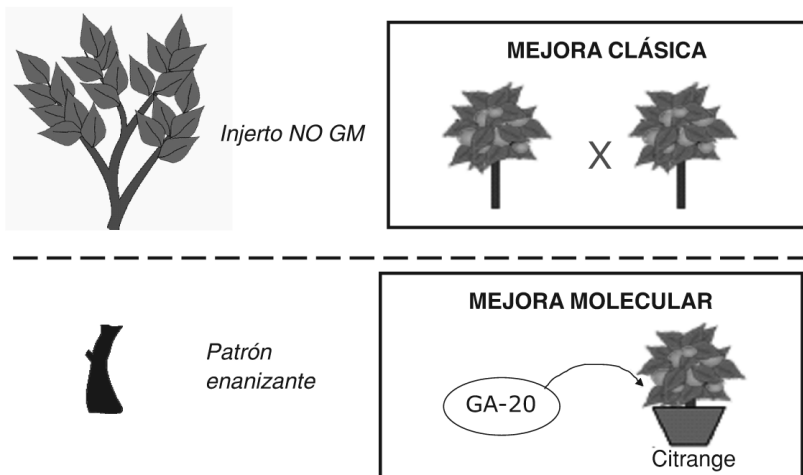
Fuente: C. Parisi, 2013

Figura 3.5.—Mejora de la calidad panadera del trigo.

El estudio económico comparativo se da en la Fig 3.5. El coste de la mejora *molecular* por transgénesis o cisgénesis es mayor que el de la tradicional en especial por la transformación, etapa inexistente en la segunda, por los medios de selectivos empleados, por el mayor número de herramientas moleculares empleadas y por el mayor coste del trabajo. Sin embargo, el procedimiento el tiempo empleado es más corto en estas técnicas que en la tradicional, aunque tal factor, el tiempo, demostró ser muy variable en las tres metodologías, dependiendo fuertemente de la identificación precoz o tardía de las plantas buscadas, lo que permite pensar en el uso de nuevas "herramientas" que lo permitan en las fases más precoces.

(b) El segundo caso analizado por Parisi (2013) es el de la obtención de un patrón enanizante en *Citrus* por medio de mejora clásica y de cisgénesis llevado a cabo en el IVIA valenciano (Fig. 3.6). En el primer caso se cruzaron el mandarino "King" como madre con *Poncirus trifoliata* y se seleccionó en la descendencia para conseguir, además del carácter buscado, la resistencia a algunos patógenos. Por transgénesis, se silenció el gen codificante de la 20GA-oxidasa por medio de un ARNm antisentido lo que reduce la producción de giberelinas y produce, en consecuencia, enanismo. El gen se obtuvo de un citrange y se le colocó el promotor del virus del mosaico de la coliflor; en el plásmido portador, donde se colocó en posición antisentido, también se incluyó un marcador de resistencia a la kanamicina. El plásmido así construido se introdujo por electroporación en *A. tumefaciens*.

GA-20: gen de la giberelín-oxidasa



Fuente: C. Parisi, 2013

Figura 3.6.—Mejora de patrón enanizante en *Citrus*

	TRANSGÉNESIS	TRADICIONAL
TRANSFORMACIÓN		
Con Agrobacterium	€ 1,684.64	/
SELECCIÓN		
Selección in vitro	€ 378.24	/
Selección molecular	€4,421.12	/
CULTIVO	€ 5,071.60	€100.00
COSTES TÉCNICOS	€11,555.60	€100.00
MANO DE OBRA	€14,230.00	€1,915.00
COSTES TOTALES	€25,785.60	€2,015.00
TIEMPO	5.5 años	13 años

Fuente: C. Parisi, 2013

Figura 3.7.—Mejora de patrón enanizante en *Citrus*

Los resultados se dan en la Fig. 3.7. La transgénesis es claramente mucho más costosa que el método clásico; al coste de las herramientas necesarias para aquélla se une la necesidad de cultivos en cámaras especiales y de técnicos especializados en las distintas etapas. Pero, como en el caso anterior, se llega antes al resultado final (casi ocho años menos). Cabe hacer las mismas observaciones que antes relativas a las patentes y a la aceptación por la UE si la planta formada por un injerto no transgénico sobre un patrón que sí lo es se considera, como es de temer, transgénico *in toto*. Respecto a la calidad del producto final, no es posible realizar la misma comparación que en el caso anterior pues se han obtenido excelentes patrones tras selección entre las plantas procedentes de las semillas de un mismo árbol, sin necesidad de que reproduzcan exactamente las características originales.

Pero hay que considerar otros factores:

(1) las patentes correspondientes a las herramientas moleculares (y del propio cañón de ADN) utilizadas, pues si bien algunas son de dominio público, otras no lo son y se deben hacer acuerdos con las compañías poseedoras de los derechos de patente; Parisi estima que dichos costes podrían suponer entre 50 y 100.000€; habría diferencias entre trans- y cisgénesis, pues en este caso, por ejemplo, al no usarse plásmidos no hay que considerar el pago por sus patentes;

(2) el otro factor es el coste de aprobación y comercialización en la UE; las variedades obtenidas por métodos tradicionales (la introgresión en este caso) no necesitan ningún trámite especial, tan sólo el registro en la Oficina Europea de

Variedades Vegetales, con un coste bajo (alrededor de 10.000 €) y 2-3 años de trámite (en este caso, pues depende del grupo de especies de que se trate). Para variedades transgénicas, el periodo puede alargarse indefinidamente en la Unión Europea (no así en otros países, donde puede durar 2-3 años, incluso tan sólo uno; ver luego) con un costo, supuesta la aprobación, de diez *millones* de euros como mínimo; si las cisgénesis fuera excluida por la UE del tratamiento dado a la transgénesis, el coste se reduciría respecta a ésta, evidentemente.

(3) los dos factores anteriores entran dentro del campo económico. En relación con la calidad del producto obtenido, el método más favorable es el de la cisgénesis que introduce un gen de la misma especie sin marcadores ni promotores extraños. Le sigue la transgénesis, que aun por medio de cotransformación puede dejar secuencias foráneas en el cromosoma huésped a menos que se consigan segregantes sin el marcador de herbicida. Por último, el que más modifica es el de introgresión, pues integra un brazo de un cromosoma de cebada y elimina el correspondiente de trigo y, aunque esta pérdida sea mínima, el genotipo resultante no es tan igual al original como el conseguido con los otros dos métodos.

Los datos anteriores *no* nos deben llevar a la idea de que el producto obtenido por ingeniería genética será *siempre* más costoso que el conseguido por métodos tradicionales. Como queda demostrado por el abaratamiento de costes en la secuenciación del ADN, los métodos pueden evolucionar hasta llegar a costes muy favorables. Las barreras impuestas por la UE no serán, tampoco, eternas. Si quedarán los derechos de propiedad, pero todo es resoluble en el comercio. Además, en el futuro próximo no existirá la dualidad tan marcada como en el estudio de Parisi, dualidad elegida *ex profeso*; se utilizarán unas u otras técnicas en distintas etapas del proceso; de hecho, en los dos casos aquí reseñados, la selección ha sido un paso obligado aun dentro de los programas "moleculares" y el uso de marcadores es ya una necesidad en la inmensa mayoría de programas de selección tradicional.

3.4. La polémica

3.4.1. Consideraciones previas

Parece innecesario recordarlos, pero gran parte de la crítica se debe a no tenerlos en cuenta: (1) No existen ni el riesgo nulo ni la seguridad total; no se puede exigir, pues, una seguridad del 100% para los productos transgénicos; (2) "transgénico" no es sinónimo de antinatural, ni de alterado, perjudicial o dañino; es el producto de una nueva herramienta utilizable en Mejora de plantas (y en Medicina, Industria, etc.); (3) "Natural" no es sinónimo de inocuo (la cicuta es "natural"), ni "artificial" (la cicuta con el gen silenciado sería comestible); (4) lo "natural" no siempre funciona mejor, pues la evolución biológica no terminará nunca; el trabajo del hombre ha permitido mejorar muchas cosas "naturales", sobre todo las plantas

que nos sirven de alimento; (5) los productos transgénicos son *los más seguros del mercado* a causa de la infinidad de pruebas de todo tipo a que se ve sometidos para su aprobación y comercialización.

3.4.2. Los argumentos

Si la pregunta "Biotecnología o Mejora tradicional" es un falso dilema, la polémica sobre los organismos modificados genéticamente hay que tildarla de "falsa" en el sentido de "falsaria". No hay más que observar que se dirige contra las variedades vegetales, nunca contra las medicinas o productos industriales. La cerrazón es tan grande que incluso cuando se obtienen variedades productoras de vitaminas, como el arroz dorado, dirigidas sin carga de derechos a países en vías de desarrollo, también se las ataca y, si es posible, se destruyen ensayos, invernaderos y lo que haga falta, siempre con la prensa presente; cuando apenas había un puñado de arroz dorado de primera generación en manos de sus obtentores, los ecofundamentalistas ya anunciaron que "producía abortos en las mujeres". La oposición ecologista utiliza, en el fondo, la protesta contra una técnica como arma contra una política económica que no le agrada ni a ellos ni a muchos. Por ello, su postura está llena de paradojas y contradicciones y se va viendo cada vez más aislada en todo el mundo salvo en la UE, mejor dicho, salvo en los políticos de la UE.

Dado que el presente capítulo es una actualización de lo conocido sobre variedades transgénicas, en esta sección *no habría que decir nada*. Desde la primera crítica que se emitió hace 18 años aproximadamente, la crítica ecofundamentalista no ha sido capaz de producir un solo argumento nuevo. Eso no obsta para que sigan repitiendo los antiguos una y otra vez, siempre con eco en los medios de comunicación que raras veces recogen las refutaciones inmediatas que se producen. Los casos más flagrantes son tan conocidos que no vale la pena referirlos aquí. Las llamadas "pruebas experimentales" (las lecitinas de la patata, la mariposa monarca, el reciente trabajo francés...) han sido tan burdas que no hubiera sido aceptadas por ninguna revista de tercera división, y todavía es un misterio por qué fueron publicadas por revistas científicas de la mayor altura. Sin embargo, las demostraciones inmediatas en sentido contrario pocas veces encontraron hueco.

Tampoco se ha modificado la aseveración fundamentalista de que los científicos a favor de los organismos transgénicos, casi todos los del mundo, "están pagados por empresas multinacionales o por países capitalistas". Cabe preguntarse si los científicos que experimentan para las organizaciones ultracologistas reciben su salario de organismos celestiales...

Las objeciones a los OMG se basan en la posibilidad de daño, de modo que hay que preguntarse cuál es el daño previsto y cuáles son sus alternativas. En pocas palabras, las críticas se agrupan en dos conjuntos: (1) *Las que pueden resolverse experimentalmente* y (2) *Las que trascienden los límites de la Ciencia*.

Entre las *que pueden resolverse experimentalmente* figuran, desde el principio, el posible uso masivo de herbicidas, el peligro para el hombre (alergias, enfermedades, muerte...), la resistencia a antibióticos provocada por el uso de marcadores con tal resistencia, aparición de nuevas razas de parásitos y daños generalizados contra el medio ambiente y contra la biodiversidad, en especial el escape de genes (que merece un comentario más extenso, al haberse refugiado gran parte de los críticos en la llamada "coexistencia"). Los estudios realizados han ido descartando todas y cada una de dichas posibilidades (para un análisis detallado, Cubero, 2006 y 2013.). No cabe decir más que si los alimentos usuales hubieran de pasar por los análisis que se efectúan sobre las variedades transgénicas, muchos no llegarían al mercado. El uso masivo de herbicidas y la aparición de nuevas razas no dependen de que la variedad cultivada sea transgénica o no sino de buenas prácticas agrícolas; la aparición de bacterias resistentes a antibióticos ocurre desde la misma existencia de éstos, y se ha potenciado no por los marcadores moleculares sino por el uso indiscriminado de aquéllos en la medicación, aparte de que de forma natural tenemos en nuestros intestinos más de la mitad de la flora intestinal resistente a antibióticos, que entran en el alimento de todo animal. Los supuestos daños al hombre demuestran ser falsos tras la inmensidad de estudios nutricionales, toxicológicos, de mutagenicidad, oncogenicidad y alergénicos; por cierto que si *por la posibilidad* de que causaran alergias en el futuro hubiera que retirar los transgénicos, habría que hacerlo ya con cereales, cupresáceas y olivo, que *sí* son alergénicos comprobados.

Respecto a la pérdida de biodiversidad, desde el siglo XVIII se incrementó la erosión genética, existente desde que se domesticaron plantas y animales al favorecerse el monocultivo o la cría de muy pocas razas animales y a la aparición casi simultánea de casas comerciales que comenzaron a multiplicar para su venta unas cuantas variedades, las más adaptadas a sus explotaciones, de entre las miles disponibles; la biotecnología tardó más de dos siglos en aparecer: no tiene nada que ver en ello, al contrario: al permitir la formación de nuevas combinaciones génicas lo que hace es precisamente *incrementar la biodiversidad*; con ésta acaba una mala práctica agrícola, no una técnica que, en sí misma, es positiva.

Las críticas que trascienden los límites de la ciencia pertenecen, lógicamente, al mundo de la metafísica, o incluso al de una religión que ha sustituido a Dios por la Naturaleza: "se saltan las barreras evolutivas" (pero ¿quién las ha fijado? El triticale, el tritórdeo, el fresón, las rosas modernas, ¿no se las han saltado?), estar "jugando a Dios" (pero un buen Dios no querría el suplicio de Tántalo para su criatura), "se va a cambiar el mundo" (hacer hoy lo que ayer era imposible *no es intrínsecamente malo*, y transferir un simple gen no puede compararse al arco y la flecha, la cerámica, la electricidad...), "se va a comercializar la vida, y la vida es sagrada" (¿qué se ha hecho con todo lo que nos comemos y utilizamos?), "favorece a los países ricos"...

Este último punto debe colocarse ya entre las críticas del primer grupo, las que pueden resolverse experimentalmente, pues, en efecto, la extensión de las varie-

dades transgénicas en los últimos años muestra que los países en vías de desarrollo llevan dos años consecutivos superando las superficies de los desarrollados, en contra de todos los pronósticos ecofundamentalistas (Fig. 3.1 y 3.2). En África, aparte de aquellos que ya las cultivan, siete países más iniciaron ensayos oficiales en 2013. No sólo eso, sino que Brasil, China e India tienen tecnología propia y se muestran indiferentes ante las absurdas regulaciones europeas.

3.4.3. La coexistencia

Nueva palabra acuñada por los ecofundamentalistas como último refugio al ver refutadas, con pruebas experimentales, todas sus profecías apocalípticas. Se basa en el *escape de genes*: si una planta transgénica (por ejemplo, resistente a herbicidas) se cruza con otra silvestre puede transferirle a ésta el gen de resistencia que, según se dice, se difundirá en las poblaciones naturales modificando la estructura ecológica de regiones enteras. El escape de genes ha existido desde la aparición de la primera planta cultivada, pues entre la planta domesticada y la silvestre original se producen cruzamientos naturales que transfieren genes en una y otra dirección. A veces causa problemas en productores de semilla; por ejemplo, en la zona del Canal de la Mancha es arriesgado producir semilla de siembra de remolacha pues allí existe silvestre y el flujo de genes impurifica tanto la variedad cultivada como las poblaciones naturales, y esto ocurre desde mucho antes de que existiera la biotecnología. De hecho, y asimismo mucho antes de que se pudiera imaginar la posibilidad de ingeniería genética, las normas legales exigían distancias mínimas entre cultivos comerciales y las parcelas destinadas a la producción de semilla de siembra certificada, distancias que variaban entre unos metros (casi de especies estrictamente autógamias) hasta los dos kilómetros en el caso de líneas puras de especies alógamas. El problema del escape de genes era, pues, bien conocido.

Podríamos llamar a tal circunstancia "coexistencia" entre cultivos comerciales y producción de semilla certificada, pero el término se le reserva ese mismo escape pero entre variedades transgénicas y no transgénicas. Es importante hacer notar que tal "coexistencia" se refiere a las *consecuencias económicas* que puede producir la presencia adventicia de semillas de una variedad en otra, *no se refiere a la seguridad (alimentaria o ambiental)* pues el cultivo transgénico que ha de "coexistir" ha sido previamente aprobado para su uso por la Comisión Europea tras un largo examen desde todos los puntos de vista posibles (véase luego). La Comisión estableció en 2006 que "*por coexistencia se entiende la capacidad de los agricultores de escoger entre la producción convencional, la ecológica y la de cultivos modificados genéticamente. Constituye, por otra parte, una condición previa para que los consumidores puedan elegir*"; en 2003 se refirió a "*las consecuencias económicas de la presencia adventicia de un cultivo en otro*", y que "*los agricultores deberían estar capacitados para cultivar libremente los cultivos agrícolas de su elección, sean cultivos modificados genéticamente o cultivos biológicos*".

Viendo rechazados sus argumentos por vía experimental, los ecofundamentalistas tratan de obligar a que el cultivo de una variedad transgénica, aprobada para siembra y comercialización, se haga a una distancia mínima de otra "tradicional" (pero fundamentalmente de agricultura "biológica") para evitar que se "contamine". La idea es conseguir que tales distancias sean tan grandes que el cultivo transgénico no pueda realizarse. Si se quiere una prueba de lo dicho, baste la noticia publicada en Francia el 15/12/2008: "Bajo presión de los grupos antibiotecnología, el Ministerio de Agricultura de Francia ha retirado un proyecto legislativo sobre coexistencia entre cultivos en el que inicialmente se fijaba una distancia mínima de aislamiento de 50m entre parcelas de maíz MG y no MG. Los grupos y organizaciones que se oponen a la biotecnología, como los proponentes de la agricultura "bio" y el sindicato agrario Confederation Paysanne, que postulan que la coexistencia es imposible en la práctica, *han rechazado esta distancia, ya que no es lo suficientemente grande para hacer que en la práctica sea inviable el cultivo de maíz MG*". La coexistencia es, pues, el último intento de los activistas para intentar eliminar cultivos MG, especialmente en Europa.

Debe saberse que, en la UE, el etiquetado indicando "este producto contiene OMG, etc." es obligatorio cuando el material tiene más del 0.9% de OMG; a dicha cifra se llegó por acuerdo con organizaciones ecologistas, pero no deriva de ningún estudio científico ni está relacionada con seguridad alimenticia o ambiental: en Japón es el 5%, en Corea, el 2% y en medicamentos o productos microbiológicos no es, en general, necesario el etiquetado. La coexistencia se entiende como el "establecimiento de normas de cultivo (distancia entre parcelas, barreras al flujo de polen, fechas de siembra, etc.) de tal forma que el material cosechado en la parcela sembrada con una variedad no MG, la semilla transgénica adventicia no supere el umbral del 0.9%". Pues bien, tales normas de cultivo se han estudiado exhaustivamente, en maíz (único problema en la UE en este caso) en España, Italia, Francia, Alemania, Inglaterra, Holanda, Suiza y Portugal) y todos ellos indican que la "coexistencia", tal como queda definida, es posible con normas fáciles de establecer. *Para estar muy seguros* se recomiendan distancias de al menos 25m entre parcelas MG y no-MG o, si la distancia es inferior o las parcelas son pequeñas, utilizar 4-8 surcos de maíz no-MG como barrera entre parcelas (para datos concretos deben consultarse los trabajos experimentales, todos ellos públicos y de fácil acceso.). Se ha establecido, además, un *código de buenas prácticas* que, en el fondo, consiste en *buenas prácticas agrícolas* y en una serie de *normas de buena educación y de buen trato entre vecinos*. En todo caso, es curioso que, salvo casos puntuales en su mayor parte fraudulentos (es muy fácil mezclar unas cuantas semillas MG en lo que se va a sembrar para poder denunciar la "contaminación"), no haya habido problemas de coexistencia ni en España ni en otros países.

En todo caso, hay una serie de puntos que deberían tenerse en cuenta: (1) las medidas a tomar deben basarse en datos experimentales; (2) no es realista exigir una pureza comercial del 100% que no se exige ni para la semilla certificada de la

mayor calidad; (3) las medidas a tomar deben ser proporcionadas y no discriminatorias, pues (4) debe determinarse la importancia relativa de los cultivos implicados; por ejemplo, si la superficie de maíz ecológico es insignificante, como sucede en España, no debe condicionar el cultivo de maíz MG en zonas en las que, en este caso, el problema a resolver (el taladro) es limitante.

3.5. Normativa sobre variedades transgénicas

A pesar de que la propia Comisión Europea ve el callejón sin salida en que su farragosa legislación sobre OMG la ha metido, y que ha reconocido más de una vez que hay que facilitar la actividad de la industria biotecnológica en Europa, "*cuya competitividad estaba claramente en desventaja debido a procedimientos administrativos largos y laboriosos*", no parece que la normativa existente vaya a modificarse a corto o medio plazo. En España, está integrada por la Ley 9/2003 de Organismos Modificados Genéticamente de 2003 y el Real Decreto 178/2004 con el Reglamento de Organismos Modificados Genéticamente. En Europa existen numerosas disposiciones entre las que hay que señalar la Directiva 2009/41/CE relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente; la Directiva 2001/18 CE sobre liberación intencional de OMG, los Reglamentos 1829/2003 y 641/2004 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, el Reglamento 1830/2003 sobre trazabilidad y etiquetado de los OMG y de los alimentos y piensos producidos a partir de estos, y el Reglamento 1946/2003 relativo al movimiento transfronterizo de OMG (detalles sobre la compleja normativa en Cubero 2013, cap.21). La legislación está llena de términos con connotaciones negativas: ya lo es "organismo modificado genéticamente", como si los transgénicos fueran los únicos que lo están, pero son aún más negativos los términos "utilización confinada", "liberación intencional o voluntaria", "comisiones de bioseguridad", "evento" (la transformación genética), etc.

Las Figuras 3.8 y 3.9 muestran sucintamente la complicación del método de registro europeo. El trámite para poder realizar ensayos de campo (o sea, la *liberación voluntaria* de una variedad transgénica) comienza con la presentación a la "autoridad competente" de un país miembro, que funciona a través de distintas comisiones y órganos administrativos, de una compleja documentación: un estudio técnico sobre la especie botánica, la modificación genética (esto es, el "evento"), la planta transgénica, dónde se va a ensayar (a "liberar"), los planes de control, el seguimiento de los ensayos y el tratamiento de residuos (quemar los restos de cosecha o destruir el cultivo antes de la recolección y, a veces, antes de la floración; en Francia, el agua de riego de los ensayos con variedades transgénicas se la ha llegado a recoger para su eliminación por separado) y los posibles efectos sobre el medio ambiente y sobre la salud humana (véase a continuación). Dicha documentación la estudia primeramente la citada *Autoridad Competente Nacional*; en España, ésta consta de la *Comisión Nacional de Bioseguridad*, esencialmente técnica, y de un *Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente*, to-

talmente político. Una vez aprobada por la autoridad nacional competente (la Fig. 3.8 muestra los organismos que intervienen en España según el caso), el expediente pasa a la Comunidad Europea, que sigue el complicado proceso indicado en la Fig. 3.9. Desde hace años, la creación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), compuesta exclusivamente de especialistas, ha simplificado estos primeros trámites, pero de todos modos sigue en la UE el penoso trámite descrito sumaria-

ORGANISMOS RESPONSABLES		
Consejo Interministerial OMGs - Com. Nac. de Bioseguridad	DGCEA*	MAGRAMA (Min. de Agric. Alim. y Medio Ambiente)
Seguridad Alimentaria	AECOSAN*	MAGRAMA + Sanidad, Serv. Soc. e Igualdad
Inscripción de variedades	S.G. Medios Prod. OEVV o Catal. Común Europeo*	DG Producciones y Mercados- MAGRAMA
Autorización fitosanitaria	Sub. Gral. Sanidad e Higiene Vegetal y Forestal	DG de Sanidad de la Prod. Agraria - MAGRAMA

* previa autorización de comercialización por la Comisión Europea

Figura 3.8.—Regulación en España de ensayos y autorización de variedades y productos modificados genéticamente (MG)

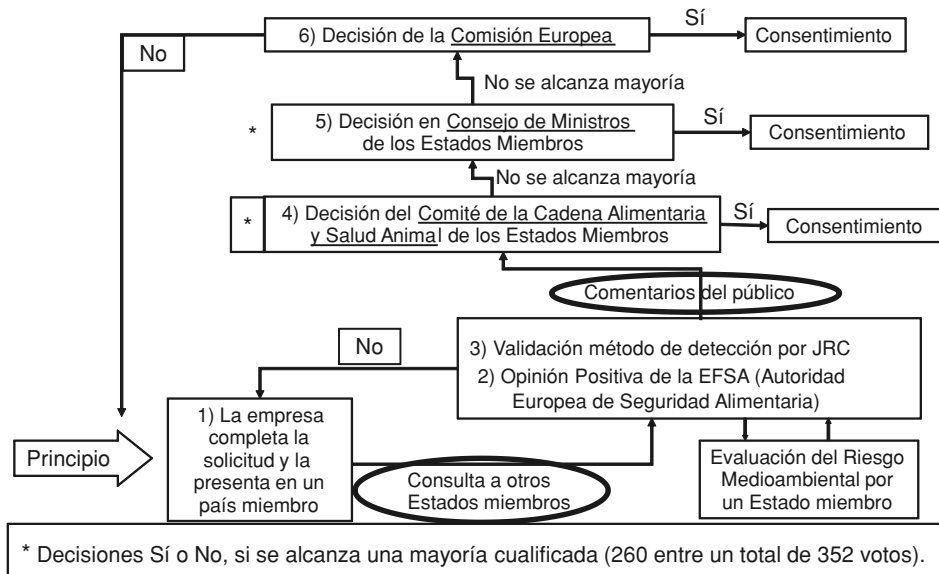


Figura 3.9.—Procedimiento de aprobación centralizado para Alimentos y Piensos MG (puede incluir el cultivo) según el Reglamento CE 1829/2003

mente en la Fig. 3.9 que, en principio, es válido tan sólo para los OMG destinados a alimentación, pero no, por ejemplo, para el algodón; la EFSA ha tramitado OMG no alimenticios, algo que siempre ha contado con la oposición de varios países miembros a pesar de que las exigencias científico-técnicas para los eventos estudiados son las mismas. Una vez aprobado el *evento*, éste se puede incorporar a variedades comerciales siguiendo las pautas del Registro de cada país o del de la UE.

Los estudios necesarios conciernen al *valor agronómico* y el valor añadido, el *medio-ambiental*, con evaluación de riesgos, y el *sanitario*, que incluye varios componentes: el valor nutritivo (ha de demostrarse la *equivalencia sustancial* en la composición y equivalencia nutricional para animales con la variedad original no MG, algo sometido a revisión, entre otras cosas, por las numerosas dificultades en la aplicación práctica), la toxicidad (aguda, subcrónica, crónica, teratogenicidad y oncogenicidad) y el potencial alergénico, para el que se exigen a veces ensayos clínicos. En cuanto a la *transformación* propiamente dicha se exige saber el origen de los genes utilizados (de un organismo sin problemas ni secuencias relacionadas con toxicidad o alergias); la caracterización molecular incluyendo el número de inserciones y secuencias flanqueantes, su posición, si están completas o no; la estabilidad de la inserción (a través de sucesivas generaciones); la caracterización de la nueva proteína y la expresión en diversas partes de la planta y el fenotipo en relación con la variedad original.

Es importante recordar que la CE es la que aprueba el "evento" y autoriza la comercialización de las variedades que lo lleven, pero la CE no aprueba el registro, cosa que depende de cada país o de las Oficina de Variedades Vegetales, europea o nacionales. Recíprocamente, los países de la UE no pueden aprobar los eventos pero son los que registran y protegen la variedad transgénica, al igual que cualquier otra que no lo sea. Para la inscripción de las variedades MG es necesario que la modificación genética (el evento) disponga de la autorización de comercialización y cultivo en la Unión Europea; en España el proceso se rige por la Ley 30/2006 de Plantas y Semillas de Vivero y el Real Decreto 170/2011. Las variedades transgénicas han de seguir el mismo proceso que las tradicionales con la condición de no presentar riesgos para la salud o el medio ambiente y cumplir las normas comunitarias (en particular, la CE 258/97) si se van a destinar a alimento. En los envases de la semilla de venta debe figurar la leyenda "variedad modificada genéticamente" indicando el identificador único de la modificación introducida. Además, debe someterse a las exigencias legales de trazabilidad y se necesita adicionalmente *un plan de seguimiento de cinco años de duración* para examinar si el cultivo comercial ha producido daños ambientales, lo que conlleva estudios de flora y fauna (macro y micro) tanto aérea como subterránea, algo en lo que España es pionera en la UE.

La regulación europea es, a todas luces, excesiva. Ese cuidado de que nada ocurra, ese *principio de precaución* llevado tan al extremo que si nuestros antepasados paleolíticos lo hubieran aplicado aún estaríamos metidos en cuevas, esa obsesión por un peligro que se ha demostrado inexistente pero que, no obstante, se previene

perfectamente bien en otros países... Ignoran o parecen ignorar nuestros políticos que hasta ahora no ha habido ni un solo caso de intoxicación, alergia, daño al ambiente, muerte de animales ni muerte de humanos... y si algún día lo hubiera ¿qué...? ¿No hubo un primer atropellado por el tren o por un automóvil? ¿O alérgicos a toda clase de productos...?

La Ciencia puede crear problemas, pero tiene los medios para resolverlos.

3.6. Problemas adicionales

Son la exención del mejorador, el privilegio del agricultor, la patente encubierta y el concepto de variedad esencialmente derivada.

La *exención del mejorador*, que siempre fue tácita pero que fue recogida en los Convenios de la UPOV, se refiere a la utilización por parte de un mejorador de variedades obtenidas por otros, no para un uso comercial directo sino para incluirlas en sus propios programas de mejora. La competencia actual es tan fuerte que se está limitando fuertemente tal exención vía protección o patente (para las semejanzas y diferencias entre una y otra véase el capítulo dedicado a patentes en el presente volumen y el cap. 21 de mi *Introducción a la Mejora vegetal*, dirigido a agrónomos y biólogos y no a abogados) y, sobre todo, con la aplicación del concepto de *variedad esencialmente derivada* que luego se describe. Lógicamente, las variedades transgénica, por su alto valor de obtención, quedan fuera de la exención, con no pocos problemas concernientes a la identificación de la transformación.

El *privilegio del agricultor*, que también se aceptó tácitamente pero que asimismo encontró cabida en las Convenciones de la UPOV, permite que un agricultor pueda reservar parte de la cosecha para utilizarla como semilla de siembra, *pero para uso propio, no para venta*. Lógicamente, un agricultor podía reservar, sin pérdida de calidad, semilla de variedades autóгамas o plantas de propagación vegetativa, no híbridos (de ahí el inmenso éxito de éstos: llevan la protección en su propia estructura genética). Siempre hubo abusos, pero el mercado actual, con variedades de alto valor y con una poderosa "piratería" en aumento, está poniendo límites al privilegio, que está siendo sustituido por un pago asequible de aranceles en caso de reutilización de la semilla o planta, algo a lo que se oponen países y organizaciones que claman por la anulación de todo derecho de propiedad intelectual.

Los dos casos anteriores se complican aún más con la llamada *patente encubierta*. Si un mejorador hace uso de su exención y un agricultor de su privilegio, en el caso de que la variedad en cuestión posea un gen introducido por ingeniería genética, dicha variedad podrá ser incluso de dominio público pero su siembra estará condicionada por el transgén porque éste sí estará patentado y sujeto a derechos de propiedad.

La *variedad esencialmente derivada* es un concepto introducido en la Convención de UPOV de 1991 que trata de evitar el abuso de la exención del mejorador

arriba comentada si, en una excelente variedad, introduce una característica fenotípicamente visible, distinta y estable *pero insustancial o insignificante en el plano comercial*. La UPOV estableció en dicho Convenio que una variedad es esencialmente derivada de una *variedad inicial* "si se ha obtenido a partir de ésta de tal forma que se han conservado y expresando sus caracteres esenciales, distinguiéndose, no obstante, de ella". Sugería que tales variedades "podrán obtenerse, *por ejemplo*, por selección de un mutante natural o inducido o de un variante somaclonal, selección de un individuo variante entre las plantas de la variedad inicial, retrocruzamientos o transformaciones por ingeniería genética" (Art. 14,5c del Convenio de la UPOV, 1991).

Ese "*por ejemplo*" lo tratan de eliminar algunos *lobbies* que pretenden que *toda mutación y todo OMG sea una variedad esencialmente derivada* y, por tanto, dependiente de la variedad inicial. Es una interpretación contraria a toda la Historia de la Mejora que condenaría a la mutagénesis, al retrocruzamiento y a la ingeniería genética a un plano subsidiario y a detener el avance al hacer depender a variedades de mayor valor comercial de las variedades iniciales que pueden ser totalmente intrascendentes u obsoletas. Los primeros algodones Bt se obtuvieron en la variedad Cocker 312, sin interés comercial desde mucho antes por estar sobrepasada por variedades más productivas, pero fue la que pudo cultivarse in Vitro y transformarse; una vez conseguida la transformación, por retrocruzamiento se transfirió el transgén Bt a numerosas variedades comerciales; pretender que todas estas hayan de depender de la original, sin valor alguno, es anular el progreso en Agricultura; en el caso mencionado, no hubo problemas porque todo fue realizado por la misma empresa, pero lo que pretenden algunos *lobbies* de presión es que así sea, en conflicto con la idea original de la UPOV, *destinado a proteger los buenos genotipos, no a impedir el avance en el mundo de la Mejora*.

Todo ello lleva al plano jurídico conceptos y casos que, hasta ahora, pertenecían al mundo de la Mejora. Lo más lamentable no es ya la indefinición jurídica existente sino la falta de preparación en este campo del mundo del Derecho no sólo en nuestro país sino en casi todos, con pocas excepciones como Holanda, los EEUU y algunos pocos más. Sirva como ejemplo el caso de la variedad "Blancanieves" de *Gypsophila*: un tribunal holandés la declaró *no esencialmente derivada* pero otro israelí *sí*. Que son asuntos que competen a los jueces está claro en una causa aún activa en los tribunales españoles; en un juicio sobre si una cierta variedad es o no es esencialmente derivada se planteó un conflicto de jurisdicción entre el Ministerio de Agricultura (entonces con otro nombre) y el Juzgado ante el que se presentó la demanda; el Tribunal de Conflictos dictaminó a favor de éste.

3.7. Europa contra el mundo

Son tantas las *medidas precautorias* y las cláusulas de salvaguardia que la aprobación del evento en la CE y el registro comercial se convierten en una pesadilla, y

a veces en la ruina, para el obtentor. Es lógico que el resto del mundo nos de la espalda. La CE, ante el peligro de que no se puedan producir piensos suficientes para el ganado propio, ha tenido que aceptar la importación de soja y maíz transgénicos con eventos aprobados en otros países, *pero no la siembra en suelo europeo de las variedades correspondientes*. Una pura sinrazón. La razón de la sinrazón la dio el Comisario europeo de Agricultura en enero de 2006: "La autorización de nuevos OMG en la UE se basa en criterios científicos, *pero este procedimiento no es aceptado políticamente...*"

El registro en Europa sigue siendo tan lento, tan costoso (se cifra en 10-15 millones de euros por evento) y tan irracional que algunas multinacionales han decidido no registrar más eventos en Europa, algo que las organizaciones ecologistas han considerado un triunfo cuando es el signo más evidente de derrota.

Europa se está quedando aislada. La complejidad europea contrasta con la que se sigue en otros países, sin menoscabo de la seguridad. En los EEUU el *procedimiento se basa en el producto final y no en la metodología de obtención*; con el informe positivo concordante de tres organismos: Sanidad (FDA), Agricultura (USDA) y Medio ambiente (EPA) se concede el permiso de comercialización, debiendo realizarse los mismos estudios que en la UE. Brasil ha aprobado en un solo año su primera variedad de judía transgénica, que ya incorpora dos eventos (resistencia a insectos y a herbicida).

Por el contrario, en la UE desde 2010 se registra un descenso en la solicitud de autorizaciones; en 2013 se recibieron nueve, se aprobaron 5 (de peticiones pasadas, algunas con larga historia) y *se retiraron nueve a petición propia*. Hasta 2013 incluido, se había aprobado 50 eventos y 68 estaban pendientes de autorización. El gran problema es que incluso con informes positivos de la EFSA, la decisión final es política, e incluso cuando esta ha sido conseguida, cualquier fallo administrativo hace suspender la autorización. El caso reciente de la patata "Amflora", destinada a producir almidón para uso industrial, es un buen ejemplo: habiendo pasado todos los filtros y controles, un detalle formal hizo que se prohibiera su siembra, incluso con el informe de la EFSA en contra de tal decisión.

Los datos publicados por *EuropaBio* son demostrativos de la lentitud del proceso y de las barreras impuestas. En el periodo 2011-2013, con el mundo en pleno avance, los tiempos *medios* para una solicitud son 29 meses para el estudio por la EFSA y 19 para el proceso administrativo y votación por los países miembros *tras la opinión favorable de la EFSA*; la decisión final la toma la propia CE, pues nunca se llega a la mayoría cualificada en las comisiones de "los 28" teóricamente responsables de la agricultura y del medio ambiente. *Cuatro años de media*. Son muchos años, y aún más: esa cifra encubre muchos otros datos. Según los mismos datos de *EuropaBio*, hay procesos pendientes *desde mayo de 1996*; hasta 2011 esperaban 19 solicitudes, siete para cultivo y doce para importación, a pesar del informe positivo de la EFSA en todos los casos.

En total, los retrasos acumulados de dichas solicitudes representan *cuarenta y ocho años*. Son demasiados. El mundo hace caso omiso de Europa y sigue avanzando sin que la seguridad se resienta. Como se ha dicho antes, no ha habido ni un solo caso de intoxicación, alergia, daño al ambiente, muerte de animales, muerte de humanos... Con tanta precaución ecofundamentalista, volvemos a entrar en la cueva paleolítica.

Nada mejor para terminar esta sección, y el capítulo, que transcribir las declaraciones de algunos líderes de otros países. Ya a principios del siglo actual, China declaró que Europa podía hacer la política que quisiera con los OMG, pero que ella haría la suya. Las declaraciones que siguen muestran que no sólo China piensa así.

En 2008 Wen Jiabao, entonces primer ministro chino, afirmó: "para resolver el problema de la alimentación, debemos contar con la gran ciencia y medidas tecnológicas, contar con la biotecnología, contar con los organismos modificados genéticamente".

En 2010, el Primer Ministro indio, Manmohan Singh, manifestó: "Es importante aplicar la biotecnología a la agricultura. Lo que se ha hecho con el algodón Bt debe hacerse con cultivos para la alimentación".

Y, finalmente, el Dr. Felix M'mboyi (Kenia, 4º país africano en aprobar OMGs) acusó a la UE de "hipocresía y arrogancia (de Europa)... al no permitir a los agricultores africanos hacer buen uso de cultivos MG para aumentar los rendimientos... esta clase de hipocresía y arrogancia viene con el lujo de un estómago lleno..."

3.8. Referencias

- Clive J. 2014. Resumen Ejecutivo, Brief 46. Situación de los cultivos biotecnológicos comercializados: 2013. ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications): www.isaaa.org.
- Cubero JI. 2006. Valoración de la transgénesis en el contexto de la mejora genética. En Muñoz E (ed.), Organismos modificados genéticamente. Editorial Ephemera, Madrid, España-
- Cubero JI. 2013. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 3ª edición. Mundi Prensa, Madrid, España.
- Parisi C. 2013. New plant breeding techniques: state-of-the-art, potential and challenges (Análisis de la innovación en las tecnologías de mejora vegetal). Tesis Doctoral. ETSIAM (Univeridad de Córdoba) e Institute for Prospective Technological Studies (IPTS), European Commission-Joint Research Centre (JRC). Sevilla/Córdoba.

Las siguientes páginas son de consulta obligatoria:

EuropaBio: <http://www.europabio.org>

GMO-compass: www.gmo-compass.org

ISAAA: www.isaaa.org

PG Economics Limited www.pgeconomics.co.uk

El autor agradece a J. Costa, M. Muñoz y C. Parisi sus aportaciones y comentarios que no sólo han actualizado sino mejorado grandemente el texto. En particular, la sección 3.2.2 del presente capítulo está tomada de la sección 17.5.3 de la tercera edición de mi *Introducción a la Mejora Vegetal*, a su vez basada en la Tesis Doctoral de Claudia Parisi, *New plant breeding techniques*.

4 Aplicación de la biotecnología en los programas actuales de mejora

M^a José Rubio-Cabetas¹, Belén Picó², Ana Casas³ y M^a Luisa Badenes⁴

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

² Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, UPV

³ Estación Experimental de Aula Dei, CSIC

⁴ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

4.1. Introducción

4.2. Análisis de la diversidad genética a escala genómica. Selección de fuentes de variación para los programas de mejora.

4.3. Identificación de genes y regiones genómicas involucradas en la variación de caracteres de interés

4.4. Empleo de la información genética y genómica para el desarrollo eficiente de cultivares mejorados

4.5. Referencias

4.1. Introducción

La disponibilidad de una secuencia genómica bien anotada y de un transcriptoma completo facilita enormemente la localización e identificación de los genes involucrados en los caracteres de interés. Conocer la variación en estas secuencias génicas y genómicas es un paso previo necesario para asociarla a la variabilidad fenotípica que se observa en los cultivos, lo que resulta esencial para su mejora.

Desde hace varios años venimos asistiendo a una revolución de las técnicas de secuenciación, con el desarrollo de plataformas de secuenciación a gran escala, denominadas colectivamente "*Next Generation Sequencing*" (NGS) technologies (Shendure y Ji, 2008; Metzker, 2010). Las más empleadas son las denominadas de segunda generación, como la plataforma Roche 454[®], el sistema Illumina[®], el más utilizado en la actualidad, la tecnología de Applied Biosystems SOLiD[®] o la estrategia Ion Torrent[™] de Life technologies. Además, se están poniendo a punto otras técnicas NGS de tercera generación, como Helicos Heliscope[®], Complete Genomics[®], and Pacific Biosciences SMRT[®], algunas basadas en la secuenciación de moléculas individuales de mayor longitud (Niedringhaus et al., 2011). Todas estas técnicas llevan a cabo millones de reacciones de secuenciación en paralelo y, asociadas al avance en las estrategias bioinformáticas de análisis, han permitido obtener grandes cantidades de secuencia genómica y transcriptómica en numerosos cultivos y especies silvestres relacionadas, a muy bajo costo y en un tiempo récord. Las secuencias generadas suelen depositarse en la base de datos "*Sequence Read Archive*" del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>). Aparte de la información del NCBI, resultan de interés las bases de datos del PLantGDB Phytozome y Ensembl-Plants; <http://www.plantgdb.org/>; <http://www.phytozome.net/>; <http://plants.ensembl.org/index.html>. Los avances también se describen en revisiones recientes (Pérez de Castro et al., 2012; Gao et al., 2012).

Los cereales, entre los que se incluyen maíz, arroz, trigo y cebada se encuentran entre los principales cultivos por su producción, a nivel mundial y su uso, principalmente en alimentación humana y animal. En los últimos años, la mejora de cada una de estas especies se ha visto beneficiada por los avances en genómica y secuenciación, que han tenido lugar de forma exponencial. Hasta el año 2010, la secuenciación de genomas se basó en la secuenciación por Sanger de grandes fragmentos genómicos contenidos en cromosomas artificiales de bacterias (BACs). Esta fue la metodología utilizada para secuenciar el genoma de arroz (*Oryza sativa* L., 389 Mb), completado en 2005 (IRGSP, 2005), el de maíz (*Zea mays* L., 2300 Mb) en 2009 (Schnable et al., 2009), o el cromosoma 3B de trigo (Paux et al., 2008). El mayor tamaño de los genomas de cebada (*Hordeum vulgare* L., 5100 Mb) y trigo blando, hexaploide (*Triticum aestivum* L., 17000 Mb), con un 80-90% de ADN repetitivo, ha retrasado la secuenciación de estos dos genomas, hasta que han aparecido nuevos métodos de secuenciación. El empleo de técnicas NGS, la reducción de la complejidad de los genomas, como la separación previa de los cromosomas o brazos cromosómicos por citometría de flujo y el diseño de un orden virtual de genes, por

sintenia con otros genomas ya secuenciados (arroz, sorgo y la especie modelo *Brachypodium distachion*), se ha empleado con éxito en cebada (Mayer et al., 2011) y trigo (Hernandez et al., 2012). En noviembre de 2012 se publicó un ensamblaje del espacio génico en cebada integrado en un mapa físico y genético (IBSC, 2012) y la secuenciación parcial de trigo blando, hexaploide (Brenchley et al., 2012). El genoma de estas dos especies es parcial y habrá que esperar a la secuenciación clon a clon de BACs solapantes que corresponden a un "minimum tilling path" para cada cromosoma. Todos los recursos generados a partir de estos proyectos constituyen la base para el desarrollo de nuevas herramientas en mejora.

Un ejemplo del enorme avance que la aplicación de técnicas NGS ha supuesto en hortalizas lo tenemos en la familia de las Cucurbitáceas, en la que hasta 2009 sólo se disponía de algunas colecciones de secuencias de cDNA, habiéndose secuenciado en los últimos 4 años los genomas de las 4 especies cultivadas más importantes, el pepino (*Cucumis sativus* L., 367 Mb) (Huang et al., 2009), uno de los primeros genomas secuenciados combinando Sanger con NGS, el melón (*Cucumis melo* L., 375 Mb) (García-Mas et al., 2012), la sandía (*Citrullus lanatus* L., 425 Mb) (Guo et al., 2013) y el calabacín (*Cucurbita pepo* L.) (Fei et al., 2014). El genoma del calabacín, todavía no publicado pero accesible en <http://cucurbigene.net>, se ha obtenido en el marco de un proyecto en el que se han secuenciado los genomas de las 3 especies cultivadas más importantes del género *Cucurbita*. En el caso de las Cucurbitáceas tenemos varias bases de datos <http://www.cucurbigene.net>, <http://www.melogene.net>, <http://melonomics.net> y <http://icugi.org> que facilitan el acceso a los últimos avances en secuenciación genómica y transcriptómica en los distintos cultivos de esta familia. Otra familia de hortalizas de gran interés en la que se ha avanzado enormemente ha sido la familia de las Solanáceas. La secuenciación del genoma del tomate (*Solanum lycopersicum* L., 950 Mbp) y de la patata (*Solanum tuberosum*, 840 Mb) se inició en la década pasada con la metodología de Sanger y se finalizó con NGS (Tomato Genome Consortium, 2012; Xu et al., 2011). Otros dos cultivos importantes de esta familia, que se encontraban más atrasados en la generación de información genómica han sufrido también un gran avance. El genoma del pimiento, *Capsicum annum* L. (2.700Mb) y de la especie relacionada *Capsicum chinense*, se ha publicado muy recientemente (Kim et al., 2014) y, aunque no se dispone del genoma completo de la berenjena (*Solanum melongena* L.), ya existen estudios que describen secuenciación genómica parcial (Barchi et al., 2011).

El primer genoma disponible de una especie leñosa fue el del chopo *Populus trichocarpa* secuenciado con la tecnología Sanger (Tuskan et al., 2006), seguido del de la vid, *Vitis vinifera* (Velasco et al., 2007). En la familia de las Rosáceas se han secuenciado los del manzano, *Malus domestica* (Velasco et al., 2010), la fresa, *Fragaria vesca* (Shulaev et al., 2011) el peral oriental *Pyrus bretschneideri* Rehd (Wu et al., 2013), el peral europeo *Pyrus communis* (Gardiner et al., 2012b) y el melocotonero, *Prunus persica* (Verde et al., 2013). Este último se inició también en

la década pasada con la metodología de Sanger y se finalizó con NGS. Otros frutales secuenciados han sido *Carica papaya* (Ming et al., 2008), *Citrus sinensis* (Xu et al., 2013), y el último publicado de varias especies del género *Citrus* (Wu et al., 2014). El genoma secuenciado más largo entre las leñosas ha sido el de *Pinus taeda* (Neale et al., 2014). Así mismo están disponibles secuencias parciales de cerezo y de almendro (Knoep et al., 2013), aunque no se dispone del genoma completo. Las secuencias de los genomas de Rosáceas se pueden consultar en <http://www.rosaceae.org/>.

La resecuenciación a escala genómica permite ampliar el número de polimorfismos de tipo SNPs (Single nucleotide polymorphisms) y mejorar su distribución. La resecuenciación de genomas completos se inició en especies modelo como *Arabidopsis* y arroz (Huang et al., 2009; Xu et al., 2012). La cada vez mayor disponibilidad de genomas de referencia y el desarrollo de estrategias de secuenciación de fragmentos de mayor longitud y extremos pareados que facilitan el ensamblaje (genotecas de *pair ends* o *mate pairs*) ha extendido la resecuenciación genómica a un mayor número de cultivos, con una cobertura de los genomas cada vez mayor (Lam et al., 2010; Xu et al., 2014). La abundancia de elementos repetitivos en los genomas de plantas dificulta el ensamblaje de secuencias cortas y la identificación de polimorfismos, por lo que en genomas complejos o en los que se dispone de menor información se ha generalizado la resecuenciación genómica asociada al empleo de técnicas de reducción de la complejidad de los mismos antes de la secuenciación. Algunas de estas técnicas son la selección y secuenciación de regiones poco metiladas, la secuenciación de fragmentos amplificados con AFLPs, o de secuencias diana amplificadas en PCRs múltiples o previamente capturadas mediante hibridación, o el empleo de "*Reduced Representation libraries*" (RRL) (Hyten et al., 2010; Deschamps et al., 2012; Hirsch et al., 2014). Estas estrategias persiguen reducir el coste de identificación de los SNPs sin comprometer en exceso su calidad.

Dos de las estrategias más empleadas utilizan enzimas de restricción para fragmentar previamente el genoma y reducir su complejidad. En el caso de la estrategia RAD, "*Restriction Site-Associated DNA*" (Miller et al., 2007; Baird et al., 2008; Wang et al., 2012), se ligan adaptadores con primers de amplificación y secuenciación a los extremos cohesivos de los fragmentos genómicos digeridos y se fragmentan de nuevo, secuenciándose los fragmentos resultantes. El empleo de RAD ha permitido recientemente la identificación de las primeras colecciones de SNPs en algunos cultivos como berenjena o alcachofa (Barchi et al., 2011; Scaglione et al., 2012). El segundo método, más sencillo que el anterior, es la reducción de la complejidad digiriendo previamente con enzimas que no corten frecuentemente en la fracción repetitiva del genoma, por lo que únicamente se generan fragmentos de tamaño secuenciable en determinadas regiones genómicas ricas en secuencias de copia única. La generación de secuencias se combina con la identificación de marcadores y el genotipado de los individuos en la misma reacción, por lo que nos referimos a este método como Genotipado por Secuenciación "*Genotyping by*

Sequencing" (GBS) (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012a). El número de SNPs identificados en este tipo de estudios es tan grande que podemos aplicar criterios muy restrictivos de calidad para su selección.

Las plataformas que compiten en genotipado masivo a gran escala, con decenas o cientos de miles de SNPs, son los chips de Affymetrix, basados en hibridación, y las plataformas Infinium^R de tecnología Illumina, basadas en extensión del cebador (Perkel, 2008; Edwards et al., 2014). Los primeros chips de Infinium se desarrollaron para un conjunto de especies seleccionadas, en las que se ha avanzado más en la identificación de SNPs, como arroz o maíz (Yu et al., 2014; Wu et al., 2014), pero el número de especies para las que se dispone de estos recursos se está incrementando rápidamente (Ganal et al., 2012). Por ejemplo, ya hay chips de este tipo disponibles en tomate, *Brassica napus*, alfalfa o soja (Song et al., 2013; Hirakawa et al., 2013; Raman et al., 2014; Li et al., 2014). En la familia de las Rosáceas se encuentran disponibles los chip de Infinium de 9K para melocotonero, 9K para el manzano, y de 6K para cerezo (Verde et al., 2012; Chagné et al., 2012).

Cuando no se dispone o no es necesario genotipar un número de SNPs tan elevado se pueden diseñar plataformas de rendimiento medio, entre las que destaca la plataforma Golden Gate^R, de tecnología Illumina (Sharpe et al., 2013; Esteras et al., 2013). Otras estrategias de genotipado a media o pequeña escala que suelen ser necesarias para validar conjuntos limitados de SNPs en muestras concretas tras el empleo de plataformas a gran escala son sondas Taqman^R de Applied Biosystems (Shen et al., 2009), *High resolution melting* (HRM) (Seipp et al., 2009), la tecnología KASPar (KBiosciences) (Cuppen, 2007) y la tecnología *Sequenom Mass Array* en distintos formatos (Gabriel et al., 2009).

Los recientes avances en secuenciación y genotipado descritos ya están cambiando las estrategias de mejora, optimizando los procesos de selección y combinación de genotipos que resulten en fenotipos favorables. La integración de esta información y herramientas afecta a las 3 fases del proceso de mejora. La caracterización y selección de fuentes de variación, la identificación de genes o regiones genómicas involucradas en el control de características de interés y el desarrollo de cultivares mejorados.

4.2. Análisis de la diversidad genética a escala genómica.

Selección de fuentes de variación para los programas de mejora

La domesticación de las plantas ha llevado a la obtención de genotipos más adaptados a los sistemas de cultivo pero a su vez ha supuesto una disminución de la variabilidad genética (Gur y Zamir, 2004). Las nuevas tendencias en mejora se orientan a la identificación de las regiones del genoma de especies silvestres que se han perdido durante el proceso y su utilización en los procesos de mejora genética. Existen numerosas evidencias que demuestran la importancia de las especies silvestres ya que representan un reservorio de genes con gran potencial para

la mejora de determinados caracteres (Hajjar y Hodgkin, 2007). En este contexto conocer la diversidad genética de una determinada especie facilita el empleo de la variación natural, base primaria de la mejora de los cultivos (Morrell et al., 2011; Nybom et al., 2014). A continuación se presentan los avances en el análisis de la diversidad genética a escala genómica en los distintos grupos de cultivos.

En cereales, hasta hace pocos años, los microsatélites fueron los marcadores más populares por su alto nivel de polimorfismo, co-dominancia y gran reproducibilidad, unido a su detección semi-automática. Aunque se siguen utilizando (Maccaferri et al., 2011; Kollers et al., 2013ab), se están viendo sustituidos por otros marcadores de mayor rendimiento. Un método de genotipado que se ha extendido en los últimos años en estos cultivos son los DArT (Diversity Arrays Technology), marcadores derivados de hibridación diferencial a representaciones del genoma después de la digestión con enzimas de restricción para reducir su complejidad. Estos marcadores son propiedad de la empresa Diversity Arrays Technology que es quien los genera. Son bialélicos, dominantes, ya que se valora la presencia/ausencia de ese fragmento en la muestra genotipada, e independientes de la secuencia de nucleótidos. Desde el primer trabajo en cebada en 2004, con la construcción de un mapa genético (Wenzl et al., 2004), se han utilizado con objetivos diversos en cebada (Szűcs et al., 2009), trigo blando (Akbari et al., 2006; Semagn et al., 2006) y trigo duro (Mantovani et al., 2008), en muchos casos integrados con otros marcadores. También se han empleado para evaluar la diversidad genética en cebada (Crossa et al., 2007; Zhang et al., 2009) y trigo blando (Crossa et al., 2007; White et al., 2008).

Los SNPs o polimorfismos en un único nucleótido son los marcadores más abundantes entre individuos de cualquier especie. Distintos proyectos de secuenciación de colecciones de cDNA o ESTs, han facilitado el diseño de nuevas colecciones de SNPs y la construcción de plataformas de genotipado de baja-media escala, entre 384 y 1536 SNPs en cebada (Close et al., 2009; Muñoz-Amatriain et al., 2011), trigo blando (Chao et al., 2010) o trigo duro (Trebbi et al., 2011). Poco después, utilizando la información derivada de secuenciación de transcriptoma (RNAseq) o de nuevos proyectos de secuenciación genómica, se han diseñado otras plataformas de genotipado capaces de interrogar un mayor número de SNPs como los chips de Infinium de 9k en cebada (Comadran et al., 2012) o trigo (Cavanagh et al., 2013), 44k en arroz (Zhao et al., 2011), 50k en maíz (Ganal et al., 2011), hasta el nuevo chip de 90k para trigo (Wang et al., 2014). Igual que se ha mencionado para los DArTs, estas plataformas de genotipado se han utilizado para construir mapas genéticos, analizar la diversidad existente en distintos conjuntos de materiales (ej. arroz: Thomson et al., 2012; cebada: Muñoz-Amatriain et al., 2014; maíz: Wu et al., 2014; trigo: Würschum et al., 2013). En los estudios anteriores se plantea el estudio de la variación en dos fases, primero se identifican los polimorfismos y posteriormente se genotipan los mismos en las poblaciones. Con el desarrollo del Genotipado por secuenciación (GBS), el descubrimiento de los polimorfismos y el

genotipado de los mismos puede realizarse al mismo tiempo. Como se ha comentado en la introducción, el método se basa en secuenciar una fracción del genoma, que se ha seleccionado utilizando métodos de reducción de la complejidad del genoma mediante la digestión con uno (Elshire et al., 2011) o dos enzimas de restricción (Poland et al., 2012a), con la posterior secuenciación de fragmentos cortos multiplexando muestras y utilizando los nuevos sistemas de secuenciación NGS.

Esta tecnología se ha utilizado en arroz, cebada, maíz, trigo blando y trigo duro (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012 a b; Saintenac et al., 2013; Spindel et al., 2013; van Poecke et al., 2013). El número de marcadores obtenidos es muy superior al de los otros sistemas de genotipado. Permite identificar dos tipos de polimorfismos: SNPs, cambios de una base en las secuencias de ADN (co-dominantes) y variantes de presencia/ausencia (dominantes). Para dar una idea de los números obtenidos, con la combinación de enzimas PstI+MseI, Poland et al., (2012a) pudieron localizar 34.000 SNPs y 240.000 variantes de presencia/ausencia en una población de cebada, mientras que Saintenac et al. (2013) consiguieron mapear 33.800 SNPs y 167.000 marcadores de presencia/ausencia en trigo blando. Recientemente se ha utilizado GBS para evaluar la diversidad en sorgo, en un panel de 971 accesiones con 265.000 SNPs (Morris et al., 2013) y se ha publicado otro trabajo en maíz, donde se han analizado 2.815 líneas puras, muchas de ellas conservadas en el banco de germoplasma americano, con 681.000 SNPs (Romay et al., 2013). El poder de detección de estos análisis es muy superior al de otros estudios con menor número de marcadores.

Otra forma de analizar la diversidad genética a escala genómica es mediante re-secuenciación del genoma completo en especies como arroz o maíz, o de una parte del genoma como sería en el caso de cebada o trigo. El menor tamaño del genoma de arroz ha facilitado el análisis de la variación secuenciando a baja cobertura un elevado número de entradas. En un primer estudio se trabajó con 517 cultivares autóctonos chinos, de los que 373 pertenecían a la subespecie *indica* (Huang et al., 2010); en otro trabajo posterior, se añadieron 100 cultivares autóctonos chinos de la subespecie *japonica* y otras 330 variedades de arroz de distintos orígenes (Huang et al., 2012). Estos dos trabajos, resultado de la secuenciación de 950 accesiones de arroz dieron lugar a 4,1 millones de SNPs, con los que se analizó la estructura de población del arroz a nivel mundial, con cinco grupos bien definidos. Un estudio reciente con tres cultivares de arroz que presentan distinta respuesta a sequía y salinidad ha permitido identificar 1,78 millones de SNPs y 154.000 polimorfismos de tipo inserción/delección, entre el genoma de referencia, construido con la variedad Nipponbare y esos tres cultivares. A partir de esos resultados se han podido identificar SNPs dentro de dominios funcionales de genes relacionados con la tolerancia a estrés (Jain et al., 2014).

Los estudios en maíz, han puesto de manifiesto que el genoma de maíz no es estático sino que está en movimiento. Un primer estudio con 6 líneas puras de maíz detectó más de 1 millón de SNPs y 30.000 indels entre la secuencia de esas

líneas y la del genoma de referencia, obtenida con la línea B73 (Lai et al., 2010). Se identificaron cientos de genes completos que presentaban variación tipo presencia/ausencia en las líneas analizadas. Al menos 157 genes no estaban presentes en la referencia B73. Otros dos trabajos posteriores identificaron 55 millones de SNPs y un alto porcentaje de variantes estructurales, de la secuenciación de 103 líneas (Chia et al., 2012), así como el elevado número de cambios genéticos que han tenido lugar a lo largo de la mejora de maíz, a partir de 278 líneas puras (Jiao et al., 2012).

En el caso de otras especies con menos información genómica, se ha recurrido a la secuenciación de sólo una fracción del genoma. Este sistema se empleó para generar un mapa haplotipo del genoma de maíz, secuenciando solo regiones de baja complejidad (Gore et al., 2009), y para capturar sólo el exoma, aquella parte del genoma que codifica para ARN mensajero, permitiendo detectar variaciones en el número de copias en un buen número de genes entre dos líneas recombinantes de maíz (Liu et al., 2012). En cebada se ha desarrollado un sistema de captura de exoma en solución, para aislar y secuenciar 61.6 Mb que es la fracción de ADN que corresponde a secuencia codificante (Mascher et al., 2013). El método, comercializado por la empresa Roche, ha sido utilizado con distintos genotipos de cebada demostrando su utilidad para descubrir nuevas variantes alélicas en zonas codificantes. Un sistema equivalente se utilizó anteriormente en trigo blando, permitiendo obtener más de 500.000 SNPs entre 8 cultivares (Winfield et al., 2012).

Para muchas especies hortícolas el paso de identificación de polimorfismos de forma masiva ya se ha llevado a cabo y existen amplias colecciones de SNPs que se han implementado en plataformas de genotipado para el análisis de la diversidad genética de la especie. Para asegurar el éxito del ensayo de genotipado es esencial optimizar la selección de los SNPs. Su distribución uniforme en el genoma debe asegurarse, bien utilizándolos en la construcción de mapas genéticos, bien situándolos directamente, en el caso de existir un genoma de referencia en la especie. Dada la variabilidad de las poblaciones que se genotipan, es necesario seleccionar SNPs que no presenten polimorfismos adicionales en zonas circundantes, que puedan alterar el genotipado de algunos individuos. Así mismo, resulta de interés incluir SNPs funcionales, es decir mutaciones que puedan estar relacionadas con cambios funcionales en genes de interés, lo que facilita la posterior asociación entre los genotipos y los correspondientes fenotipos en el germoplasma analizado. Una vez establecida la plataforma puede evaluarse su calidad, antes de su uso masivo, ensayándola con un panel de individuos que represente lo mejor posible la variación de la especie.

Como resultado de este tipo de estudios, no sólo se puede conocer, con mayor o menor detalle, la distribución de la variación en la especie y las relaciones entre individuos a escala genómica, sino también pueden obtenerse huellas moleculares específicas de genotipos concretos y estudiar la estructura genética de las poblaciones y la distribución del desequilibrio de ligamiento, factores clave para la se-

lección de fuentes de variación, para la elección de los parentales de poblaciones de mapado, y para llevar a cabo estudios de asociación con colecciones de germoplasma.

Los chips de Infinium empiezan a estar disponibles en hortícolas. Uno de los primeros se desarrolló en tomate, incluyendo más de 7.000 SNPs (Sim et al., 2012a) y se ha utilizado para genotipar distintas colecciones. En el estudio de Sim et al., 2012b, con más de 400 entradas cultivadas, se validan un 97% de los marcadores y se observa una estructura poblacional relacionada con el proceso de mejora, que separa las entradas de procesado de las de consumo en fresco y las procedentes de procesos de mejora modernos de los cultivares antiguos. Así mismo, se distinguen los tipos de tomate cereza y los pertenecientes a la especie silvestre *S. pimpinellifolium*. En este estudio de tomate se describen regiones génicas con mayor diversidad genética en los tipos mejorados, resultado de procesos de introgresión de las especies silvestres durante los programas de mejora. La identificación de las introgresiones de las fuentes de variación (genotipos silvestres, razas locales, etc.) en los cultivares mejorados es una aplicación de gran interés de los estudios de diversidad a escala genómica, ya que facilita la identificación de los genes involucrados en los caracteres mejorados y proporciona dianas de interés para la mejora. Utilizando el mismo chip de tomate, Hirakawa et al. (2013) identificaron mutaciones en 200 genes candidatos que pueden estar relacionadas con variantes fenotípicas en distintos caracteres de interés. Los chips de Affimatrix también se están aplicando a nuevos cultivos. Hill et al., (2013) empleando el Pepper GeneChip de Affimatrix para analizar 40 líneas diversas de *C. annuum* y genotipos representativos de otras 3 especies del género (*C. frutescens*, *C. chinense* y *C. pubescens*), detectaron 33.401 variantes en 13.323 unigenes e identificaron regiones con diversidad genética diferencial en genotipos picantes y no picantes. En muchos otros cultivos, donde todavía no hay disponibles chips de Infinium, ya se han realizado trabajos para el estudio de la diversidad genética y la estructura de las poblaciones empleando otras plataformas de genotipado a media escala, como Golden Gate, lo que en ocasiones se lleva a cabo como un paso previo para la selección de genotipos representativos de la variación y su uso en amplios experimentos de resecuenciación o GBS (Blanca et al., 2012; Esteras et al., 2012, 2013).

Los SNP disponibles derivados de la resecuenciación de genotipos concretos pueden no ser siempre de utilidad para detectar variación si se amplía o reduce el pool genético (Sonah et al., 2013). En este caso necesitaríamos diseñar experimentos de resecuenciación, incluyendo un mayor número de genotipos representativos de la variación a estudiar. Además, para que una plataforma de genotipado sea de utilidad en un amplio espectro de estudios suelen incluirse SNPs con alelos frecuentes, lo que lleva a un sesgo en el estudio de los alelos raros (Perkel et al., 2008). Como hemos comentado, el avance de las técnicas de secuenciación está permitiendo utilizar directamente la resecuenciación genómica para la identificación de polimorfismos a gran escala. Los estudios actuales suelen incluir genotipos silves-

tres y cultivados. La comparación de sus patrones de variación hace posible la identificación de las regiones seleccionadas durante los procesos de domesticación y o posterior mejora de una forma más precisa que las plataformas de genotipado (Tang et al., 2010; Gross y Olsen, 2010).

El avance es muy rápido, y ya comienzan a publicarse los primeros estudios de resecuenciación genómica en hortalizas, generando mapas de variación a escala genómica. Por ejemplo Qi et al., (2013) describen la resecuenciación genómica de una colección nuclear de 115 entradas de pepino, generando una colección de más de 3,6 millones de SNPs, más de 300.000 indels y casi 600 variantes de presencia/ausencia (PAV). Un aspecto esencial de este estudio es la selección previa de las entradas analizadas. Las 115 entradas secuenciadas se seleccionaron a partir de una colección de 3.342 entradas de orígenes diversos a nivel mundial y se estima que representan un 80% de la variación existente en la colección global (Lv et al., 2012). Además, se resecuencia una variedad de un genotipo silvestre de *Cucumis sativus* var. *hardwickii*. La comparación de los resultados obtenidos con los resultados previos en cereales, parece indicar que las hortalizas aprovechadas por sus frutos han sufrido un mayor estrechamiento de su base genética durante la domesticación. En este estudio se identifican más de 100 regiones que han sufrido un sesgo durante el proceso de domesticación, una de las cuales contiene el gen involucrado en la pérdida del amargor del fruto, un suceso esencial para la domesticación de las cucurbitáceas.

En general, como ya hemos comentado, los últimos genomas que se han publicado ya incluyen, aparte de genoma de referencia, varios genomas de entradas diversas, que en muchos casos incluyen especies distintas, consideradas ancestros silvestres o de utilidad en la mejora, como es el caso de la sandía (Guo et al., 2013) o el pimiento (Kim et al., 2014). En este último la secuenciación de *Capsicum annum* y especies relacionadas ha permitido identificar genes relacionados con el carácter picante de esta hortaliza.

En especies no modelo son estrategias como RAD o GBS, basadas en la reducción previa de la complejidad genómica, las que permiten llevar a cabo en un sólo paso la identificación de los polimorfismos y el genotipado de las poblaciones (Barchi et al., 2011). En estos casos, no es necesario hacer una selección previa de los SNPs y es posible añadir nuevos genotipos, o incluso especies, sin necesidad de llevar a cabo una identificación previa de SNPs específicos de los mismos.

Los trabajos citados se orientan al estudio de la diversidad natural. Sin embargo, las estrategias de genotipado y secuenciación descritas también pueden emplearse para el estudio de la variación inducida en colecciones de mutantes. Así, la identificación mediante secuenciación de las variantes inducidas es una alternativa a la digestión enzimática, empleada habitualmente en los estudios de plataformas de TILLING, que ya ha sido validada en algunas colecciones de mutantes (Gilchrist et al., 2013). Recientemente, se han resecuenciado dos genotipos de la variedad de

tomate Microtom, identificándose más de 1 millón de SNPs entre esta variedad y el genoma de referencia. Este recurso será de utilidad para el análisis de las colecciones de mutantes derivadas de esta variedad (Kobayashi et al., 2014).

El estudio de la diversidad genética es también esencial para la mejora de frutales, siendo el incremento de la variabilidad un paso básico en muchos programas de mejora. Existen numerosos estudios orientados a la búsqueda de nuevas variantes en especies cultivadas o silvestres de los distintos géneros y especies de interés. Un ejemplo muy estudiado es el manzano, donde en 20 poblaciones de *Malus sieversii* procedentes de Xinjiang, China, se encontró más variabilidad dentro de cada población que entre las poblaciones, por lo que se concluyó que *M. sieversii* es una gran fuente de diversidad genética (Richards et al., 2009). En el género *Prunus* también existen ejemplos del uso de especies silvestres con el objetivo de crear líneas de introgresión que contengan regiones del genoma ventajosas dentro de un fondo genético comercial (Donoso et al., 2012) o que contengan genes de resistencia (Esmenjaud y Dirlewanger 2007; Quilot et al., 2004; Marandel et al., 2009).

Los marcadores tipo SSRs han sido los más utilizados para el estudio de la diversidad en colecciones de germoplasma de todas las especies frutales y especies relacionadas. Desde los primeros trabajos en el género *Prunus*, melocotonero, cerezo y albaricoquero (Aranzana, et al., 2003, Dirlewanger et al., 2002, Hormaza, 2002,) y en el género *Malus* y *Pyrus* (Silfverberg-Dilworth et al., 2006, Yamamoto et al., 2002) han sido varias las colecciones a nivel local y nacional que se han estudiado en prácticamente todos los frutales de hueso (Bouhadida et al., 2011) y pepita (Pina et al., 2014). Los últimos trabajos en frutales han incluido la diversidad con varias especies silvestres relacionadas con manzano, almendro, melocotonero, albaricoquero (Gross et al., 2012; Zeinalabedinia et al., 2008; Fernández i Martí et al., 2014; He et al., 2007). En otros géneros que incluyen especies de gran importancia económica también han se ha estudiado la variabilidad de especie relacionadas de *Citrus* (Noelle et al., 2006), *Vitis* (Wan et al., 2008, 2013) y *Olea* (Belaj et al., 2010). En otras especies frutales los trabajos más recientes basados en marcadores moleculares para estudios de germoplasma se han dado en frutales menores como en los géneros *Eriobotrya* (Gisbert et al., 2009) y *Dyospyrus* (Naval et al., 2010).

Los estudios basados en marcadores tipo SSRs han demostrado la baja diversidad genética presente en variedades comerciales de melocotonero en Europa y USA (Vives, 2012), debido a que se ha utilizado una limitada base genética en todos los programas de mejora tanto públicos como privados. Esta especie es un claro ejemplo en el que el progreso en mejora necesita incorporar nuevas fuentes de diversidad. Un estudio de una colección de germoplasma compuesta por 97 accesiones de diferentes orígenes geográficos demostró la clara ganancia aportada por la misma respecto al material manejado en los programas (Badenes et al., 2014).

El desarrollo de marcadores SSR derivados de genotecas EST también ha incrementado la disponibilidad de marcadores y su aplicación en estudios de diversidad

genética en *Citrus* (Luro et al., 2008), *Vitis* (Myles et al., 2011), *Rubus* (Lewers et al., 2008), *Malus* (Gasic et al., 2009), *Prunus* (Lazzari et al., 2008). La secuenciación parcial del ADN cloroplástico también ha servido para establecer relaciones genéticas en el género *Prunus* (Bielsa et al., 2014) o dilucidar las relaciones filogenéticas del género *Citrus* (Bausher et al., 2006).

A partir de la mejora de las técnicas de secuenciación se han empezado a utilizar marcadores tipo SNPs. En el marco del Consorcio Internacional de SNPs de Melocotonero (IPSC, del inglés, *International Peach SNP Consortium*), Verde et al. (2012) desarrollaron un chip de Infinium de aproximadamente 9K SNPs. Este chip se ha empleado para el genotipado de numerosas colecciones de variedades de melocotonero, cerezo, almendro y algunos híbridos, así como poblaciones de mapeo de *Prunus*, tanto intra como interespecificas (Vives, 2012, Sánchez et al., 2014; Romeu et al., 2014). Los chips 9K de Illumina II array se ha utilizado para evaluar el nivel de diversidad genética en el género *Malus* y ha demostrado un alto nivel de transferibilidad de este género al género *Pyrus*. En manzano, el consorcio internacional RosBREED SNP Consortium (IRSC) ha desarrollado un chip 9K basado en la tecnología Illumina con el fin de evaluar la diversidad alélica con fines de mejora (Chagné et al., 2012). Igualmente en vid también se han desarrollado SNPs que se han aplicado al genotipado de colecciones (Myles et al., 2011).

4.3. Identificación de genes y regiones genómicas involucradas en la variación de caracteres de interés

Uno de los principales objetivos de los avances genómicos en los cultivos de interés agrícola es la conexión entre el genotipo y el fenotipo. La mejora molecular llevada a cabo en las décadas pasadas se ha orientado a explorar la base genética de la variación, utilizando mapas genéticos construidos con un número limitado de marcadores (RFLPs, RAPDS, AFLPs, SSRs). El empleo de los mismos ha resultado exitoso para la localización y clonado de genes involucrados en características cualitativas, en general de alta heredabilidad y fenotipado sencillo. Sin embargo, muchos de los caracteres de interés agronómico presentan variación cuantitativa, debido a un control poligénico, de varios genes con efectos menores e interacciones epistáticas entre ellos, y a la influencia del ambiente en su expresión. El empleo de estos mapas poco densos no permitía obtener información precisa sobre el número y la localización de los QTLs (*Quantitative trait loci*) involucrados en el control de estas características complejas.

Tradicionalmente, las poblaciones empleadas para la construcción de mapas y la localización de genes o regiones cromosómicas asociadas con caracteres de interés han sido poblaciones biparentales. Hay muchos trabajos de este tipo, en los que sólo se pueden evaluar dos alelos a la vez, conforme al diseño del cruzamiento estudiado. Por este motivo, se han impuesto en los últimos años los métodos de mapeo por asociación, o mapeo por desequilibrio de ligamiento (LD). El LD es una

estimación de la asociación no aleatoria de marcadores a lo largo del genoma, no necesariamente en el mismo cromosoma. El desequilibrio de ligamiento decrece con la distancia genética, pero puede estar afectado por múltiples factores, entre ellos el sistema reproductivo (las especies autóгамas suelen tener mayor nivel de LD), la estructura poblacional, la existencia de fenómenos de epistasia o la ocurrencia de cuellos de botella durante la domesticación y los procesos de mejora. La intensidad del desequilibrio no es uniforme a lo largo del genoma y difiere bastante entre cultivos, reduciéndose en algunos en pocas kb y conservándose en otros durante varias Mb.

En los estudios de asociación no es necesario construir una población específica para cada carácter. Suelen utilizarse paneles de genotipos ya disponibles, bien caracterizados fenotípicamente en los que se pueda asociar un determinado fenotipo con una variante genética. Al disponer de métodos de genotipado de alto rendimiento, se pueden hacer análisis a lo largo de todo el genoma (*Genome-wide association study*, GWAS) e identificar regiones que pueden estar asociadas con variación en el carácter analizado. Las diferentes plataformas de genotipado mencionadas en el apartado anterior se han utilizado para estudios de asociación genética en varios cultivos, tanto los DArTs (Comadrán et al., 2009; Kulwal et al., 2012; Roy et al., 2010; Yu et al., 2011, 2012; Ziems et al., 2014) como los chip de Infinium (Famoso et al., 2011; Comadrán et al., 2012).

Una revisión de los artículos publicados en *Molecular Breeding*, en el periodo 2011-2014 (Cuadro 4.1) indica que: la mayoría de los artículos de arroz son en poblaciones biparentales y se dirigen a identificar resistencias a bacterias (*Xanthomonas oryzae*), hongos (*Magnaphorte oryzae*), distintos virus y plagas de insectos, y sólo unos pocos trabajos se centran en la búsqueda de QTLs para caracteres agronómicos. En cebada hay un número equivalente de artículos describiendo QTLs para caracteres agronómicos o de calidad maltera, y otros que buscan identificar resistencias a distintos hongos o virus utilizando poblaciones biparentales y también paneles de asociación. En el caso de maíz, la mayoría de los trabajos se centran en la búsqueda de QTLs para caracteres agronómicos (altura de planta, longitud de la mazorca, número de granos, rendimiento) en cruzamientos biparentales o el análisis de varias poblaciones a la vez. En este cultivo hay pocos trabajos de resistencia a enfermedades, entre los que destacan la identificación de QTL para resistencia a la acumulación de aflatoxina, la toxina producida por infección de *Aspergillus flavus* (Willcox et al., 2013). Aparecen trabajos en trigo dirigidos a identificar QTL para caracteres morfológicos y distintos componentes de calidad. Por último, hay muchos artículos describiendo la búsqueda de resistencias a enfermedades fúngicas como carbón, oidio, roya amarilla (*Puccinia striiformis*), roya del tallo (*P. graminis*), roya de la hoja (*P. triticina*), *Septoria*, y a distintos virus. Se debe destacar la identificación de marcadores ligados a resistencia a la raza Ug99, muy virulenta, de roya del tallo, en un estudio con 6 poblaciones biparentales de trigo (Lopez-Vera et al., 2014).

Cuadro 4.1.—Ejemplo de algunos QTLs localizados recientemente en mapas de cereales por especie y carácter cartografiado

Carácter	Especie	Referencia
Crecimiento radicular	arroz	Uga et al. 2013a
Floración y altura de la planta	arroz	Liu et al. 2013a
Rendimiento en sequía	arroz	Venuprasad et al., 2012
Resistencia a podredumbre bacteriana	arroz	Mizobuchi et al., 2013
Resistencia a virus	arroz	Li et al., 2013
Calidad maltera	cebada	Islamovic et al., 2014
Floración	cebada	Comadran et al., 2012
Resistencia a nemátodos	cebada	Galal et al., 2014
Resistencia a <i>Rhynchosporium</i>	cebada	Hofmann et al., 2013
Resistencia a roya (<i>P.hordei</i>)	cebada	Ziems et al., 2014
Tolerancia a frío	cebada	Fisk et al., 2013
Altura de planta	maíz	Teng et al., 2013
Altura de planta	maíz	Peiffer et al., 2014
Caracteres agronómicos	maíz	Xue et al., 2013
Contenido y composición aceite	maíz	Li et al., 2013b
Respuesta al. fotoperíodo	maíz	Hung et al., 2012
Resistencia a virus	maíz	Zambrano et al., 2014
Tolerancia a aluminio	maíz	Maron et al., 2013
Tamaño del grano	maíz	Liu et al., 2014
Tolerancia a sequía	trigo duro	Maccaferri et al., 2011
Resistencia a roya del tallo	trigo duro	Letta et al., 2013
Contenido en carotenoides	trigo blando	Ravel et al., 2013
Resistencia a roya del tallo	trigo blando	Lopez-Vera et al., 2014
Resistencia a plagas de insectos	trigo blando	Joukhadar et al., 2013
Resistencia a <i>Fusarium</i>	trigo blando	Kollers et al., 2013b
Rendimiento, peso hectolitrico	trigo blando	Bordes et al., 2014
Rendimiento	trigo blando	Lopes et al., 2013
Contenido proteína en grano	trigo blando	Bogard et al., 2013

Además de poblaciones biparentales, ha habido grandes avances en mapeo por asociación. No es posible describir todas las iniciativas en este sentido, pero como ejemplo se destacan las siguientes. Para contrarrestar el efecto de la sequía sobre el rendimiento del maíz, Xue et al., (2013) utilizaron 350 líneas puras genotipadas con SNPs, derivados de genes relacionados con sequía, y otros 56.000 SNPs no preseleccionados. En este trabajo se identificaron 33 genes asociados con distintos caracteres agronómicos. Entre ellos uno, que corresponde a un factor de transcripción, presentó asociaciones con la posición de la mazorca, el peso de grano y el tiempo a floración, masculina y femenina. En trigo, se han identificado asociaciones importantes para peso hectolítrico, fecha de floración y rendimiento, a partir de tres poblaciones desarrolladas con material élite de distintos programas de mejora, y genotipadas con 2500 marcadores DArT (Bordes et al., 2014). En cebada, se está utilizando mapeo por asociación para identificar nuevas resistencias a enfermedades fúngicas dentro de programas de mejora. Así se hizo para buscar resistencia estable a la roya, (*P. hordei*) dentro de material élite australiano (360 líneas genotipadas con 3244 marcadores DArT), donde se ha verificado la posición de genes de resistencia conocidos y se han detectado otros nuevos (Ziems et al., 2014). De forma similar, se han buscado QTL de resistencia a infección por *Fusarium* (Huang et al., 2013) o a la misma raza Ug99 de roya del tallo (Zhou et al., 2014), para su incorporación en programas de mejora en Estados Unidos.

En el caso específico del maíz, especie alógama, con bajo desequilibrio de ligamiento (2 kb), se necesitaría emplear un elevado número de marcadores para encontrar asociaciones entre marcadores y fenotipos con esa metodología. Una alternativa que se ha utilizado ha sido la obtención de una población de líneas emparentadas NAM, (Nested Association Mapping, McMullen et al., 2009). La población se construyó a partir de 25 líneas puras, elegidas maximizando la diversidad entre ellas, por cruzamiento con un mismo parental. Se obtuvieron 25 familias de líneas puras recombinantes (RIL), cada una de 200 individuos. La población NAM, de 5000 líneas ha sido genotipada y fenotipada extensivamente y es un recurso excelente para estimar la variación en caracteres muy distintos como fecha de floración (Buckler et al., 2009; Hung et al., 2012), tamaño y disposición de la hoja (Tian et al., 2011); resistencia a patógenos (Kump et al., 2011; Poland et al., 2011), o la composición química del grano. En todos esos trabajos se ha llegado a identificar genes importantes, con variación alélica clara y útiles en mejora. En cebada se está desarrollando una población similar, HEB-25, resultado del cruzamiento de la variedad élite Barke con 25 donantes de la especie silvestre, *H. vulgare ssp. spontaneum* (Schnaithmann et al., 2014).

Otros recursos genéticos especiales, para facilitar la localización e identificación de genes, son las poblaciones MAGIC, (Multiparent Advanced Generation Inter-cross, Cavanagh et al., 2008) desarrolladas a partir de cruzamientos entre múltiples parentales. Este tipo de poblaciones se están utilizando en arroz y trigo (Bandillo et al., 2013; Rebetzke et al., 2014). Los primeros resultados, de la población MAGIC

han permitido identificar genes conocidos y QTLs nuevos para tolerancia a estrés abiótico, resistencia a enfermedades y caracteres de calidad.

Los nuevos avances en secuenciación y genotipado permiten la construcción de mapas genéticos de alta densidad y la construcción de poblaciones más adecuadas para el mapado de características cuantitativas. En el Cuadro 4.2 se muestran QTLs identificados en mapas de especies hortícolas. Son numerosos los ejemplos en los que se orienta la identificación de SNPs para generar marcadores útiles para mapado, resecuenciando los parentales de poblaciones de mapado de

Cuadro 4.2.—Ejemplo de algunos QTLs localizados recientemente en mapas de algunos cultivos hortícolas por especie y carácter cartografiado

Carácter	Especie	Referencia
Patrón de Volátiles del fruto	tomate	Rambla et al., 2014
Contenido en Licopeno del fruto	tomate	Kimkade y Foolad, 2013
Resistencia a <i>Phytophthora infestans</i>	tomate	Chen et al., 2014
Número y tamaño del fruto	pimiento	Dwivedi et al., 2013
Contenido en pigmentos del fruto	pimiento	Brand et al., 2011
Contenido en capsaicina	pimiento	Reddy et al., 2014
Contenido en antocianina	berenjena	Barchi et al., 2011 y 2012
Presencia de espinas	berenjena	Frary et al., 2014
Resistencia a hongos y virus.	melón	Díaz et al., 2011
Tipo de maduración	melón	Vegas et al., 2013
Precocidad de floración y parámetros de calidad del fruto	calabacín	Esteras et al., 2013
Contenido en azúcares del fruto	sandía	Ren et al., 2014
Precocidad de floración	pepino	Lu et al., 2014
Resistencia a oidio	pepino	He et al., 2013
Control de la ginecencia	melón amargo	Matsumura et al., 2014
Características de semilla	judía	Yuste-Lisbona et al., 2014
Resistencia a la antracnosis	altramuz azul	Yang et al., 2012
Resistencia a mildiu	lechuga	Den Boer et al., 2013
Color de la semilla y estructura y color de la hoja	lechuga	Kwon et al., 2013
Precocidad de floración y resistencia a enfermedades	colza	Raman et al., 2014

interés. Por ejemplo, Barchi et al., (2011 y 2012), empleando RAD y secuenciación con illumina, ampliaron la colección disponible de microsátelites en berenjena, una de las especies de la familia de las solanáceas de mayor interés agronómico y con menor información genómica, generando la primera colección de marcadores de tipo SNPs que se utilizan para construir varios mapas genéticos, inter- e intra-específicos. Estos mapas se han empleado, entre otras cosas, para el estudio de la base genética del contenido en antocianina, identificando QTLs y genes candidatos. Estudios similares se han llevado a cabo en otras hortalizas (Esteras et al., 2012; Garcia-Mas et al., 2012). Recientemente, empleando un chip de SNPs de Affymetrix se ha construido un mapa de alta densidad en una población de RILs de lechuga, con más de 13.000 marcadores en más de 12.000 unigenes (Truco et al., 2013). El chip de Infinium de tomate se utilizó para generar 3 mapas a partir de poblaciones F_2 derivadas de cruzamientos interespecíficos, 2 de *Solanum lycopersicum* \times *S. pennellii*, y la tercera de *S. lycopersicum* \times *S. pimpinellifolium* (Sim et al., 2012a). Para mapear QTLs a gran escala en *Brassica napus* se ha empleado un chip de infinium, con más de 5.000 SNPs, en el genotipado de una población de líneas diplohaploides. El mapa construido se ha empleado para identificar *loci* asociados a precocidad de floración y resistencia a enfermedades (Raman et al., 2014).

Los mapas, al igual que ocurre en los estudios de diversidad, pueden construirse directamente resecuenciando una población adecuada de mapeo (Schneeberger y Weigel, 2011), aunque hay otros métodos que no requieren de la resecuenciación de la población completa de utilidad sobre todo cuando se buscan marcadores asociados a caracteres de control genético simple y fenotipado sencillo. En estos casos se acelera el proceso resecuenciando sólo individuos informativos con fenotipos contrastantes para el carácter. Así, Yang et al., (2012) describen la identificación de marcadores ligados a menos de 1 cM al gen de resistencia *Lanr1*, que confiere resistencia a la antracnosis causada por *Colletotricum lupini* en *Lupinus angustifolius*, combinando NGS con RAD secuenciando 20 individuos informativos y confirmando el ligamiento en una población extendida. Una alternativa más sencilla es la combinación de técnicas de secuenciación masiva con BSA (*Bulk Segregant Analysis*), sustituyendo el genotipado por la secuenciación de dos pools de plantas. Así el ligamiento entre los marcadores y el gen que controla el carácter se determina mediante el análisis de las frecuencias alélicas en ambos pools. Por ejemplo, Matsumura et al., (2014) combinan la resecuenciación con la técnica RAD de una población F_2 de *Momordica charantia* segregante para la ginoecia/monoecia, con el BSA de pools ginoicos/monoicos para acelerar la identificación de marcadores ligados a los genes que controlan la ginoecia.

Una vez identificados el gen o genes candidatos relacionados con procesos de interés, una forma de comprobar si están asociados al mismo es determinar su expresión diferencial en distintas condiciones. La abundancia diferencial de distintos transcritos medida por ejemplo con qRT-PCR o microarrays ha sido ampliamente utilizada en décadas anteriores. La secuenciación masiva, concretamente el RNA-

seq, puede también aplicarse a la cuantificación de la expresión génica. Estos estudios de expresión con RNA-seq están sustituyendo a los microarrays (Martin et al., 2013), ya que presentan un rango más amplio de cuantificación y permiten extender el estudio a transcritos y variantes de splicing no conocidas previamente, incluyendo transcritos raros, que son difíciles de identificar con otras estrategias. Esta información permite mejorar las anotaciones de los genomas, siendo las variantes de splicing muy útiles para la identificación de las uniones exón/intrón. Sin embargo, el RNA-seq para estudios de expresión no está exento de limitaciones, como las dificultades de un correcto ensamblaje y anotación del gran número de secuencias cortas que se generan para cada fragmento y el sesgo que se puede producir durante la construcción de las genotecas para secuenciar.

Algunos de los genes que se han identificado como responsables de la variación de QTLs son factores de transcripción (Powell et al., 2012). Una forma de encontrar factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes es mediante QTLs de expresión (e QTLs), cuando la variación en una determinada región genómica resulta en cambios en la abundancia de determinados transcritos (Holoway y Li, 2010). La mejora se ha orientado fundamentalmente a la identificación de factores en *cis* (polimorfismos nucleotídicos o presencia o ausencia del gen involucrado en el carácter), pero también resulta imprescindible el estudio de factores en *trans* que puedan regular la expresión de estos genes. Los estudios de expresión basados en RNA-seq pueden contribuir a avanzar en este campo.

A pesar de que el empleo de nuevas poblaciones y el incremento de la densidad de los mapas genéticos han incrementado la eficiencia en la detección de QTLs, con marcadores asociados útiles para la selección asistida, en muchos casos esta estrategia no ha llevado a la identificación de los genes responsables de los mismos (Salvi y Tuberosa, 2005). Como se ha comentado en el caso de los cereales, una alternativa al mapado en poblaciones derivadas del cruce de parentales seleccionados son los estudios de asociación a escala genómica (GWAS) (Rafalski et al., 2011; Duran et al., 2010). Los estudios de asociación explotan la variabilidad natural generada por sucesos de recombinación ocurridos en múltiples generaciones en una población determinada.

Uno de los pasos preliminares para abordar un estudio de asociación es el análisis a escala genómica del desequilibrio de ligamiento, ya comentado anteriormente. Esta información permite optimizar las estrategias de mejora, ya que la existencia de bajos niveles de desequilibrio permite llevar a cabo con éxito estudios de GWA, pero como contrapartida requiere un número muy elevado de marcadores para saturar el genoma e identificar las asociaciones con una resolución óptima. Los elevados niveles de desequilibrio permiten rastrear el genoma con un menor número de marcadores, pero la resolución del mapado será menor. Los marcadores que se encuentren ligados serán útiles en procesos de selección asistida por marcadores, pero será difícil el clonaje posicional de los genes asociados a los mismos.

Un ejemplo de cómo el nivel y la distribución del desequilibrio pueden afectar a los resultados lo tenemos en tomate, una especie con un alto desequilibrio de ligamiento, lo que dificulta el mapado posicional. Ranc et al. (2012) llevaron a cabo con éxito la identificación de asociaciones significativas con el peso del fruto, el número de lóculos y el contenido en sólidos solubles en tomate. Para lograr una mayor resolución en el mapado por asociación emplearon *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, que presenta una estructura genómica mixta entre *S. lycopersicum* y su ancestro silvestre *S. pimpinellifolium*, y en la que se ha encontrado un menor nivel de desequilibrio de ligamiento.

Otros estudios que analizan una mayor diversidad de material vegetal, empleando entradas de *S. lycopersicum*, *S. cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*, identifican diferencias en la extensión del desequilibrio de ligamiento en regiones específicas, relacionadas con introgresiones de especies silvestres en especies cultivadas, llevadas a cabo durante el proceso de mejora (Sim et al., 2012b; Xu et al., 2013; Causse et al., 2013). Estos resultados deben ser tenidos en cuenta en los estudios de asociación. Empleando estrategias similares, Kwon et al. (2013) describen un estudio empleando 300 líneas homocigotas de lechuga en el que identifican marcadores asociados a caracteres de color de la semilla, y estructura y color de la hoja, útiles para selección asistida.

En lugar de estudiar la asociación a escala genómica, el estudio puede orientarse a la asociación de mutaciones en genes candidatos. Reddy et al. (2014) llevan a cabo un estudio de asociación para identificar SNPs relacionados con el contenido en capsicina en pimiento. Partiendo de 4 genes candidatos identifican un conjunto de SNPs en el promotor de uno de ellos, relacionados de forma consistente con la variación en el contenido en capsicina de esta hortaliza.

Una de las principales estrategias que se ha empleado en especies arbóreas para encontrar asociación entre genotipo y fenotipo ha sido la elaboración de mapas genéticos con la identificación de QTLs o regiones del genoma ligadas a los caracteres de interés. En especies arbóreas la mayor parte de los mapas realizados conciernen a especies frutales de interés económico como son los frutales de hueso o género *Prunus* y frutales de pepita o género *Malus*. Dada la alta heterocigosidad de estas especies y la herencia cuantitativa o poligénica de muchos de los caracteres de interés, se ha conseguido determinar en la mayoría de los casos las zonas del genoma ligadas, pero no con la suficiente precisión para poder realizar mejora asistida. Sin embargo, estos resultados suponen puntos de partida para que a través de los genomas publicados y los marcadores SNPs disponibles que permiten saturar las regiones diana, obtener marcadores y potenciales genes candidatos para MAS.

Uno de los caracteres que ha despertado más interés en los últimos años es el de las necesidades en frío para la salida de la latencia, así como caracteres fenológicos, como fechas de floración y maduración del fruto, pues comprenden el

mayor factor limitante para la expansión de los frutales en zonas cálidas y a su vez representan la base genética sobre la que actuar en condiciones de cambio climático. Los primeros trabajos se realizaron en *Populus* (Frewen et al., 2000) y posteriormente en especies del género *Prunus*. En melocotonero se localizó un mutante que no entraba en latencia (evergrowing), el mapeo posicional de esta mutación determinó que se debía a una delección en un tandem de genes MADS-box (Bielenberg et al., 2008). Posteriormente, mediante análisis de QTLs se determinó que el mayor QTL asociado a necesidades en frío y fecha de floración se localizaba en el cromosoma 1 de albaricoquero (Okolulu et al., 2009) y melocotonero (Fan et al., 2010), y ambos se co-localizaban con los genes MADS-box. Esta localización se ha corroborado en un mapa posterior de melocotonero, que además incluye otros caracteres fenológicos (Romeu et al., 2014). A partir de la secuencia de individuos extremos para el carácter salida de latencia se identificaron polimorfismos y potenciales genes candidatos en 3 de los más importantes QTLs descritos ligados a este carácter (Zhebentayeva et al., 2014). Similares QTLs, aunque con diferencias en la contribución individual, se han detectado en otras especies de *Prunus* (Campoy et al., 2011; Sánchez-Pérez et al., 2012; Dirlenwanger et al., 2012) y en *Malus* (Celton et al., 2011). Los primeros análisis de QTLs ligados a caracteres de calidad del fruto se realizaron en melocotonero. Posteriormente, se han estudiado el efecto pleiotrópico entre caracteres de calidad y fecha de maduración (Eduardo et al., 2011). En melocotonero se han desarrollado mapas de alta densidad de SNPs obtenidos por secuenciación de los parentales para determinar QTLs de calidad del fruto (Martínez-García et al., 2013). La alta densidad de marcadores ha permitido hacer hipótesis sobre los potenciales genes candidatos. En albaricoquero se han obtenido QTLs para la arquitectura del árbol, fecha de brotación y características del fruto (Socquet-Juglard et al., 2013). En manzano se han realizado análisis de QTLs en 20 poblaciones que raramente comparten parentales. Entre los primeros trabajos se encuentra el de Liebhard et al. (2003) que cartografió numerosos caracteres de calidad del fruto y fenología. Otros trabajos estudiaron caracteres como la firmeza y características organolépticas (Cuadro 4.3). La resistencia a patógenos también es una prioridad en la mejora. Se han identificado algunas de herencia mendeliana que han permitido el establecimiento de marcadores y mejora asistida (Esmenjaud y Dirlenwanger, 2007), mientras que en otras de herencia cuantitativa, se han identificado QTLs, lo que comporta limitaciones para la selección asistida por marcadores (Cuadro 4.3). Otra opción es la selección a partir del genoma o GS (genomic selection), una alternativa viable en aquellas especies que cuentan con genomas conocidos y dispongan de SNPs para genotipar. Kumar et al. (2012) utilizaron el chip 8K de manzano para identificar polimorfismos ligados a caracteres del fruto que permitan la mejora asistida.

La identificación de los genes subyacentes a estos QTLs se ve facilitada por los estudios de expresión de genes candidatos. Se han llevado a cabo estudios de expresión con Microarrays conteniendo unigenes y ESTs, para identificar candidatos de calidad de fruto en *Prunus*. El primer microarray empleado fue el uPEACH1.0,

Cuadro 4.3.—Ejemplo de algunos QTLs localizados recientemente en mapas de algunos cultivos leñosos por especie y carácter cartografiado

Carácter	Especie	Referencia
Necesidades en frío	melocotonero	Fan et al., 2010, Romeu et al., 2014 Zhebentayeva et al., 2014
Necesidades en frío	almendro	Sánchez Pérez et al., 2012
Necesidades en frío	albaricoquero	Olokulu et al., 2009
Fenología de yemas	manzano	Celton et al., 2011
Fenología de yemas	melocotonero, cerezo	Dirlwanger et al., 2012
Latencia de yemas	chopo	Chen et al., 2002
Cuajado de yemas	chopo	Fabbrini et al., 2012
Latencia de yemas	melocotonero	Blaker et al., 2013
Fenología	albaricoquero	Campoy et al., 2011 Soquet-Juglard et al., 2013
Calidad del fruto	almendro	Sánchez Pérez et al., 2010 Font i Forcada et al., 2012 Fernández i Martí et al., 2013
Calidad y características del fruto	melocotonero	Martinez-Garcia et al., 2013 Eduardo et al., 2011 Quilot et al., 2004
Características del fruto	vid	Cabezas et al., 2006
Calidad del fruto y fenología	manzano	Liebhard et al., 2003 Kenis et al., 2008 Potts et al., 2014
Resistencia al fuego bacteriano	manzano	Peil et al., 2007, Gardiner et al., 2012a
Resistencia a <i>Xanthomonas</i>	melocotonero	Yang et al., 2013
Resistencia a oidio	manzano, melocotonero	Calenge y Durel 2006 Lalli et al., 2005
Resistencia a moteado	peral	Pierantoni et al., 2007
Resistencia al virus de la tristeza	naranja	Asins et al., 2004
Tolerancia a clorosis	vid, <i>Prunus</i>	Bert et al., 2013, Gonzalo et al., 2012

con 4,806 oligonucleotidos (Trainotti et al., 2006) con el cual se identificaron genes involucrados en la fase climatérica, así como en calidad post-cosecha en melocotonero (Ziliotto et al., 2008) y albaricoquero (Manganaris et al., 2011). El siguiente microarray Chill-Peach fue desarrollado para estudiar daños por frío en melocotonero (Ogundiwin et al., 2008), conteniendo 4.468 unigenes de mesocarpo. Este último microarray ha sido utilizado para identificar distintos genes involucrados en la tolerancia a la asfixia radicular en *Prunus* (Rubio-Cabetas et al., 2010). En chopo se han identificado genes diferenciales con respecto a *Arabidopsis* (Christianson et al., 2010) en respuesta a hypoxia, e igualmente mediante la comparación con *Arabidopsis* se han identificado dos genes en respuesta a estreses abióticos en *Prunus* (Almada et al., 2013). Otra técnica que se ha utilizado para identificar genes asociados a caracteres cuantitativos ha sido la hibridación sustractiva por supresión (SSH). Esta técnica, combinada con el empleo de microarrays, permitió determinar los genes relacionados con la salida del reposo invernal en melocotonero (Leida et al., 2010) y la identificación de genes que se inducían ante infecciones de fuego bacteriano (Noreli et al., 2009). En manzano se han identificado genes en respuesta a la sequía por medio de una genoteca de raíz SSH (Kilian et al., 2007). En cítricos Yun et al. (2012) estudiaron la expresión diferencial de genes que intervienen en el mantenimiento de la calidad del fruto en post-cosecha. Por último, los estudios de asociación se han desarrollado en melocotonero con SNPs asociados a fecha de cosecha, contenido en flavonoides, sorbitol, azúcares totales y firmeza (Picañol et al., 2013; Font i Forcada et al., 2013).

4.4. Empleo de la información genética y genómica para el desarrollo eficiente de cultivares mejorados

Una de las primeras aplicaciones de las nuevas tecnologías genómicas con mayor impacto en mejora es el desarrollo de protocolos para selección asistida por marcadores (MAS), que facilitan la introgresión de *loci* de interés en materiales élite mediante retrocruzamiento. Un ejemplo fue la introducción de un QTL para tolerancia a la inmersión (sumergimiento) en arroz (*Sub1*), lo que supuso mejorar los rendimientos en una zona muy amplia de Asia (Septiningsih et al., 2009). La mejora privada, especialmente en maíz, utiliza rutinariamente esta metodología. En otros cereales como cebada y trigo, donde la mejora pública es importante, se han diseñado marcadores funcionales, del propio gen o asociados a genes que controlan caracteres morfológicos, agronómicos, o de resistencia a enfermedades que pueden ser utilizados para diferenciar variedades, o facilitar el seguimiento de determinados alelos en programas de mejora (Cockram et al., 2012; Liu et al., 2012). Además, en el caso específico de trigo, se están implementando protocolos específicos para selección asistida por marcadores para genes de resistencia a hongos (royas, oídio, *Fusarium*, etc.), virus, insectos, calidad de grano (alto contenido de proteínas, contenido en amilosa y amilopectina, firmeza del gluten, color de la semolina, etc.), así como otros marcadores para caracteres agronómicos (genes de

enanismo y de vernalización). Es una herramienta en constante desarrollo, a la que se puede acceder en la dirección <http://maswheat.ucdavis.edu/Index.htm>.

La selección asistida con marcadores funciona bien para caracteres monogénicos, en retrocruzamientos, o en la piramidización de unos pocos genes, como se ha hecho en arroz (Luo et al., 2013; Steele et al., 2013) o maíz (Yang et al., 2013).

Una vez que se han identificado SNPs específicos para un gen, o asociados a un determinado carácter, para su aplicación en mejora se está empezando a utilizar el sistema KASP (Kompetitive allele specific PCR), desarrollado por KBioscience y ofrecido por la empresa LGCGenomics. Este sistema permite genotipar a pequeña escala, con un diseño específico para cada polimorfismo. Es el sistema de genotipado utilizado por el CIMMYT de forma rutinaria, con un coste menor que los de otras plataformas (Semagn et al., 2014). Además, ha sido el sistema elegido para convertir SNPs en marcadores útiles para mejora en once cultivos, entre los que se encuentran arroz, maíz y trigo, en la iniciativa del Generation Challenge Programme.

En el caso de caracteres cuantitativos, controlados por muchos genes con efecto pequeño, este método es ineficaz. Una metodología nueva en plantas, que puede tener gran impacto en la mejora de cereales, es la selección genómica (GS, *Genome Selection*), (Heffner et al., 2009), combinando información fenotípica y genotípica. En selección genómica se estima el valor de un individuo basado en su información genética, teniendo en cuenta todos los marcadores a la vez y no sólo unos pocos como se hace en MAS. La base de la selección genómica está en la implementación de nuevas plataformas de genotipado, y en los nuevos métodos de secuenciación, capaces de generar un elevado número de marcadores que cubran todo el genoma. En selección genómica se utilizan dos poblaciones distintas, por un lado está la población de entrenamiento ("training"), que es genotipada a escala genómica con un número elevado de marcadores y fenotipada con detalle en ensayos repetidos para los caracteres de interés en el programa. La información derivada de la población de entrenamiento es la que se utiliza para seleccionar candidatos en función de su genotipo en la población de selección. El éxito de la selección genómica no sólo se basa en los avances genómicos, sino que también requiere del desarrollo de técnicas de fenotipado, fundamentalmente para los caracteres cuantitativos. Así, la fenómica (phenomics), tecnología de fenotipado a gran escala, es esencial para establecer estos modelos y llevar a cabo con éxito los procesos de GS (Toppa et al., 2013).

Aunque es una metodología reciente en plantas, ya se está aplicando en la práctica. Los primeros estudios en maíz y trigo utilizan, en la población de entrenamiento, 300-400 líneas genotipadas con 30.000-100.000 SNPs en combinación con unos 1300-1700 DArT (Poland et al., 2012b; Crossa et al., 2013, 2014; Heslot et al., 2013; Lado et al., 2013), a partir de los cuales hay que ajustar los modelos para predecir el potencial genético de distintos individuos, sin tener que evaluarlos fenotípicamente en campo.

Como queda patente en los puntos anteriores, se está avanzando mucho en el establecimiento de la conexión entre genotipo y fenotipo. Como consecuencia de los estudios de ligamiento llevados a cabo en numerosas hortalizas se dispone de muchos marcadores, basados en el propio gen o ligados a genes de resistencia a enfermedades causadas por virus, hongos o bacterias (Foolad y Panthee, 2012). Por ejemplo, en tomate se dispone de marcadores para la resistencia a numerosos virus, hongos, bacterias y nematodos (*Meloidogyne*). A pesar de su disponibilidad sólo algunos parecen utilizarse de forma rutinaria para la selección asistida por marcadores en los programas de mejora. Entre estos destacan la incorporación en material comercial de resistencia a *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* (genes *l*), a *Phytophthora infestans* (genes *Ph*), a *Cladosporium fulvum* (genes *Cf*), a *Leveillula taurina* (gen *Lv*), a *Verticillium* (genes *Ve*), a *Pseudomonas syringae* (genes *Pto*) o a *Xanthomonas* (genes *Xv*). Aunque en algunos casos ha sido necesario combinar la selección asistida por marcadores con una selección fenotípica para conseguir mayores niveles de resistencia. La selección más eficiente por marcadores ha sido la resistencia a virus, concretamente al Tobamovirus ToMV (Tomato Mosaic Virus), al geminivirus, TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) y al Tospovirus TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus), permitiendo una selección no sólo más rápida, sino también más económica que el fenotipado por resistencia.

Situaciones similares a la de tomate se encuentran en otras hortalizas. Por ejemplo, en el caso del pimiento donde la selección asistida por resistencia a *Phytophthora* y *Colletotrichum* y a virus, como CMV (Cucumber Mosaic Virus), TMV (Tobacco Mosaic Virus), PepMoV (Pepper Mottle Virus) y TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus), es posible, pero también por características de calidad, por ejemplo utilizando marcadores ligados al gen *Pun1*, involucrado en la síntesis de capsinoides, compuestos similares a los capsicinoides, pero que no pican (Garcés-Claver et al., 2007; Tanaka et al., 2014). En el caso del melón, existen marcadores de utilidad probada para resistencias a áfidos (gen *Vat*), al MNSV (Melon Necrotic Spotted Virus, gen *nsv*), a distintas razas de *Fusarium oxysporum* f *melonis* (genes *Fom*), y también a parámetros relacionados con la producción y la calidad, como la determinación sexual (gen *a*, andromonoecious) o el color de la carne (gen *Wf*) (Fernández-Trujillo et al., 2012; Díaz et al., 2011).

La selección asistida de estas características monogénicas ha sido más frecuente y eficiente para el desarrollo de nuevos cultivares que la de características de genética compleja, fundamentalmente por la falta de estabilidad de los QTLs al cambiar de población y por el arrastre de ligamiento de características desfavorables. Aunque la mejora para caracteres de calidad, tales como el sabor y el dulzor basada en los QTLs disponibles no ha sido demasiado exitosa, sí se han logrado selecciones adecuadas en la mejora de caracteres cuantitativos relacionados con la resistencia a enfermedades. Por ejemplo, en el caso de la resistencia a *Phytophthora*, donde existe la posibilidad de selección de resistencias monogénicas específicas de raza, se han identificado QTLs no específicos de raza en entradas de

Solanum habrochaites. Sin embargo, su uso en selección asistida no se ha llevado a cabo con éxito debido a que arrastran por ligamiento características desfavorables (como madurez tardía y excesivo tamaño de la planta), por lo que se requiere separar estos efectos previamente, por ejemplo mediante el desarrollo de NILs antes de utilizarlo. A pesar del esfuerzo dedicado a identificación de QTLs asociados a la mejora de la resistencia a estreses abióticos, salinidad, sequía o bajas temperaturas, todavía no se ha conseguido una mejora efectiva de estos caracteres basada en marcadores.

En relación con lo comentado anteriormente, el enorme esfuerzo invertido en la identificación de QTLs no ha podido ser suficientemente explotado, debido fundamentalmente a las limitaciones de los QTLs identificados empleando determinados tipos de poblaciones. Por ello, para poder llevar a cabo una mejora asistida por marcadores de características cuantitativas es esencial el empleo de poblaciones adecuadas. Las nuevas técnicas genómicas están permitiendo avanzar en el desarrollo de poblaciones que son a la vez herramientas de estudio de caracteres cuantitativos y herramientas de combinación de variantes genéticas para el desarrollo de nuevos cultivares. Entre estos tipos de poblaciones se encuentran las colecciones de líneas de introgresión, en las que, mediante un retrocruzamiento asistido con marcadores a escala genómica, se introducen en un genoma cultivado, a ser posible de una variedad de élite, introgresiones únicas de un genoma exótico. De esta forma, la colección completa de líneas representa el genoma exótico en su totalidad. La separación de segmentos genómicos individuales, minimiza los fenómenos de epistasia entre QTLs, que dificultan su detección y la introgresión de los mismos en fondos genéticos de elite, valida su expresión en los mismos. El empleo de este tipo de poblaciones está permitiendo mejorar la selección por marcadores de caracteres cuantitativos.

Entre las especies frutales la mejora asistida destaca en el manzano y el melocotonero, tanto por su importancia económica como por la mayor disponibilidad de recursos (mapas de ligamiento, secuencia del genoma y plataformas de SNPs), en ambas especies para resistencia a patógenos y para algunas características de calidad del fruto.

Para la resistencia al moteado en manzano, causado por el hongo *Venturia inaequalis*, se identificó el gen Vf posteriormente renombrado Rvi6, localizado en el GL1 donde se identificaron 3 genes candidatos del tipo RGA con un dominio LLR. Después se identificó un nuevo gen de resistencia como Rvi15 o Vr2 y se cartografió en una zona de 48,7 Kb, determinado por la presencia de 3 genes candidatos del tipo TIR-NBS-LRR (Galli et al., 2010). En la actualidad se han identificado hasta un total de 8 genes de resistencia alternativos al Vf por lo que se requiere la pirimidización de genes mayores (Gessler y Pertot, 2012). Se dispone de un total de 14 SSRs organizados en 4 multiplex que permiten el análisis de 9 genes de resistencia mayores (Patocchi et al., 2009). A partir del genotipado con las plataformas de SNPs de RosBreed existen además SNPs disponibles para la mejora asistida de

resistencia al moteado, concretamente para los genes Rvi6 y Rvi2. Los marcadores que permiten seleccionar caracteres de fruto en manzano son la acidez mediante el SNP2 (ss475876558), textura crujiente, Crispness-SNP1 (ss475881704) y conservación post-cosecha (ACO_FEM_cg_4 ACO_FEM_cg_5). En melocotonero se dispone de marcadores ligados al carácter melocotón/nectarina, color de la pulpa y forma del fruto (Picañol et al., 2013), el tipo de fruto basado en polimorfismos en un intrón de la endoPG (Peace et al., 2005), SSRs asociados a alto contenidos en sorbitol, fenoles y azúcares (Font i Forcada et al., 2013), y una inserción en un exón del gen candidato ppa008301m que cosegrega con la fecha de maduración y permite desarrollar marcadores de selección (Pirone et al., 2013).

En los programas de mejora de patrones para melocotonero la resistencia a nematodos agalladores *Meloidogyne spp.* es uno de los objetivos prioritarios (Rubio-Cabezas et al., 2012). El gen Ma de resistencia a *M. arenaria* del ciruelo mirabolán (*P. cerasifera*) pertenece al grupo de genes TIR-NBS-LRR (Claverie et al., 2011) y está localizado en el GL7 donde se dispone de dos marcadores genómicos NSCALF2 (dentro del primer intron) y CT3-4N (dentro de la región C-terminal) (Esmenjaud y Dirlewanger 2007, Claverie et al., 2011). Otro gen RMia (R) confiere resistencia a *M. incognita* y *M. arenaria* que co-segregan en otros genotipos, 'Nemared', 'Shalil' y 'Juseitou' en el GL 2. Para este gen se dispone de 5 marcadores SSR específicos para 'Nemared'. Se ha cartografiado en una distancia de 92-kb que comprende 4 genes candidatos para el gen de la familia TNL (Duval et al., 2014). El polimorfismo de los tres marcadores más estrechamente ligados son dos SNP_APP92, SNP_APP91, y un SSR, y discriminan perfectamente las accesiones R y S, sugiriendo que al menos la fuente de R de 'Nemared', 'Nemaguard' y 'Shalil' comparte un ancestro común de resistencia.

Para el virus de la sharka sólo se han identificado fuentes de resistencia en albaricoquero. Aunque se identificó el locus PPVres (Vera et al., 2011), la comparación con la secuencia disponible del melocotonero permitió la obtención de marcadores ligados. En la actualidad se cuenta con 3 marcadores SSR: PGS1.21, PGS1.23 y PGS1.24 que muestran diferencias alélicas ligadas a la resistencia a sharka y que permiten realizar la selección precoz de las descendencias (Soriano et al., 2012). Por medio de mapeo posicional se han identificado genes candidatos (Zuriaga et al., 2013).

La autoincompatibilidad es otro carácter en el que se han invertido muchos esfuerzos y en el que se realiza mejora asistida por marcadores. Este carácter (SI) está controlado por un locus multialélico basado en la actividad de las RNAsas del pistilo. En el género *Prunus* la región codificante de la RNAsa está interrumpida por dos intrones que varían en tamaño, lo que permite identificar diferencias alélicas por secuenciación parcial de dichos intrones y posterior diseño de cebadores. Esta metodología ha permitido diferenciar por medio de PCR convencionales los distintos alelos y realizar mejora asistida para la selección de los alelos de autoincompatibilidad o para determinar la fertilidad de cruces intervarietales en los pro-

gramas de mejora de almendro (Fernandez i Marti et al., 2010); cerezo (Cachi y Wünsch, 2014), albaricoquero (Vilanova et al., 2005), manzano (Matsumoto et al., 2007), peral (Sanzol, 2009) y níspero (Gisbert et al., 2009).

4.5. Referencias

- Akbari M et al. 2006. Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1409-1420.
- Almada R et al. 2013. Class 1 non-symbiotic and class 3 truncated hemoglobin-like genes are differentially expressed in stone fruit rootstocks (*Prunus* L.) with different degrees of tolerance to root hypoxia. *Tree Genet. Genomes* 9: 1051-1063.
- Aranzana M et al. 2003. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theor. Appl. Genet.* 106: 819-825.
- Asins MJ et al. 2004. QTL analysis of citrus tristeza virus-citradia interaction. *Theor. Appl. Genet.* 108: 603-611.
- Badenes ML et al. 2014. A peach germplasm collection for increasing the genetic diversity in European breeding programs. *Acta Hort.* (in press).
- Baird NA et al. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One*: e3376.
- Bandillo N et al. 2013. Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice* 6: 1-15.
- Barchi L et al. 2011. Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing. *BMC Genomics* 12: 304.
- Barchi L et al. 2012. A RAD tag derived marker based eggplant linkage map and the location of QTLs determining anthocyanin pigmentation. *PLoS One* 7: e43740.
- Bausher M. et al. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biol.* 6: 21.
- Belaj A et al. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Hort.* 124: 323-330.
- Bert PF et al. 2013. Mapping genetic loci for tolerance to lime-induced iron deficiency chlorosis in grapevine rootstocks (*Vitis* sp.). *Theor. Appl. Genet.* 126: 451-473.
- Bielenberg DG et al. 2008. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genet. Genomes* 4: 495-507.
- Bielsa B et al. 2014. Detection of SNP and validation of a SFP InDel (deletion) in inverted repeat region of the *Prunus* species chloroplast genome. *Scientia Hort.* 168: 108-112.
- Blaker K. et al. 2013. Identification of QTLs controlling seed dormancy in peach (*Prunus persica*) *Tree Genet. Genomes* 9: 659-670.
- Blanca J et al. 2012. Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. *BMC Genomics* 13: 280.
- Bogard M et al. 2013. Identifying wheat genomic regions for improving grain protein concentration independently of grain yield using multiple inter-related populations. *Mol. Breed.* 31: 587-599.

- Bordes J et al. 2014. Genome-wide association mapping of three important traits using bread wheat elite breeding populations. *Mol. Breed.* 33: 755-768.
- Bouhadida M et al. 2011. Genetic variability of introduced and local Spanish peach cultivars determined by SSRs markers. *Tree Genet. Genomes* 7: 257-270.
- Brand A et al. 2011. pc8.1, a major QTL for pigment content in pepper fruit is associated with variation in plastid compartment size. *Planta* 235: 579-588.
- Brenchley R et al. 2012. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491: 705-710.
- Buckler ES et al. 2009. The genetic architecture of maize flowering time. *Science* 325: 714-718.
- Cabezas JA et al. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome* 49: 1572-1585.
- Cachi AM, Wünsch A. 2014. S-genotyping of sweet cherry varieties from Spain and S-locus diversity in Europe. *Euphytica* 197: 229-236.
- Calenge F, Durel CE. 2006. Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments. *Mol. Breed.* 17: 329-339.
- Campoy JA et al. 2011. Inheritance of flowering time in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait loci (QTL) using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 29: 404-410.
- Causse M et al. 2013. Whole genome resequencing in tomato reveals variation associated with introgression and breeding events. *BMC Genomics* 14: 791.
- Cavanagh CR et al. 2008. From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 215-221.
- Cavanagh CR et al. 2013. Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 8057-8062.
- Celton JM et al. 2011. Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes. *New Phytol.* 192: 378-392.
- Chagné D et al. 2012. Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS One* 7(2): e31745.
- Chao S et al. 2010. Population- and genome-specific patterns of linkage disequilibrium and SNP variation in spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics* 11: 727.
- Chen A L et al. 2014. Reassessment of QTLs for late blight resistance in the tomato accession L3708 using a restriction site associated DNA (RAD) linkage map and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *PloS one* 9: e96417.
- Chen TH et al. 2002. Molecular genetic analysis of dormancy-related traits in poplars. *Weed Sci.* 50: 232-240.
- Chia JM et al. 2012. Maize HapMap2 identifies extant variation from a genome in flux. *Nat. Genet.* 44: 803-807.
- Christianson JA et al. 2010. Comparisons of early transcriptome responses to low-oxygen environments in three dicotyledonous plant species. *Plant Signal. Behav.* 5: 1006-1009.
- Claverie M et al. 2011. The Ma gene for complete-spectrum resistance to *Meloidogyne* species in *Prunus* is a TNL with a huge repeated C-terminal post-LRR region. *Plant Physiol.* 156: 779-792.
- Close TJ et al. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10: 582.

- Cockram J et al. 2012. Evaluation of diagnostic molecular markers for DUS phenotypic assessment in the cereal crop, barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 125: 1735-1749.
- Comadran J et al. 2009. Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured *Hordeum vulgare* association-mapping population for the Mediterranean basin. *Theor. Appl. Genet.* 119: 175-187.
- Comadran J et al. 2012. Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nat. Genet.* 44: 1388-1392.
- Crossa J et al. 2007. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177: 1889-1913.
- Crossa J et al. 2013. Genomic prediction in maize breeding populations with genotyping-by-sequencing. *G3* 3: 1903-1926.
- Crossa J, et al. 2014. Genomic prediction in CIMMYT maize and wheat breeding programs. *Heredity* 112: 48-60.
- Cuppen E. 2007. Genotyping by allele-specific amplification (KASPar). *Cold Spring Harb Protoc.* 4841.
- den Boer E et al. 2013. Fine mapping quantitative resistances to downy mildew in lettuce revealed multiple sub-QTLs with plant stage dependent effects reducing or even promoting the infection. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2995-3007.
- Deschamps et al. 2012. Genotyping by sequencing in plants. *Biology* 1: 460-483.
- Diaz A et al. 2011. A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol.* 11: 111.
- Dirlewanger E et al. 2002. Development of microsatellite markers in peach and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry. *Theor. Appl. Genet.* 105: 127-138.
- Dirlewanger E et al. 2012. Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity* 109: 280-292.
- Donoso JM et al. 2012. Towards the enrichment of the peach gene pool with alleles from wild species: the collection of peach-almond introgression lines. 6th Int. Rosaceae Genomics Conf., pp40.
- Duran C et al. 2010. Future tools for association mapping in crop plants. *Genome* 53: 1017-1023.
- Duval H. et al. 2014. High-resolution mapping of the *RMia* gene for resistance to root-knot nematodes in peach. *Tree Genet. Genomes* 10: 297-306.
- Dwivedi N et al. 2013. QTL mapping for important horticultural traits in pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Plant Biochem. Biotechnol.* (DOI: 10.1007/s13562-013-0247-1)
- Eduardo I et al. 2011. QTL analysis of fruit quality traits in two peach intraspecific populations and importance of maturity date pleiotropic effect. *Tree Genet. Genomes* 7: 323-335.
- Edwards D et al. 2014. New technologies for ultrahigh-throughput genotyping in plant taxonomy. *Methods Mol. Biol.* 1115:151-175.
- Elshire RJ et al. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6: e19379.
- Emenjaud D, Dirlewanger E. 2007. Plum. En: Kole CR (ed). *Genome mapping and molecular breeding. Fruits & nuts*, vol 4. Springer, Heidelberg, Alemania, pp 119-136.
- Esteras C et al. 2012. High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping *BMC Genomics* 13: 80.
- Esteras C et al. 2013. SNP genotyping in melons: genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1285-1303.

- Fabbrini F et al. 2012. Phenotypic plasticity, QTL mapping and genomic characterization of bud set in black poplar. *BMC Plant Biol.* 12: 47.
- Famoso AN et al. 2011. Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome-wide association analysis and QTL mapping. *PLoS Genet* 7: e1002221.
- Fan S et al. 2010. Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytol.* 185: 917-930.
- Fei Z et al. 2014. Genome sequencing of *Cucurbita* species Cucurbitaceae 2014, 12-16 October, Bay Harbor, Michigan, EE UU.
- Fernández i Martí A et al. 2010. The almond *S_r* haplotype shows a double expression despite its comprehensive genetic identity. *Scientia Hort.* 125: 685-691.
- Fernández i Martí A et al. 2013. Genetic analysis for physical nut traits in almond. *Tree Genet. Genomes* 9: 455-465.
- Fernández i Martí A et al. 2014. Genomic analysis of the molecular evolution and the population structure of a worldwide almond pool assessed by microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* (aceptado, en prensa).
- Fernández-Trujillo JP et al. 2011. Breeding for fruit quality in melon. En: Jenks MA, Bebeli P (eds.). *Breeding for Fruit Quality.* Wiley-Blackwell, Ames, IA, EE UU.
- Fisk SP et al. 2013. FR-H3: a new QTL to assist in the development of fall-sown barley with superior low temperature tolerance. *Theor. Appl. Genet.* 126: 335-347.
- Font i Forcada C et al. 2012. Mapping quantitative trait loci for kernel composition in almond. *BMC Genetics* 13: 47.
- Font i Forcada et al. 2013. Population structure and marker-trait associations for pomological traits in peach and nectarine cultivars. *Tree Genet. Genomes* 9: 331-349.
- Foolad MR, Panthee DR. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 93-123.
- Frary A et al. 2014. QTL hotspots in eggplant (*Solanum melongena*) detected with a high resolution map and CIM analysis. *Euphytica* 197: 211-228.
- Frewen BE et al. 2000. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics* 154: 837-845.
- Gabriel S et al. 2009. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. En: Haines JL (ed.) *Current Protocols in Human Genetics*, unit 2.12.
- Galal A et al. 2014. Comparative QTL analysis of root lesion nematode resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 127: 1399-1407.
- Galli P et al. 2010. The Rvi15 (Vr2) apple scab resistance locus contains three TIR-NBS-LRR genes. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 23: 608-617.
- Ganal MW et al. 2012. Large SNP arrays for genotyping in crop plants. *J. Biosci.* 37: 821-828.
- Ganal MW et al. 2011. A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PLoS One* 6: e28334.
- Gao Q et al. 2012. Recent progress using high-throughput sequencing technologies in plant molecular breeding. *J. Integrat. Plant Biol.* 54: 215-227.
- Garcés-Claver A et al. 2007. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *Theor. Appl. Genet.* 115: 907-916.
- García-Mas J et al. 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 11872-11877.

- Gardiner SE et al. 2012a. Putative resistance gene markers associated with quantitative trait loci for fire blight resistance in *Malus* "Robusta 5_ accessions. *BMC Genomics* 13: 25.
- Gardiner SE et al. 2012b. A draft sequences of European pear (*Pyrus communis* L. 'Barlett) 6th International Rosaceae Genomics Conference 2012, pp 21.
- Gasic K et al. 2009. Characteristics and transferability of new apple EST-derived SSRs to other Rosaceae species. *Mol. Breed.* 23: 397-411.
- Gessler C, Pertot I. 2012. Vf scab resistance of *Malus*. *Trees* 26: 95-108.
- Gilchrist E J et al. 2013. A mutant *Brassica napus* (canola) population for the identification of new genetic diversity via TILLING and next generation sequencing. *PLoS One* 8: e84303.
- Gisbert et al. 2009. Genetic diversity evaluation of a loquat [*Eriobotrya japonica* (Thun.) Lindl.] germplasm collection by SSR and S-allele fragments. *Euphytica* 168: 121-134.
- Gonzalo MJ et al. 2012. Genetic analysis of iron chlorosis tolerance in *Prunus* rootstocks. *Tree Genet. Genomes* 8: 943-955.
- Gore MA et al. 2009. A first-generation haplotype map of maize. *Science* 326: 1115-1117.
- Gross BL et al. 2012. Identification of interspecific hybrids among domesticated apple and its wild relatives. *Tree Genet. Genomes* 8: 1223-1235.
- Gross BL, Olsen KM. 2010. Genetic perspectives on crop domestication. *Trends Plant Sci.* 15: 529-537.
- Guo S et al. 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat. Genet.* 45: 51-58.
- Gur A, Zamir D. 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biology* 2: e245.
- Hajjar R, Hodgkin T. 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156: 1-13.
- He T et al. 2007. Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 563-572.
- He X et al. 2013. QTL mapping of powdery mildew resistance in WI 2757 cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 126: 2149-2161.
- Heffner E L et al. 2009. Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49: 1-12.
- Hernandez P et al. 2012. Next-generation sequencing and syntenic integration of flow-sorted arms of wheat chromosome 4A exposes the chromosome structure and gene content. *Plant J.* 69: 377-386.
- Heslot N et al. 2013. Impact of marker ascertainment bias on genomic selection accuracy and estimates of genetic diversity. *PLoS One* 8: e74612.
- Hill TA et al. 2013. Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene pepper gene chip. *PLoS One* 8: e56200.
- Hirakawa H et al. 2013. Genome-wide SNP genotyping to infer the effects on gene functions in tomato. *DNA Res.* 20: 221-233.
- Hirsch CD et al. 2014. Reduced representation approaches to interrogate genome diversity in large repetitive plant genomes. *Brief. Funct. Genomics* (DOI: 10.1093/bfpg/elt051)
- Hofmann K et al. 2013. Fine mapping of the *Rrs1* resistance locus against scald in two large populations derived from Spanish barley landraces. *Theor. Appl. Genet.* 126: 3091-3102.
- Holloway B, Li B. 2010. Expression QTLs: applications for crop improvement. *Mol. Breed.* 26: 381-391.

- Hormaza JI. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 104: 321-328.
- Huang S et al. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat. Genet.* 41: 1275-1281.
- Huang X et al. 2009. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res.* 19: 1068-1076.
- Huang X et al. 2010. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat. Genet.* 42: 961-967.
- Huang X et al. 2012. Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. *Nat. Genet.* 44: 32-39.
- Huang Y et al. 2013. Haplotype diversity and population structure in cultivated and wild barley evaluated for *Fusarium* head blight responses. *Theor. Appl. Genet.* 126: 619-636.
- Hung HY et al. 2012. *ZmCCT* and the genetic basis of day-length adaptation underlying the post domestication spread of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: E1913-E1921.
- Hyten D et al. 2010. High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence. *BMC Genomics* 11: 38.
- IBSC Consortium 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711-716.
- IRGSP. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.
- Islamovic E et al. 2014. Quantitative trait loci of barley malting quality trait components in the Stellar/01Ab8219 mapping population. *Mol. Breed.* 34: 59-73.
- Jain M et al. 2014. Genome-wide discovery of DNA polymorphisms in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response and their functional relevance. *Plant Biotechnol. J.* 12: 253-264.
- Jiao Y et al. 2012. Genome-wide genetic changes during modern breeding of maize. *Nat. Genet.* 44: 812-815.
- Joukhadar R et al. 2013. Genome-wide association mapping for five major pest resistances in wheat. *Mol. Breed.* 32: 943-960.
- Kenis K et al. 2008. Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. *Tree Genet. Genomes* 4: 647-661.
- Kilian J et al. 2007. The AtGenExpress global stress expression dataset: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 55: 526-542.
- Kim S et al. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat. Genet.* 46: 270-278.
- Kinkade MP, Foolad MR. 2013. Validation and fine mapping of lyc12.1, a QTL for increased tomato fruit lycopene content. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2163-2175.
- Kobayashi M et al. 2014. Genome-wide analysis of intraspecific DNA polymorphism in 'Micro-Tom', a model cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Physiol.* 55: 445-454.
- Koepke T. et al. 2013. Comparative genomics analysis in Prunoideae to identify biologically relevant polymorphisms. *Plant Biotechnol. J.* 11: 883-893.
- Kollers S et al. 2013a. Genetic architecture of resistance to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in European winter wheat. *Mol. Breed.* 32: 411-423.
- Kollers S et al. 2013b. Whole genome association mapping of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 8: e57500.

- Kulwal P et al. 2012. Association mapping for pre-harvest sprouting resistance in white winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 125: 793-805.
- Kumar S et al. 2012. Genomic selection for fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.) *PLoS One* 7: e36674.
- Kump KL et al. 2011. Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population. *Nat. Genet.* 43: 163-168.
- Kwon SJ et al. 2013. Genome-wide association of 10 horticultural traits with expressed sequence tag-derived SNP markers in a collection of lettuce lines. *Crop J.* 1: 25-33.
- Lado B et al. 2013. Increased genomic prediction accuracy in wheat breeding through spatial adjustment of field trial data. *G3* 3: 2105-2114.
- Lai J et al. 2010. Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines. *Nat. Genet.* 42: 1027-1030.
- Lalli DA et al. 2005. Identification and mapping of resistance gene analogs (RGA) in *Prunus*: a resistance map for *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1504-1513.
- Lam HM et al. 2010. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nat. Genet.* 42: 1053-1059.
- Lazzari B et al. 2008. Version VI of the ESTree db: an improved tool for peach transcriptome analysis. *BMC Bioinformatics* 9: S9.
- Leida C et al. 2010. Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiol.* 30: 655-666.
- Letta T et al. 2013. Searching for novel sources of field resistance to Ug99 and Ethiopian stem rust races in durum wheat via association mapping. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1237-1256.
- Lewers K et al. 2008. A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers. *BMC Plant Biol.* 8: 69.
- Li A et al. 2013. Identification and fine mapping of *qRBSDV-6^{MH}*, a major QTL for resistance to rice black-streaked dwarf virus disease. *Mol. Breed.* 32: 1-13.
- Li H et al. 2013. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of oil biosynthesis in maize kernels. *Nat. Genet.* 45: 43-50
- Li X et al. 2014. Development of an alfalfa SNP array and its use to evaluate patterns of population structure and linkage disequilibrium *PLoS One.* 9: e84329.
- Liebhart R et al. 2003. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Mol. Biol.* 52: 511-526.
- Liu S et al. 2012. Changes in genome content generated via segregation of non-allelic homologs. *Plant J.* 72: 390-399.
- Liu T et al. 2013. Validation and characterization of *Ghd7. 1*, a major QTL with pleiotropic effects on spikelets per panicle, plant height, and heading date in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Integrative Plant Biol.* 55: 917-927.
- Liu Y et al. 2012. Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theor. Appl. Genet.* 125: 1-10.
- Liu Y et al. 2014. Genetic analysis and major QTL detection for maize kernel size and weight in multi-environments. *Theor. Appl. Genet.* 127: 1019-1037.
- Lopes M S et al. 2013. QTL for yield and associated traits in the Seri/Babax population grown across several environments in Mexico, in the West Asia, North Africa, and South Asia regions. *Theor. Appl. Genet.* 126: 971-984.

- Lopez-Vera EE et al. 2014. Resistance to stem rust Ug99 in six bread wheat cultivars maps to chromosome 6DS. *Theor. Appl. Genet.* 127: 231-239.
- Lu H et al. 2014. QTL-seq identifies an early flowering QTL located near flowering locus T in cucumber. *Theor. Appl. Genet.* 127: 1-9.
- Luo Y et al. 2013. Marker-assisted breeding of Thai fragrance rice for semi-dwarf phenotype, submergence tolerance and disease resistance to rice blast and bacterial blight. *Mol. Breed.* 32: 709-721.
- Luro F L et al. 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping *BMC Genomics* 9: 287.
- Lv J et al. 2012. Genetic diversity and population structure of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *PLoS One* 7: e46919.
- Maccaferri M et al. 2011. Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *J. Exp. Bot.* 62: 409-438.
- Manganaris G A et al. 2011. Comparative transcript profiling of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit development and on-tree ripening. *Tree Genet. Genomes* 7: 609-616.
- Mantovani P et al. 2008. An integrated DARt-SSR linkage map of durum wheat. *Mol. Breed.* 22: 629-648.
- Marandel G et al. 2009. Quantitative trait loci metaanalysis of Plum pox virus resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. *Mol. Plant. Pathol.* 10: 347-360.
- Maron LG et al. 2013. Aluminum tolerance in maize is associated with higher *MATE1* gene copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 5241-5246.
- Martin LB et al. 2013. Catalyzing plant science research with RNA-seq. *Front. Plant Sci.* 4: 66.
- Martínez-García P et al. 2013. High density SNP mapping and QTL analysis for fruit quality characteristics in peach (*Prunus persica* L.). *Tree Genet. Genomes* 9: 19-36.
- Mascher M et al. 2013. Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond. *Plant J.* 76: 494-505.
- Matsumoto S. et al. 2007. Determination and confirmation of S-RNase genotypes of apple pollinators and cultivars. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 82: 323-329.
- Matsumura H et al. 2014. Mapping of the gynoecey in bitter melon (*Momordica charantia*) using RAD-seq analysis. *PLoS One* 9: e87138.
- Mayer KFX et al. 2011. Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23: 1249-1263.
- McMullen MD et al. 2009. Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science* 325: 737-740.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies-the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11: 31-46.
- Miller MR et al. 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res.* 17: 240-248.
- Ming R et al. 2008. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452: 991-996.
- Mizobuchi R et al. 2013. Identification of *qRBS1*, a QTL involved in resistance to bacterial seedling rot in rice. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2417-2425.
- Morrell PL et al. 2011. Crop genomics: advances and applications. *Nat. Rev. Genet.* 13: 85-96.

- Morris GP et al. 2013. Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 453-458.
- Muñoz-Amatriáin M et al. 2014. The USDA barley core collection: genetic diversity, population structure, and potential for genome-wide association studies. *PLoS One* 9: e94688.
- Muñoz-Amatriáin M et al. 2011. An improved consensus linkage map of barley based on flow-sorted chromosomes and single nucleotide polymorphism markers. *Plant Genome* 4: 238-249.
- Myles S et al. 2011. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108: 93530-93535.
- Naval M et al. 2010. Analysis of genetic diversity among persimmon cultivars using microsatellite markers *Tree Genet. Genomes* 6: 677-687.
- Neale D et al. 2014. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies *Genome Biol.* 15: R59.
- Niedringhaus TP et al. 2011. Landscape of next-generation sequencing technologies. *An. Chem.* 83: 4327-4341.
- Noelle A et al. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112: 1519-1531
- Norelli JL et al. 2009. Rapid transcriptional response of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridisation analysis. *Tree Genet. Genomes* 5: 27-40.
- Nybom H et al. 2014. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Invest. Genet.* 5: 1.
- Ogundiwin E et al. 2008. Development of ChillPeach genomic tools and identification of cold-responsive genes in peach fruit. *Plant Mol. Biol.* 68: 379-397.
- Olukolu BA et al. 2009. Genetic linkage mapping for molecular dissection of chilling requirement and bud break in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Genome*, 52: 819-828.
- Patocchi A et al. 2009. Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: *Venturia inaequalis* virulence surveys and standarization of molecular markers associated with resistance genes. *Mol. Breed.* 24: 337-347.
- Paux E et al. 2008. A physical map of the 1-Gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* 322: 101-104.
- Peace CP et al. 2005. Endopolygalacturonase: a candidate gene for freestone and melting flesh in peach. *Mol. Breed.* 16: 21-31.
- Peiffer JA et al. 2014. The genetic architecture of maize height. *Genetics* 196: 1337-1356.
- Peil A et al. 2007. Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breed.* 126: 470-475.
- Pérez-de-Castro AM et al. 2012. Application of genomic tools in plant breeding. *Curr. Genomics* 13: 179-195.
- Perkel J 2008. SNP genotyping: six technologies that keyed a revolution. *Nat. Methods* 5: 447-453.
- Picañol R et al. 2013. Combining linkage and association mapping to search for markers linked to the flat fruit character in peach. *Euphytica* 190: 279-288.
- Pierantoni L et al. 2007. Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map. *Tree Genet. Genomes* 3: 311-317.
- Pina A et al. 2014. Analysis of the genetic diversity of local apple cultivars from mountainous areas from Aragon (Northeastern Spain). *Scientia Hort.* 174: 1-9.
- Pirona R et al. 2013. Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach. *BMC Plant Biol.* 13: 166.

- Poland JA et al. 2011. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 6893-6898.
- Poland JA et al. 2012a. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One* 7: e32253.
- Poland JA et al. 2012b. Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. *Plant Genome* 5: 103-113.
- Potts S et al. 2014. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for fruit quality traits in apple. *Plant Mol. Biol. Rep.* 32: 109-116.
- Powell A et al. 2012. Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science* 336: 1711-1715.
- Qi J et al. 2013. A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nat. Genet.* 45: 1510-1515.
- Quilot B et al. 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: 884-897.
- Rafalski J A et al. 2011. Association genetics in crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 174-180.
- Raman H et al. 2014. SNP markers-based map construction and genome-wide linkage analysis in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol. J.* (DOI: 10.1111/pbi.12186).
- Rambla JL et al. 2014. The expanded tomato fruit volatile landscape. *J. Exp. Bot.* (DOI: 10.1093/jxb/eru128).
- Ranc N et al. 2012. Genome-wide association mapping in tomato (*Solanum lycopersicum*) is possible using genome admixture of *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*. *G3* 2: 853-864.
- Ravel C et al. 2013. Improving the yellow pigment content of bread wheat flour by selecting the three homoeologous copies of *Psy1*. *Mol. Breed.* 31: 87-99.
- Rebetzke GJ et al. 2014. Use of a large multiparent wheat mapping population in genomic dissection of coleoptile and seedling growth. *Plant Biotechnol. J.* 12: 219-230.
- Reddy UK et al. 2014. Identification of gene-specific polymorphisms and association with capsaicin pathway metabolites in *Capsicum annuum* L. collections. *PLoS One* 9: e86393.
- Ren Y et al. 2014. An integrated genetic map based on four mapping populations and quantitative trait loci associated with economically important traits in watermelon (*Citrullus lanatus*). *BMC Plant Biol.* 20: 14:33.
- Richards CM et al. 2009. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet. Genomes* 5: 339-347.
- Romay MC et al. 2013. Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank. *Genome Biol.* 14: R55.
- Romeu JF et al. 2014. Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *BMC Plant Biol.* 14: 52.
- Roy JK et al. 2010. Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Mol. Breed.* 26: 243-256.
- Rubio-Cabetas MJ. 2012. Present and future trends in peach rootstock breeding worldwide. *Acta Hort.* 962: 81-89.
- Rubio-Cabetas MJ et al. 2010. A microarray analysis revealed and oxidative response genes underlying the differential response to hypoxia of two *Prunus* genotypes. 5th International RGC. O42.
- Saintenac C et al. 2013. Sequence-based mapping of the polyploid wheat genome. *G3* 3: 1105-1114.

- Salvi S, Tuberosa R. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci.* 10: 297-304.
- Sánchez G et al. 2014. The peach volatilome modularity is reflected at the genetic and environmental response levels in a QTL mapping population *BMC Plant Biol.* 14: 137.
- Sánchez-Pérez R et al. 2010. Molecular markers for kernel bitterness in almond. *Tree Genet Genomes* 6: 237-245.
- Sánchez-Pérez R et al. 2012. Inheritance of chilling and heat requirements for flowering in almond and QTL analysis. *Tree Genet. Genomes* 8: 379-389.
- Sanzol J 2009. Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles. *Tree Genet. Genomes* 5: 393-405.
- Scaglione D et al. 2012. RAD tag sequencing as a source of SNP markers in *Cynara cardunculus* L. *BMC Genomics* 13: 3.
- Schnable PS et al. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-1115.
- Schnaithmann F et al. 2014. A first step toward the development of a barley NAM population and its utilization to detect QTLs conferring leaf rust seedling resistance. *Theor. Appl. Genet.* (on line).
- Schneeberger K, Weigel D. 2011. Fast-forward genetics enabled by new sequencing technologies *Trends Plant Sci.* 16: 282-288.
- Seipp MT et al. 2009. Multiplex amplicon genotyping by high-resolution melting. *J. Biomol. Tech.* 20: 160-164.
- Semagn K et al. 2006. Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545-555.
- Semagn K et al. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breed.* 33: 1-14.
- Septiningsih EM et al. 2009. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the *Sub1* locus and beyond. *Ann. Bot.* 103: 151-160.
- Sharpe A et al. 2013. Ancient orphan crop joins modern era: gene-based SNP discovery and mapping in lentil *BMC Genomics* 14: 192.
- Shen GQ et al. 2009. The TaqMan method for SNP genotyping. *Methods Mol. Biol.* 578: 293-306.
- Shendure J, Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 26: 1135-1145.
- Shulaev V et al. 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat. Genet.* 43: 109-116.
- Silfverberg-Dilworth et al. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet. Genomes* 2: 202-224.
- Sim SC et al. 2012a. Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic mps in tomato. *PLoS One* 7: e40563.
- Sim SC et al. 2012b. High-density SNP genotyping of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of genetic variation due to breeding. *PLoS One* 7: e45520.
- Socquet-Juglard D et al. 2013. Mapping architectural, phenological, and fruit quality QTLs in apricot. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31: 387-397.
- Sonah H et al. 2013. An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping. *PLoS One* 8: e54603.
- Song Q et al. 2013. Development and evaluation of soy SNP50K, a high-density genotyping array for soybean. *PLoS One* 8: e54985.

- Soriano JM et al. 2012. Identification of SSR markers tightly associated to PPV resistance in apricot. *Mol. Breed.* 30: 1017-1026.
- Spindel J et al. 2013. Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2699-2716.
- Steele KA et al. 2013. QTLs associated with root traits increase yield in upland rice when transferred through marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 126: 101-108.
- Szűcs P et al. 2009. An integrated resource for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *Plant Genome* 2: 134-140.
- Tanaka Y et al. 2014. Application of marker-assisted selection in breeding of a new fresh pepper cultivar (*Capsicum annuum*) containing capsinoids, low-pungent capsaicinoid analogs. *Scientia Hort.* 165: 242-245.
- Tang H et al. 2010. Domestication and plant genomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 160-166.
- Teng F et al. 2013. *ZmGA3ox2*, a candidate gene for a major QTL, *qPH3. 1*, for plant height in maize. *Plant J.* 73: 405-416.
- Thomson MJ et al. 2012. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping for breeding applications in rice using the BeadXpress platform. *Mol. Breed.* 29: 875-886.
- Tian F et al. 2011. Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. *Nat. Genet.* 43: 159-162.
- Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641.
- Toppa CN et al. 2013. 3D phenotyping and quantitative trait locus mapping identify core regions of the rice genome controlling root architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30: E1695-E1704..
- Trainotti L et al. 2006. The use of microarray uPEACH1. to investigate transcriptome changes during transition from preclimacteric to climacteric phase in peach fruit. *Plant Sci.* 170: 606-613.
- Trebbi D et al. 2011. High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor. Appl. Genet.* 123: 555-569.
- Truco MJ et al. 2013. An ultra-high-density, transcript-based, genetic map of lettuce. *G3* 3: 4617-4631.
- Tuskan GA et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-1604.
- Uga Y et al. 2013. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nat. Genet.* 45: 1097-1102.
- van Poecke RMP et al. 2013. Sequence-based SNP genotyping in durum wheat. *Plant Biotechnol. J.* 11: 809-817.
- Vegas J et al. 2013. Interaction between QTLs induces an advance in ethylene biosynthesis during melon fruit ripening. *Theor Appl Genet.* 126:1531-1544.
- Velasco R et al. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) *Nat. Genet.* 42: 833-839.
- Velasco R et al. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2: e1326.
- Venuprasad R et al. 2012. A large-effect QTL for rice grain yield under upland drought stress on chromosome 1. *Mol. Breed.* 30: 535-547.

- Vera EM et al. 2011. Narrowing down the apricot Plum pox virus resistance locus and comparative analysis with the peach genome syntenic region. *Mol. Plant Pathol.* 12: 535-547.
- Verde I et al. 2012. Correction: development and evaluation of a 9K SNP array for peach by internationally coordinated SNP detection and validation in breeding germplasm. *PLoS One* 7: e35668.
- Verde I et al. 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat. Genet.* 45: 487-496.
- Vilanova S et al. 2005. Identification of self(in)compatibility alleles in apricot by PCR sequence analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 893-898.
- Vives C et al. 2012. Aplicación de marcadores moleculares a la mejora genética del melocotonero. Ms. Thesis. Instituto Agronómico Mediterráneo, Zaragoza (Spain).
- Wan Y et al. 2008. The eco-geographic distribution of wild grape germplasm in China. *Vitis* 47: 77-80.
- Wan Y et al. 2013. A phylogenetic analysis of the grape genus (*Vitis* L.) reveals broad reticulation and concurrent diversification during neogene and quaternary climate change. *BMC Evolut. Biol.* 13: 141.
- Wang S et al. 2014. Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol. J.* (online).
- Wang S et al. 2012. 2b-RAD: A simple and flexible method for genome-wide genotyping. *Nat. Methods* 9: 808-810.
- Wenzl P et al. 2004. Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9915-9920.
- White J et al. 2008. The genetic diversity of UK, US and Australian cultivars of *Triticum aestivum* measured by DArT markers and considered by genome. *Theor. Appl. Genet.* 116: 439-453.
- Willcox MC et al. 2013. Confirming quantitative trait loci for aflatoxin resistance from Mp313E in different genetic backgrounds. *Mol. Breed.* 32: 15-26.
- Winfield MO et al. 2012. Targeted re-sequencing of the allohexaploid wheat exome. *Plant Biotechnol. J.* 10: 733-742.
- Wu J et al. 2013. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) *Genome Res.* 23: 396-408.
- Wu X et al. 2014. Fine genetic characterization of elite maize germplasm using high-throughput SNP genotyping. *Theor. Appl. Genet.* 127: 621-631.
- Wu G A et al. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat. Biotechnol.* (on line).
- Würschum T et al. 2013. Population structure, genetic diversity and linkage disequilibrium in elite winter wheat assessed with SNP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1477-1486.
- Xu X et al. 2012. Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. *Nat. Biotechnol.* 30: 105-111.
- Xu J et al. 2013. Phenotypic diversity and association mapping for fruit quality traits in cultivated tomato and related species. *Theor. Appl. Genet.* 126:567-581.
- Xu J et al. 2014. Identification of candidate genes for drought tolerance by whole-genome resequencing in maize. *BMC Plant Biol.* 14: 83.
- Xu Q et al. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*) *Nat. Genet.* 45: 59-66.
- Xu X et al. 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475: 189-195.
- Xue Y et al. 2013. Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2587-2596.

- Yamamoto T et al. 2002. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theor. Appl. Genet.* 106: 9-18.
- Yang H et al. 2012. Application of next-generation sequencing for rapid marker development in molecular plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in *Lupinus angustifolius* L. *BMC Genomics* 13: 318.
- Yang L et al. 2013. Marker-assisted selection for pyramiding the *waxy* and *opaque-16* genes in maize using cross and backcross schemes. *Mol. Breed.* 31: 767-775.
- Yang N et al. 2013. Mapping quantitative trait associated with resistance to bacterial spot (*Xanthomonas arboricola* pv *pruni*). *Tree Genet. Genomes* 9: 573-586.
- Yu H et al. 2014. A whole-genome SNP array (RICE6K) for genomic breeding in rice. *Plant Biotechnol. J.* 12: 28-37.
- Yu LX et al. 2011. Association mapping and gene-gene interaction for stem rust resistance in CIMMYT spring wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 123: 1257-1268.
- Yu LX et al. 2012. Identification of Ug99 stem rust resistance loci in winter wheat germplasm using genome-wide association analysis. *Theor. Appl. Genet.* 125: 749-758.
- Yun Z et al. 2012. Comparative transcriptomics and proteomics analysis of citrus fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage. *J. Exp. Bot.* 63: 2873-2893.
- Yuste-Lisbona et al. 2014. Genetic analysis of single-locus and epistatic QTLs for seed traits in an adapted × nuña RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 897-912.
- Zambrano JL et al. 2014. Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. *Theor. Appl. Genet.* 127: 867-880.
- Zeinalabedini MK et al. 2008. Comparison of the use of morphological, protein and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild *Prunus* species. *Scientia Hort.* 116: 80-88.
- Zhang LY et al. 2009. Population structure and linkage disequilibrium in barley assessed by DArT markers. *Theor. Appl. Genet.* 119: 43-52.
- Zhao K et al. 2011. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nat. Comm.* 2: 467.
- Zhebentayeva TN et al. 2014. Dissection of chilling requirement and bloom date QTLs in peach using a whole genome sequencing of sibling trees from an F₂ mapping population. *Tree Genet. Genomes* 10: 35-51.
- Zhou H et al. 2014. Association mapping of stem rust race TTKSK resistance in US barley breeding germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 127: 1293-1304.
- Ziems LA et al. 2014. Association mapping of resistance to *Puccinia hordei* in Australian barley breeding germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 127: 1199-1212.
- Ziliotto F et al. 2008. Transcriptome profiling of ripening nectarine (*Prunus persica* L. Batsch) fruit treated with 1-MCP. *J. Exp. Bot.* 59: 2781-2791.
- Zuriaga E et al. 2013. Genomic analysis reveals MATH gene(s) as candidate(s) for Plum pox virus (PPV) resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Mol. Plant Pathol.* 14: 663-677.

5 Las patentes de genes: ejemplo de su utilización en la mejora genética vegetal

Teresa Capell¹ y Paul Christou^{1, 2}

¹ *Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal (PVCF), Universitat de Lleida*

² *Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona*

- 5.1. Introducción a la propiedad intelectual
- 5.2. Dificultades en la búsqueda de patentes
- 5.3. Búsqueda previa de IP en un proyecto concreto como ejemplo
 - 5.3.1. Las bases de datos
 - 5.3.2. Metodología general de búsqueda
 - 5.3.3. Resultados del desarrollo de una estrategia de búsqueda enfocada
 - 5.3.4. Desarrollo de una secuencia de búsqueda ideal
 - 5.3.5. Desarrollo de un sistema de control de calidad
- 5.4. Presentación de los resultados de búsqueda
- 5.5. Discusión de los resultados
- 5.6. Referencias

5.1. Introducción a la propiedad intelectual

Los derechos de propiedad intelectual (DPI) protegen a los creadores de inventos, ideas y diseños de la explotación de su creación por parte de terceros sin impedir que los beneficios se filtren a la sociedad (Adcock, 2007; WIPO, 2008). Las dos categorías más importantes de DPI son el "copyright" y "la propiedad industrial" (WIPO, 2008; Kannan, 2010). El copyright se aplica principalmente a obras literarias, artísticas y musicales, pero también puede utilizarse para dibujos técnicos y arquitectónicos, mientras que en la propiedad industrial se incluyen invenciones, marcas registradas y diseños (Kannan, 2010). Una invención se ha definido como la creación de un proceso o un producto que proporciona una nueva o mejor manera de hacer algo, o que proporciona una nueva solución a un problema (WIPO 2006). Las invenciones están protegidas por patentes, que son definidas por la Organización de la Propiedad Intelectual Mundial (WIPO) como "un derecho exclusivo concedido por el estado a una invención que sea nueva, implique un paso inventivo y sea susceptible de aplicación industrial" (WIPO, 2006). Estos requisitos de la invención se describen a menudo como novedad, no obviedad y utilidad, y deben darse a conocer de forma clara y completa en la solicitud de patente (Fleck and Baldock 2003; WIPO, 2006).

La solicitud de la patente marca su alcance jurídico, la naturaleza de la invención, los detalles del inventor, el titular de la patente y otra información legal (WIPO, 2006). Consta de una petición, una descripción, unas reivindicaciones, dibujos (si es necesario) y un resumen. La estructura de la solicitud es similar en todo el mundo. La descripción debe contener suficiente detalle para ser reconstruida sin un esfuerzo inventivo adicional, y las reivindicaciones deben determinar el alcance de la invención y por lo tanto el alcance de la protección requerida (WIPO, 2006). Cuando se considere presentar una solicitud de patente, el solicitante deberá determinar si la invención cumple con los requisitos de novedad, no obviedad y utilidad (Fleco and Baldock, 2003). Las definiciones de no obviedad y utilidad son subjetivas y pueden diferir entre las distintas jurisdicciones, pero la novedad puede establecerse acudiendo a dos fuentes de documentación que forman el cuerpo de conocimiento existente o "estado de la técnica". La primera, es la literatura científica, accesible al público y muestra si las invenciones anteriores fueron divulgadas y, por lo tanto, de dominio público. Una vez en el dominio público, una invención ya no se puede patentar. La segunda, es la gran colección de patentes existentes.

5.2. Dificultades en la búsqueda de patentes

La mayoría de los científicos se convierten en adeptos a la búsqueda bibliográfica científica, como consecuencia del fácil acceso a las bases de datos bibliográficas como PubMed y Web of Knowledge (Parisi et al., 2013). Gracias a ellas, un investigador puede establecer rápidamente si una invención está, o no, en el do-

minio público. Sin embargo, debido a que hay millones de patentes, tanto en vigor como caducadas, una búsqueda de la propiedad intelectual dentro del conocimiento existente o "estado de la técnica" se vuelve larga y compleja, sobre todo cuando se trata de invenciones que requieren de conocimientos especializados, tanto de conceptos científicos, como de legislación de patentes. Las grandes empresas y organizaciones emplean a abogados especialistas en patentes para supervisar este proceso, pero los gastos que conllevan no pueden ser asumidos por pequeños proyectos de investigación financiados con fondos públicos.

Un enfoque alternativo es el uso de los servicios en línea que ofrecen la mayoría de oficinas nacionales de patentes para su análisis. Las oficinas de patentes de los tres territorios más importantes (Europa, USA y Japón) reúnen las bases de datos más grandes y completas, y dos bases de datos adicionales (WIPO y Cambia) tienen una cobertura global (Figuras 5.1 y 5.2; Parisi et al., 2013). Por lo tanto, es aconsejable analizar estas bases de datos en la fase inicial del proyecto de investigación, sobretodo si este implica aplicaciones comerciales potenciales. Es necesario asegurarnos que tecnologías que vamos a utilizar y productos que podamos obtener, no invaden derechos de propiedad intelectual existentes y son lo suficientemente novedosos para generar nueva propiedad intelectual. Es importante distinguir entre la propiedad intelectual generada durante el desarrollo del proyecto, de la ya existente e incorporada al proyecto por parte de los investigadores que participan en el. La publicación de manuscritos científicos puede también requerir la citación de patentes como referencia, en este caso, las bases de datos de patentes proporcionan una fuente útil que puede ser utilizada de la misma forma de las bases de datos de publicaciones científicas.

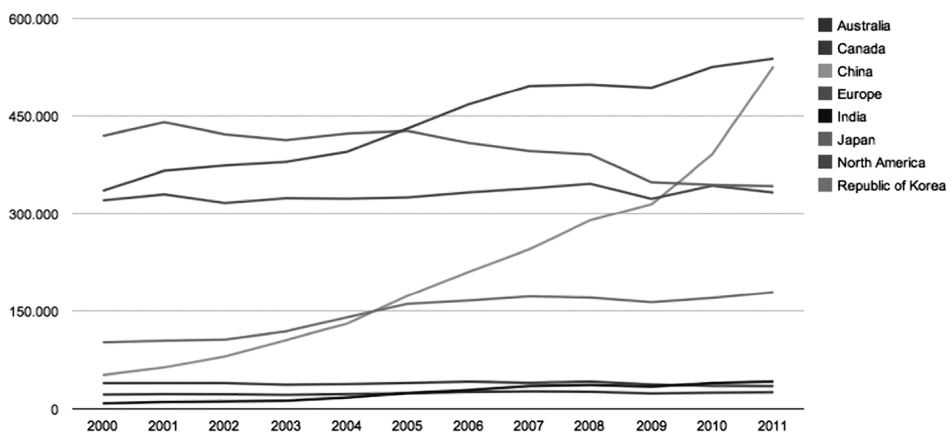


Figura 5.1.—Solicitudes totales de patentes por año, divididas por oficinas nacionales (WIPO, 2013).

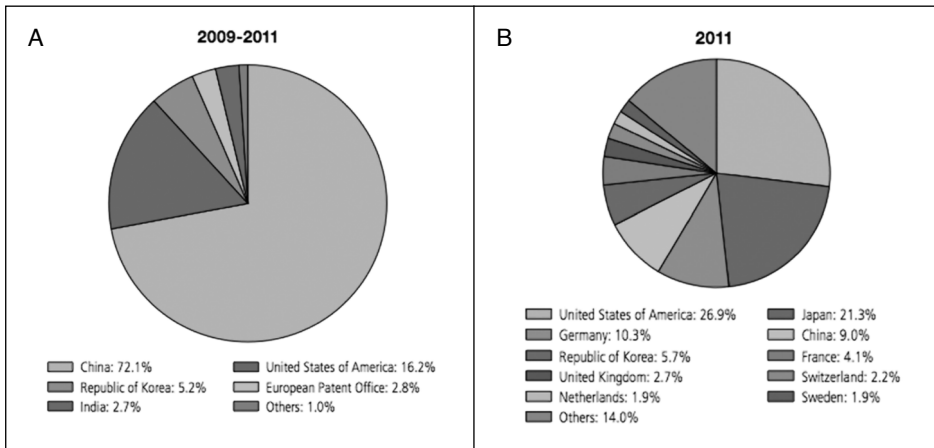


Figura 5.2.—A. Contribución de las oficinas nacionales al aumento de solicitudes de patentes en todo el mundo para 2011 (WIPO, 2012) B. Contribución por región geográfica al número de patentes para 2011. (WIPO, 2012).

5.3. Búsqueda previa de IP en un proyecto concreto como ejemplo

El proyecto SmartCell (KBBE 222.716; <http://www.smart-cell.org>) financiado con fondos europeos del Séptimo Programa Marco tenía el objetivo de desarrollar conocimientos básicos y tecnologías que capacitarían la ingeniería genética de plantas de tabaco para la producción de productos del metabolismo secundario de elevado valor económico, que podrían ser extraídos y purificados fácilmente para usos médicos o industriales. Agrupaba a 14 laboratorios e institutos de investigación públicos y 4 empresas de la Unión Europea. El presupuesto total era de 8,5 millones de euros y con una duración inicial de 4 años (2009-2012). Una parte esencial del proyecto era la ingeniería metabólica de la ruta de los alcaloides indol terpenoicos (TIA) en plantas de tabaco. La complejidad de la ruta metabólica y el desconocimiento de algunas secuencias y genes nos obligaron a aplicar el proceso de búsqueda previa en el contexto del proyecto para desarrollar una estrategia sistemática para el análisis de las patentes que se relacionan con la ingeniería metabólica de la ruta de TIA en plantas. La estrategia de búsqueda que desarrollamos permitió la rápida identificación de las 50 patentes que podían afectar a los derechos comerciales resultantes de aplicar la ingeniería genética a la ruta metabólica de TIA en plantas. Esta estrategia podría aplicarse a otros proyectos de investigación modificando los términos de búsqueda.

5.3.1. Las bases de datos

El estudio se centró en el uso de las cinco bases de datos de patentes más importantes, públicamente disponibles y que ofrecen servicio de exploración a través de Internet:

1. La base de datos (Espacenet) de la Organización de Patentes Europea (EPO), que ofrece acceso gratuito a más de setenta millones de patentes publicadas desde 1836 (EPO, 2013a) y que, además, ofrece acceso a la información de patentes relacionadas (patentes similares en otros países), informes sobre su estado legal, otras publicaciones no relacionadas con las patentes y enlaces al registro de patentes europeo (EPO, 2013b).
2. La base de datos completa (PatFT) de la oficina de registro de marcas y patentes de Estados Unidos (USPTO), que contiene toda la documentación de las patentes concedidas desde 1976 (USPTO, 2013a).
3. La Oficina de Patentes Japonesa (JPO), que alberga la biblioteca digital de la propiedad industrial (IPDL) y que ofrece acceso público a las bases de datos de patentes y modelos de utilidad, diseños o marcas registradas y figuras (JPO, 2013).
4. La Organización de la Propiedad Intelectual Mundial (WIPO), cuya base de datos alberga 18.650.000 documentos de patentes que incluyen 2.170.000 aplicaciones que representan a todas las oficinas WIPO (WIPO, 2013a, b).
5. La base de datos de patentes CAMBIA y los recursos vinculados a ella (CAMBIA, 2013a, b).

5.3.2. Metodología general de búsqueda

Cada una de las bases de datos mencionadas anteriormente cuenta con un formato de búsqueda único, lo que significa que se requieren elementos de búsqueda distintos para acceder a la información en cada caso y, además, el alcance de dicha información está restringido por los términos de búsqueda permitidos. Las cinco bases de datos cuentan con múltiples categorías de búsqueda, desde una búsqueda simple con capacidad limitada, hasta una búsqueda avanzada que permite consultas complejas y extensas (Figura 5.3).

La base de datos de patentes EPO (Espacenet) ofrece opciones de "búsqueda inteligente", "búsqueda avanzada" y "búsqueda clasificada". La búsqueda inteligente permite el uso de una o varias palabras a la vez como términos de búsqueda, o comandos de búsqueda booleanos más complejos enfocados a campos específicos de la patente como, el título, el resumen, el año, el inventor o el número de la patente (Espacenet, 2013a). La búsqueda avanzada puede utilizarse para combinar distintos términos de búsqueda, por ejemplo, patentes de un año en concreto, un país determinado, y palabras específicas que se encuentre en el título o en el resumen (Figura 5.3); también se puede limitar la búsqueda a colecciones diferentes de todo el mundo (todas las patentes de más de 90 países), EP (al texto completo de las todas las patentes de la Unión Europea) y WIPO, una colección completa que incluye el texto completo de las patentes publicadas y sus aplicaciones (Espacenet, 2013b). Se puede buscar un grupo de patentes publicadas de un área técnica

A

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Espacenet
Patent search

Deutsch English Français
Contact
Change country

← About Espacenet Other EPO online services

Search Result list My patents list (0) Query history Settings Help

Smart search

Advanced search
Classification search

Smart search: Siemens EP 2007

Clear Search

Maintenance news

Scheduled maintenance

Espacenet outages - all times are CET:
Outage in the weekend of the 26th of Jan. from 09:00 Saturday and possibly into Sunday
Mon-Sat from 09:00-05:15.
Sun: 09:00 to 04:00 → [read more...](#)

News flashes

Latest updates

Related links

Well, 2012 was a busy year!

In February we launched the first batch of languages in Patent Translate. In October a further seven languages were added and in December the Chinese language was implemented. In parallel, extensive co-operation with the USPTO brought the Cooperative Patent Classification scheme, which replaced ECLA in Espacenet in December. A new CPC viewer replaced the ECLA viewer, and with the new viewer came a whole bunch of new functionality and on-screen information. And, significantly, the CPC viewer in Espacenet is the only official public CPC viewer!

And right at the end of the year we also launched a load of new features which you had been asking for, for a long time.

We rationalised the number of search possibilities down to Smart search, Advanced search and Classification search (CPC, of course). Smart search still offers the possibility of free-form and command-line searches. Smart search has rolled up all of the functionalities of the old Quick search and Number search, including improved fuzzy logic, so you don't have to remember exact formats, country codes or kind codes. The layout of the Advanced search screen is now clearer, with text, number, name, date and classification fields grouped.

Espacenet now shows the cited documents for INPADOC family members, that means, for example, the search reports for each of the members of the family. This is an Espacenet-compatible view of the Common Citation Document and we call it CCD Lite. It means you can compare the searches done by different patent offices on essentially the same invention or inventive concept with just one click.

You can now save up to 50 query histories and there are links to priority documents from the bibliographic view. And we are beginning to implement direct links from documents in Espacenet to member state patent registers so you can look up legal status information, at source, for yourself! This will take some time to complete, but we reckon you'll think it's worth the effort.

The New Year will bring still more features in Espacenet - we've been so busy we couldn't squeeze them all in - but we'll have to keep them quiet for the time being.

So, watch this space!

B

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Espacenet
Patent search

Deutsch English Français
Contact
Change country

← About Espacenet Other EPO online services

Search Result list My patents list (0) Query history Settings Help

Refine search → Results page 1

Smart search
Advanced search
Classification search

Quick help

- Can I subscribe to an RSS feed of the result list?
- What does the RSS reader do with the result list?
- Can I export my result list?
- What happens if I click on "Download covers"?
- Why is the number of results sometimes only approximate?
- Why is the list limited to 500 results?
- Can I deactivate the highlighting?
- Why is it that certain documents are sometimes not displayed in the result list?
- Can I sort the result list?
- What happens if I click on the star icon?
- What are XP documents?
- Can I save my queries?

Result list

Select all Compact Export (CSV | XLS) Download covers (0) Print

22 results found in the Worldwide database for:
is = Metabolic and txt = engineering using Smart search

Sort by: Upload date Sort order: Descending Sort

1. COMPOSITIONS FOR ANTI-OBESITY COMPRISING SOYBEAN EXTRACT OR FERMENTED SOYBEAN EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENTS

Inventor:	Applicant:	CPC:	IPC:	Publication info:	Priority date:
★ KANG HEUN SOO [KR]	METABOLIC ENGINEERING LAB CO L D [KR]		A61K3848 [KR]	KR2012008409 (A)	2010-07-16
LEE GEON HO [KR]	KANG HEUN SOO [KR] (+3)		A61P300 A61P304	2012-01-30	

2. COMPOSITIONS FOR IMPROVING EYESIGHT

Inventor:	Applicant:	CPC:	IPC:	Publication info:	Priority date:
★ KANG HEUN SOO [KR]	METABOLIC ENGINEERING LAB CO L [KR]		A61K3170 A61K36258 A61P2702	KR20090123195 (A)	2008-05-27
KIM IN GYU [KR] (+6)				2009-12-02	

3. COMPOSITIONS FOR PREVENTING OR TREATING OBESITY OR HYPERCHOLESTERAEMIA

Inventor:	Applicant:	CPC:	IPC:	Publication info:	Priority date:
★ KANG HEUN SOO [KR]	METABOLIC ENGINEERING LAB CO L [KR]		A61K36258 A61K36484 A61P304	KR20090120731 (A)	2008-05-20
RYUN JAE MIN [KR]				2009-11-25	

Figura 5.3.—Una 'búsqueda avanzada' en la base de datos de patentes EPO. A. 'Búsqueda Avanzada' usando el término "ingeniería metabólica". B. Resultados de la búsqueda.

concreta utilizando la búsqueda clasificada, que es una herramienta muy útil para los profesionales de las patentes (Espacenet, 2013a).

La base de datos de imágenes y texto completo de la USPTO (PatFT) ofrece una "búsqueda rápida y simplificada", una "búsqueda avanzada personalizada" y una "opción de búsqueda" a través del número de patente que permite recuperar patentes individuales (USPTO, 2013b). La búsqueda rápida permite utilizar uno o dos

términos para la búsqueda, bien en todos los campos, bien en campos específicos como pueden ser el resumen, el título, el número de la patente, el inventor o el solicitante. Con la opción búsqueda avanzada se pueden añadir más términos, permitiendo secuencias de búsqueda más complejas que incluyen operadores booleanos (Figura 5.4).

El aplicativo de búsqueda de la Oficina de Patentes Japonesa (JPO) es más complejo y restrictivo que las equivalentes de la EPO y la USTPO. Las herramientas "base

USPTO PATENT FULL-TEXT AND IMAGE DATABASE

Data current through January 22, 2013.

A

Query [Help]

Examples:
 tit(tennis and (racquet or racket))
 Isd/1/8/2002 and motorcycle
 in/newmar-julie

Select Years [Help]
 1976 to present (full-text)

Patents from 1790 through 1975 are searchable only by Issue Date, Patent Number, and Current US Classification.
 When searching for specific numbers in the Patent Number field, patent numbers must be seven characters in length, excluding commas, which are optional.

Field Code	Field Name	Field Code	Field Name
PN	Patent Number	IN	Inventor Name
ISD	Issue Date	IC	Inventor City
TTL	Title	IS	Inventor State
ABST	Abstract	ICN	Inventor Country
ACLM	Claim(s)	LREP	Attorney or Agent
SPEC	Description/Specification	AN	Assignee Name
CCL	Current US Classification	AC	Assignee City
ICL	International Classification	AS	Assignee State
APN	Application Serial Number	ACN	Assignee Country
APD	Application Date	EXP	Primary Examiner
PARN	Parent Case Information	EXA	Assistant Examiner
RLAP	Related US App. Data	REF	Referenced By

USPTO PATENT FULL-TEXT AND IMAGE DATABASE

B

Searching US Patent Collection...

Results of Search in US Patent Collection db for:
(Metabolic AND engineering): 20305 patents.
 Hits 1 through 50 out of 20305

Jump To:

Refine Search:

PAT. NO.	Title
1 8,359,179	Test equipment and portable test device
2 8,357,844	Maize variety hybrid X8H573
3 8,357,843	Maize variety hybrid X95A949
4 8,357,842	Maize variety hybrid X7H291
5 8,357,841	Inbred maize variety PH12TP
6 8,357,840	Inbred maize variety PH18DY
7 8,357,839	Maize variety X4F694
8 8,357,838	Potato cultivar 'Shelford'
9 8,357,834	Methods for plant transformation using spectinomycin selection
10 8,357,767	High modulus polyurethane and polyurethane/urea compositions
11 8,357,559	Method of making sensor platform using a non-horizontally oriented nanotube element

Figura 5.4.—Una 'búsqueda avanzada' en la base de datos de patentes USPTO. A. 'Búsqueda Avanzada' usando el término "ingeniería metabólica". B. Resultados de la búsqueda.

de datos de los boletines de patentes y modelos de utilidad" y "concordancia patente y modelo de utilidad" permiten recuperar patentes por el código o número de aplicación. La búsqueda a partir del término FI/F, permite recuperar patentes mediante el término-F, un sistema para clasificar patentes basado en sus aspectos técnicos, que se superpone con el sistema de protección de la propiedad intelectual supervisado por la WIPO. Sin embargo, el aplicativo más útil es la búsqueda en los resúmenes de las patentes de Japón, donde la combinación de palabras clave puede utilizarse ligada a operadores booleanos, pero está limitada a tres términos y sólo busca en el título, inventores y resumen (Figura 5.5). En este sistema parece que no existe un sistema de acceso público para llevar a cabo búsquedas del texto completo de las patentes japonesas (IPDL, 2013).

Searching PAJ
A

MENU
NEWS
HELP

Text Search

For 'Number Search', please click on the right button. (Number Search)

Applicant, Title of invention, Abstract -- e.g. computer semiconductor
Please input a SPACE between each keyword when you use more than one keyword.
One letter word or **Stop words** are not searchable.

AND
AND

AND
AND

AND
AND

Date of publication of application -- e.g. 19980401 - 19980405

-

AND

IPC -- e.g. D01B7/04 A01C11/02
Please input a SPACE between each IPC symbol, when you use more than one IPC symbol.

Search
Stored data

[1-24/ 24] No.
JUMP
SEARCH
B

No.	Publication No.	Title
1.	2012 - 065661	RIBOSWITCH, STRUCTURE-BASED COMPOUND DESIGN WITH RIBOSWITCH, AND METHOD AND COMPOSITION FOR USE OF AND WITH RIBOSWITCH
2.	2011 - 120508	METHOD FOR PRODUCING SUCCINIC ACID
3.	2010 - 284173	ENGINEERING OF METABOLIC CONTROL
4.	2010 - 268807	PROMOTER AND PLASMID SYSTEM FOR GENETIC ENGINEERING
5.	2010 - 022374	METABOLIC ENGINEERING OF AMINO ACID PRODUCTION
6.	2009 - 261398	BIOABSORBABLE POLYMER CONTAINING 2-HYDROXYACID MONOMER
7.	2009 - 100728	FEED FOR PROMOTING DIGESTION, ODOR-REDUCING FEED, INTESTINAL STABILIZER TYPE FEED, FEED FOR ADJUSTMENT OF CALORIES ABSORPTION, FEED FOR IMPROVEMENT OF MEAT, FEED FOR IMMUNOENHANCEMENT, FEED FOR IMPROVEMENT OF CONCEPTION RATE, FEED TYPE WATER PURIFIER, AND MULTI-FUNCTIONAL FOOD
8.	2008 - 237110	STEVIOL SYNTHETIC ENZYME GENE AND METHOD FOR PRODUCING STEVIOL
9.	2007 - 252384	CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM GENE ENCODING METABOLIC PATHWAY PROTEIN
10.	2007 - 202566	CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM GENE ENCODING PROTEIN INVOLVED IN METABOLIC PATHWAY
11.	2006 - 288401	ISOLATED AND PURIFIED NUCLEIC ACIDS COMPRISING GENE AND ITS EXPRESSION-REGULATING REGION
12.	2006 - 280383	METABOLIC ENGINEERING OF AMINO ACID PRODUCTION
13.	2006 - 153637	NEW GLUTAMIC ACID BIOSENSOR UTILIZING PHENOMENON OF FLUORESCENT ENERGY MOVING
14.	2006 - 137820	METHOD FOR PRODUCING POLYAMIDE RESIN, POLYAMIDE RESIN AND MOLDING COMPRISING THE SAME
15.	2004 - 337169	CLONING GENES FROM STREPTOMYCES CYANEOGRISEUS SUBSP.NONCYANOGENUS FOR BIOSYNTHESIS OF ANTIBIOTICS AND METHODS OF USE
16.	2004 - 122029	AERATION TREATMENT SYSTEM FOR EXCRETION WATER
17.	11 - 169178(1999)	GENE FOR GERANYL-DIPHOSPHATE SYNTHASE
18.	08 - 289786(1996)	GLUCOSAMINE-6-PHOSPHATE DEAMINASE
19.	08 - 140674(1996)	HUMAN FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE
20.	08 - 003196(1996)	CALCITONIN DERIVATIVE AND ITS USE
21.	07 - 099987(1995)	PRECURSOR OF PLASTID(AMYLOPLAST), PREPARATION OF NEW PLASTID BY IMPROVING SYNTHETIC FUNCTION OF ITS INITIAL AND PRODUCTION OF NEW CARBOHYDRATE, STARCH RELATED SUBSTANCE AND LOW-MOLECULAR

Figura 5.5.—Una 'búsqueda avanzada' en la base de datos de patentes JPO. A. 'Búsqueda Avanzada' usando el término "ingeniería metabólica". B. Resultados de la búsqueda.

La base de datos de WIPO puede explorarse utilizando operadores booleanos por campo, donde se incluye la portada y el texto completo. A pesar de que las bases de datos de WIPO pueden ser exploradas a través de la aplicación de la EPO descrita anteriormente, el portal de WIPO también permite búsquedas restringidas a oficinas concretas como muestra la Figura 5.6 (WIPO, 2013b).

La página web de CAMBIA ofrece la opción de "búsqueda rápida" que permite buscar a través de palabras clave en todo el texto o en una de las secciones de la pagina frontal (título, resumen, inventor y solicitante) utilizando la sintaxis apropiada (Figura 5.7), mientras que el sistema más complejo de "búsqueda estructurada" permite el uso de expresiones de búsqueda booleanas exhaustivas sobre un

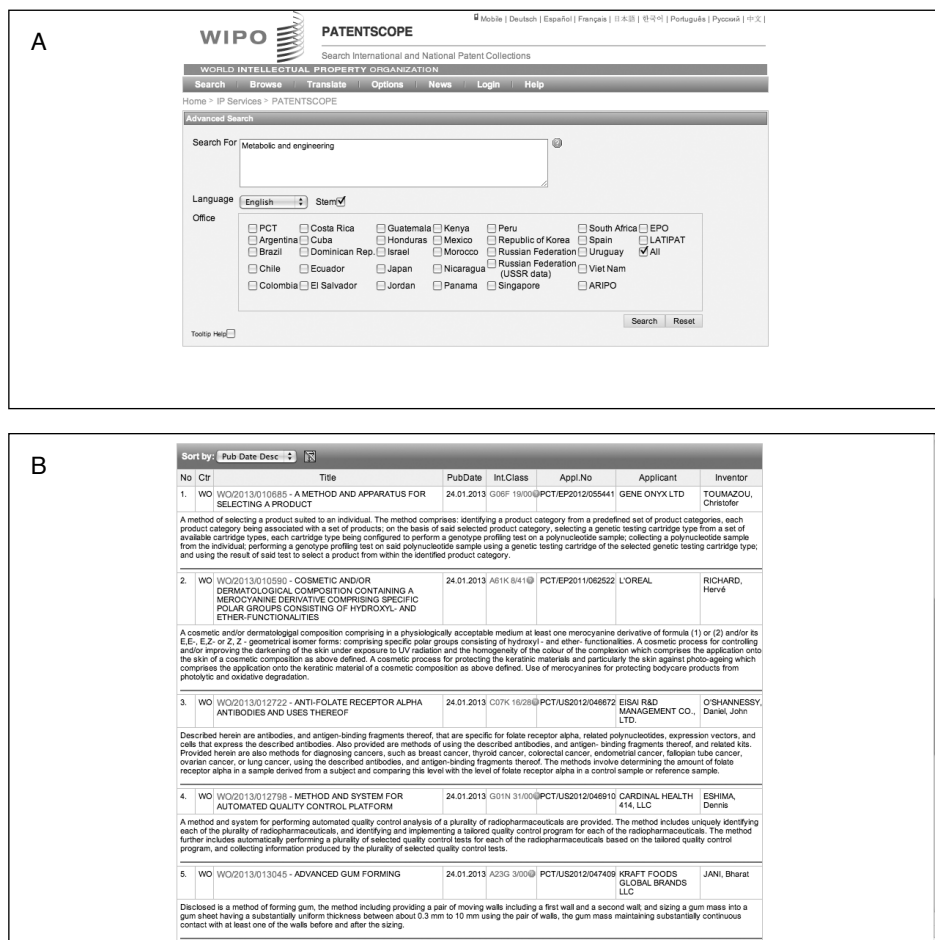


Figura 5.6.—Una 'búsqueda avanzada' en la base de datos de patentes WIPO. A. 'Búsqueda Avanzada' usando el término "ingeniería metabólica". B. Resultados de la búsqueda.

Home Search Patents Search Sequences Help Language: English (US) English (GB) Français 中文 Pycckoe

Patent Lens Free Full-text Worldwide Patent Searching - 12,242,942 patent documents - updated Oct 23, 2012

Patent Number Quick Search Structured Search Expert Search Search for Sequences in Patents

Match all (AND) criteria (if multiple fields are used)

Metabolic AND engineering in full-text

in title (-1)

in abstract (-1)

in inventor (-1)

in applicant/assignee (-1)

Publication or Filing Date

Predicted Expiry Date (US granted patents only)

Lapsed Date (US granted patents only)

Stemming On Items per page 10

Search Reset

Patent Collections

Grants Applications

US US

Europe WIPO/PCT

Australia Australia

Language English

Leave Feedback

A

Search Results for ((Metabolic AND engineering) in fulltext)

Showing 1-10 of 187,278 results (in 0.418 seconds)

No	Patent No	Title	Info	Published	Score
1	AU 2007/299219 A1 patent application	Process for the production of a fine chemical		Mar 27, 2008	
2	WO 2008/034648 A1 patent application	PROCESS FOR THE PRODUCTION OF A FINE CHEMICAL		Mar 27, 2008	
3	WO 2007/087815 A2 patent application	PROCESS FOR THE CONTROL OF PRODUCTION OF FINE CHEMICALS		Aug 9, 2007	
4	US 2009/0259451 A1 patent application	REVERSE ENGINEERING GENOME-SCALE METABOLIC NETWORK RECONSTRUCTIONS FOR ORGANISMS WITH INCOMPLETE GENOME ANNOTATION AND DEVELOPING CONSTRAINTS USING PROTON FLUX STATES AND NUMERICALLY-DETERMINED SUB-SYSTEMS		Oct 15, 2009	
5	US 2009/0210968 A1 patent application	Drought Responsive Genes In Plants And Methods Of Their Use		Aug 20, 2009	
6	US 7469185 granted patent	Primary rat hepatocyte toxicity modeling		Dec 23, 2008	
7	US 2006/0099578 A1 patent application	Mitochondrial biology expression arrays		May 11, 2006	
8	US 2009/0023182 A1 patent application	COMPLEMENTARY METABOLIZING ORGANISMS AND METHODS OF MAKING SAME		Jan 22, 2009	
9	US 2009/0265815 A1 patent application	Sequence-determined DNA fragments and corresponding polypeptides encoded therapy		Oct 22, 2009	
10	WO 2003/029425 A2 patent application	WHOLE CELL ENGINEERING USING REAL-TIME METABOLIC FLUX ANALYSIS		Apr 10, 2003	

View checked patents Save checked patents

Patent Lens (v1.3.8) a service of Cambia | Patent Search Help
Please report any search issues using our feedback form
Disclaimer

Cambia IOI Initiative for Open Innovation

Leave Feedback

B

Figura 5.7.—Una 'búsqueda avanzada' en la base de datos de patentes CAMBIA. A. 'Búsqueda Avanzada' usando el término "ingeniería metabólica". B. Resultados de la búsqueda.

intervalo de campos más amplio. Finalmente, la "búsqueda avanzada o experta", permite introducir toda la petición de búsqueda manualmente, lo que implica un sistema más difícil de aprender, pero es un recurso muy poderoso para realizar búsquedas complejas (Patentlens, 2013).

5.3.3. Resultados del desarrollo de una estrategia de búsqueda enfocada

Nuestra tarea consistió en identificar patentes que podrían interferir en el desarrollo de un proceso comercial basado en la ingeniería de la ruta metabólica TIA en las plantas. Por lo tanto, el primer paso consistió en definir los términos de búsqueda relacionados con la invención que captarían patentes relacionadas. Estos

términos se clasificaron en varias categorías (relacionados con productos, con procesos y con tecnología). Iniciamos el proceso de búsqueda utilizando términos amplios como "ingeniería metabólica" o "producto secundario" con el objetivo de capturar un amplio número de patentes, pese a asumir un alto porcentaje de falsos positivos. Este primer paso fue necesario para definir el espectro de patentes relacionadas con la ingeniería metabólica en el que queríamos centrarnos y, a la vez, asegurarnos que patentes clave no fuesen excluidas en esta primera búsqueda. Por ejemplo, con la búsqueda en la base de datos de la USPTO utilizando "ingeniería metabólica" se obtuvieron más de 14.000 resultados. En el siguiente paso intentamos emparejar esos términos de búsqueda más amplia con términos tangibles más específicos relacionados con la ruta metabólica TIA utilizando los operadores booleanos, buscamos por ejemplo "ingeniería metabólica **AND** estripectosidina". Redactamos una lista de genes/enzimas, intermediarios y productos importantes para la ruta y los emparejamos con los cuatro términos generales que habían sido más productivos en número de resultados: "ingeniería metabólica", "productos naturales", "metabolismo secundario" y "productos secundarios" (Miralpeix et al., 2014).

Descubrimos que esta estrategia inicial requería de varias búsquedas repetitivas que producían resultados que a menudo se solapaban debido a que muchas patentes relacionadas con la ingeniería metabólica enumeran múltiples genes, enzimas, intermedios y productos, incluso si éstos no están directamente relacionados con la invención, y también porque muchas patentes contienen más de uno de los términos generales que usamos para definir el alcance de patentes relacionadas con la ingeniería metabólica. Como consecuencia, desarrollamos una estrategia de búsqueda inteligente basada en el uso de operadores booleanos y caracteres comodín para definir un término ideal que capturase el rango de patentes que queríamos explorar.

La segunda ronda de búsquedas la llevamos a cabo combinando dos estrategias distintas. En la primera evaluamos el coste de restringir la búsqueda al título/resumen o sólo al título comparándolo con explorar el texto completo. En la segunda refinamos el rango de la búsqueda con términos adicionales. Con el fin de excluir la ingeniería metabólica en microorganismos, añadimos términos para asegurarnos que la patente incluyese el término planta o un derivado y también añadimos términos identificando plantas medicinales específicas y plantas modelo (por ejemplo tabaco, *Arabidopsis*, *Catharanthus*). Estos términos fueron relacionados por el operador booleano **OR** con el objetivo de evitar la ambigüedad con la palabra planta, como se daría en el caso de una planta de manufacturación o una planta de maquinaria pesada.

Nos dimos cuenta de que la búsqueda sólo en el título/resumen era demasiado restrictiva y que generaba demasiados falsos negativos. Por ejemplo, buscando en la base de datos de la USPTO con los términos "P450 **AND** ingeniería metabólica **AND** planta **AND** (tabaco **OR** *Arabidopsis* **OR** *Catharanthus*)" se obtuvo un resultado de 226 patentes cuando examinamos el texto completo; el resultado se redujo

a nueve patentes cuando se restringió la búsqueda al título y resumen; se obtuvieron únicamente tres patentes cuando examinamos sólo los títulos. Los términos generales para elementos tangibles como alcaloide y terpenoide, fueron también demasiado generales y capturaron demasiadas patentes cuando examinamos el texto completo. No obstante, en muchos casos, la restricción de búsqueda al título/resumen/reivindicaciones redujo el número de resultados a prácticamente cero o cero (Miralpeix et al., 2014).

5.3.4. Desarrollo de una estrategia de búsqueda ideal

Para afrontar el reto de desarrollar una estrategia de examen de patentes, sin redundancias, que capturara todas las patentes relevantes con el menor número de falsos positivos, se decidió desarrollar una estrategia ideal de búsqueda que incluiría cuatro términos generales, la restricción a plantas modelo y medicinales y a los elementos tangibles como genes y enzimas, intermediarios y productos. Se probaron estos términos utilizando los elementos tangibles más generales como "alcaloide" y "terpenoide" para evaluar el impacto de las diferentes secuencias de búsqueda en la recuperación de patentes relevantes e irrelevantes. Además de los términos tangibles se determinaron cuatro términos más a añadir que permitían reducir el número de falsos positivos sin eliminar patentes relevantes, pero esta adición no mejoró los resultados. Encontramos que el término "planta" mejoraba la relevancia de los resultados y que el hecho de añadir el nombre de varias especies sólo aumentaba marginalmente el número de resultados, lo que indica que los autores de patentes utilizan ocasionalmente el nombre de la especie de una planta sin concretar que se trata de una planta (Miralpeix et al., 2014).

En términos booleanos, la secuencia de búsqueda ideal fue:

"X AND ingeniería metabólica AND (producto natural* OR secundario) AND (planta* OR Y)"

Donde la **X** es el término tangible primario, **Y** es una lista de especies de plantas separadas por la operación **OR** y ***** es un carácter comodín que puede sustituir cualquier número de los caracteres reales. La expresión booleana (*producto natural* OR secundario*) abarca "producto(s) natural(es)", "producto(s) secundario(s)", y "metabolismo secundario".

La búsqueda fue realizada de un modo distinto en cada base de datos porque el formato para introducir los términos de búsqueda booleanos es específico de cada una de ellas. Por ejemplo, USPTO requería que las frases fuesen introducidas entre comillas y no aceptaba términos comodín, por lo que las frases en plural tuvieron que ser enumeradas de forma separada de las frases en singular. Esto se pudo llevar a cabo porque se permite hasta 20 términos de búsqueda en una secuencia, por lo que el texto de la búsqueda correspondiente fue:

X\$ AND "ingeniería metabólica" AND ("productos naturales" OR "natural AND producto" OR secundario) AND (planta\$ OR tabaco OR Catharanthus OR Arabidopsis OR Y)

Donde la **X** es el término primario tangible, **Y** es una lista opcional de especies de plantas adicionales y **\$** es el símbolo escogido por la base de datos de la USPTO como término comodín.

El motor de búsqueda de la base de datos de EPO sólo permite once términos de búsqueda, pero acepta comodines sin necesidad de comillas, por lo que la secuencia de búsqueda correspondiente fue:

X* AND 'ingeniería metabólica' AND (secundario OR 'producto natural*') AND (planta* OR tabaco OR Catharanthus OR Arabidopsis OR Y)

El motor de búsqueda de CAMBIA se rige por normas similares al de la EPO, mientras que la JPO tan solo permite introducir tres términos en campos separados para las búsquedas en títulos/resúmenes.

5.3.5. Desarrollo de un sistema de control de calidad

Las búsquedas iniciales sin restricciones arrojaron muchos falsos positivos en todas las bases de datos, pero limitar la búsqueda a títulos y resúmenes eliminaba muchas patentes relevantes. La finalidad de afinar los métodos de exploración explicados anteriormente fue para reducir el número de falsos positivos sin obviar patentes relevantes. Por estas razones, llevamos a cabo una revisión exhaustiva, una por una, del término de búsqueda general "terpenoide" para determinar el número de patentes relevantes y luego planear un sistema de control de calidad para evaluar los resultados de las búsquedas refinadas (Miralpeix et al., 2014).

El resultado de la evaluación se calculó estableciendo una puntuación del 100% cuando el resultado de la búsqueda proporcionaba sólo patentes relevantes y no había falsos positivos. La puntuación se reducía proporcionalmente para los falsos negativos, en el porcentaje de patentes relevantes, y para los falsos positivos, en el porcentaje de resultados. Asumiendo que el número de patentes relevantes para un término de búsqueda X es exactamente 100, una secuencia de búsqueda que recuperase todas esas patentes y tan sólo esas, conseguiría la máxima puntuación de calidad: 100%. Una búsqueda que recuperase el 90% de patentes relevantes sin falsos positivos, conseguiría una puntuación del 90%, mientras que una búsqueda que recuperase las 100 patentes relevantes junto a otras 50 irrelevantes puntuaría un 66% (33% del total son irrelevantes). La penalización para falsos positivos y falsos negativos es aditiva, por lo que una búsqueda que recuperara 95 patentes relevantes y 35 de irrelevantes puntuaría un 72% (100% - 23%). Esta aproximación penaliza más a un falso negativo que a un falso positivo, por lo que refleja la mayor importancia de obviar patentes relevantes en lugar de incluir alguna irrelevante, que puede ser manualmente desestimada más adelante. Este método de evaluación otorga puntuaciones negativas si la búsqueda está mal diseñada.

5.4. Presentación de los resultados de búsqueda

La estrategia de búsqueda descrita anteriormente fue realizada con un reducido número de palabras clave que representaban genes/enzimas, productos/intermedios y procesos (Miralpeix et al., 2014). Este hecho redujo el volumen de patentes a un número razonable, adecuado para la selección manual. La relevancia de cada patente fue evaluada leyendo el título, el resumen y finalmente las reivindicaciones. El título ofrecía una guía preliminar de la relevancia, pero esto aun resulto en casos que estaban en el límite y precisaban ser evaluados con mayor detalle para considerar el impacto en el proyecto. Las reivindicaciones eran la parte más importante del documento porque determinaban la extensión de la protección, y son consideradas como el "patrón dorado" que permite juzgar la relevancia de la patente. Este análisis resultó en un conjunto básico de aproximadamente 300 patentes relevantes, que se acotaron a 49 cuando fueron eliminados los miembros redundantes de las misma familia de patentes (Miralpeix et al., 2014). Estas 49 patentes fueron añadidas a la base de datos de propiedad intelectual del proyecto SmartCell, que puede ser buscadas por el número de la patente, título, fecha de archivo, solicitante, inventor y otras categorías, incluyendo el potencial impacto en productos comerciales derivados del proyecto (Figuras 5.8 y 5.9).

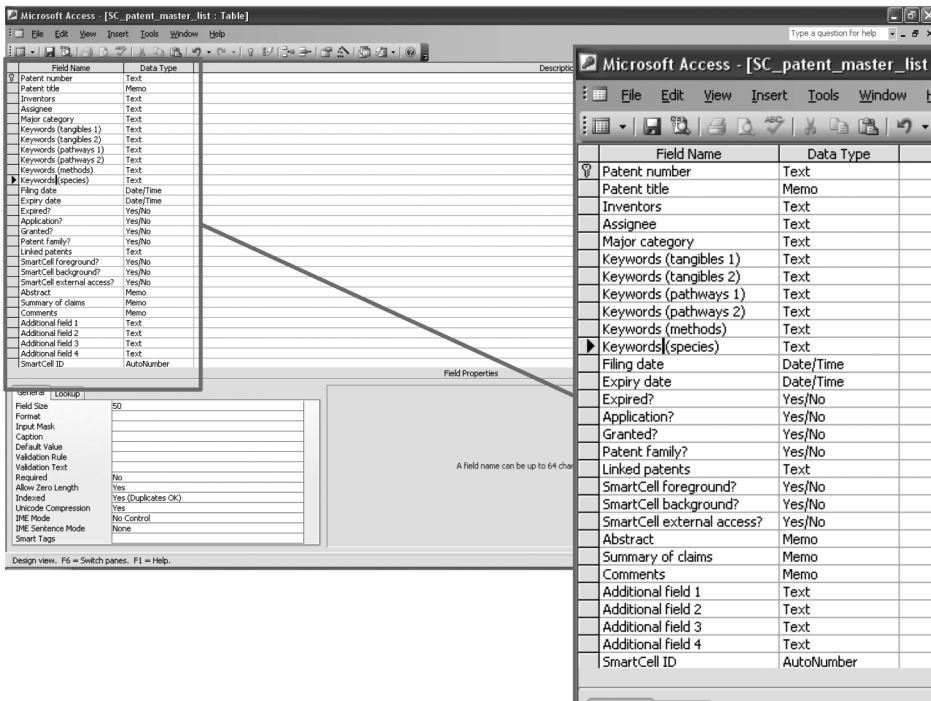


Figura 5.8.—Las categorías en la base de datos de propiedad intelectual de SmartCell.

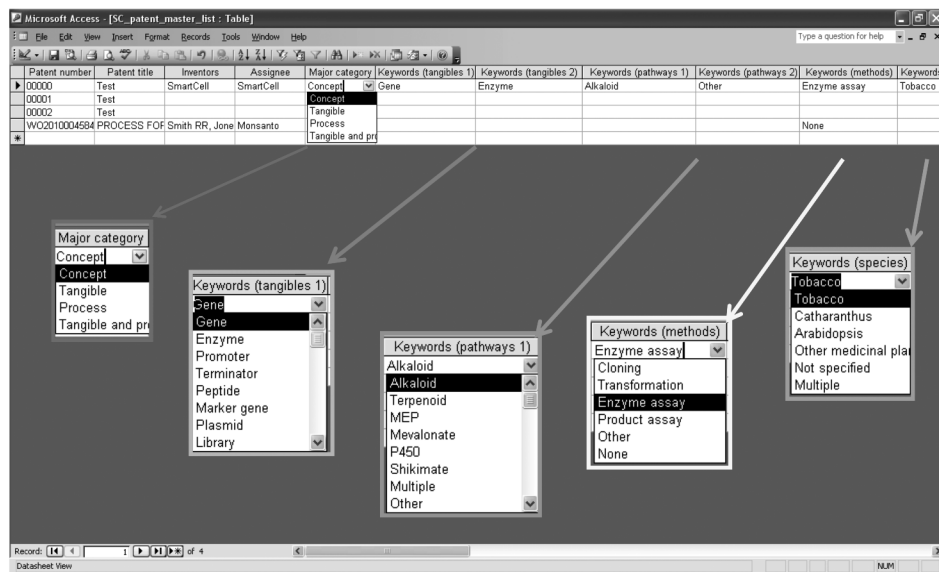


Figura 5.9.—Las palabras clave utilizadas para clasificar las patentes relevantes en la base de datos de propiedad intelectual de SmartCell.

Para resumir el impacto de las reivindicaciones en cada una de esas 49 patentes, se organizaron en 5 categorías:

- **Genes/Proteínas.** Aquí se incluyeron las reivindicaciones que englobaban secuencias de ADN específicas aisladas o recombinantes, los productos correspondientes y sus usos. En este punto identificamos 16 patentes relevantes que englobaban 11 genes/proteínas individuales y 5 productos individuales o intermediarios de la ruta TIA.
- **Ruta metabólica TIA sintética.** Aquí se incluyeron las reivindicaciones relacionadas con versiones sintéticas de la ruta metabólica TIA utilizadas para generar metabolitos específicos. En este punto se identificaron 5 patentes relevantes.
- **Organismos modificados genéticamente.** Aquí se incluyeron las reivindicaciones relacionadas a células vegetales, tejidos y plantas enteras que contenían o expresaban parte de la ruta metabólica TIA. En este punto se identificaron 5 patentes relevantes.
- **Métodos específicos.** Aquí se incluyeron las reivindicaciones relacionadas con los métodos de clonación y expresión que tenían como objetivo específico la ruta metabólica TIA, que distaban de los métodos de clonación generales, incluyendo, vectores específicos, construcciones, librerías, sondas y también métodos para la transferencia de genes y el cultivo de tejidos. En este punto se identificaron 19 patentes relevantes.

- **Producción industrial.** Aquí se incluyeron reivindicaciones para procesos y producciones a gran escala. En este punto se identificaron 4 patentes relevantes.

5.5. Discusión de los resultados

Las bases de datos de patentes a las que se puede acceder son un recurso muy valioso, ya que permiten a los investigadores estudiar el cuerpo de conocimiento existente o "estado de la técnica", sin incurrir en los costes de contratar especialistas en patentes o en malgastar financiación en programas inútiles. No obstante, el hecho de que haya más de 40 millones de patentes y solicitudes publicadas, convierte la exploración de las bases de datos gratuitas en una ardua e intensiva tarea si no se dispone de una estrategia focalizada de búsqueda. (WIPO, 2006). Como ejemplo analizamos las patentes relacionadas con la ingeniería del metabolismo de la ruta TIA en plantas. Desarrollamos una estrategia de búsqueda enfocada a eliminar redundancias y a reducir el volumen de trabajo sin perder las patentes relevantes e importantes. El resultado fue la identificación de 49 patentes clave relacionadas con la ingeniería metabólica de la ruta TIA en plantas, que luego clasificamos en 5 categorías principales.

La categoría de Genes/Proteínas contiene 16 de las 49 patentes relevantes y pudo ser dividida en 4 subcategorías (a) secuencias aisladas; (b) secuencia aislada, métodos de producción de proteínas y uso; (c) enzimas y sus reacciones; y (d) métodos para la preparación de un compuesto. Todas las patentes fueron clasificadas a excepción de la CN101250543 porque las reivindicaciones no estaban disponibles en inglés (Miralpeix et al., 2014). Las reivindicaciones en la subcategoría (a) son los polinucleótidos que mejoran la producción de como mínimo un metabolito secundario, como la tabersonina, catarantina, vinblastina, vincristina y cualquier combinación de ellas, también las secuencias que codifican polipéptidos con actividad citocromo P450. Las reivindicaciones en la subcategoría (b) protegen secuencias como la geranil difosfato sintasa, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa, sesquiterpenoide sintasa/ciclasa y terpeno sintasa/ciclasa. También protegen los vectores que contienen estas secuencias, así como células huéspedes o plantas transgénicas transformadas utilizando esos vectores. Las reivindicaciones en la subcategoría (c) protegen enzimas que rompen la unión $\beta(1,4)$ del p-nitrofenil β -D-glucopiranosido y esto convierte el 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato [sic] en 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato. Las reivindicaciones en la subcategoría (d) están relacionados con métodos para la preparación de la strictosidina y productos naturales que procedan de especies de *Vinca*.

La categoría de la **Ruta Metabólica TIA sintética** engloba 4 patentes que protegen diferentes métodos para la producción de moléculas relacionadas con la ruta metabólica TIA como triptamina, isoprenoides y serpentina, utilizando plantas transgénicas o células transformadas con genes. Pero a diferencia de la categoría

de genes/proteínas, las reivindicaciones propuestas no protegían los genes o las proteínas implicadas.

La categoría de **Organismos Modificados Genéticamente** engloba 5 patentes generales que reivindicaban métodos para producir compuestos mediante ingeniería metabólica, incluyendo los métodos de transformación de células, protoplastos, tejidos de plantas o plantas enteras para adquirir un perfil metabólico específico.

La categoría de **Métodos Específicos** contenía 18 de las 49 patentes relevantes, que reivindicaban métodos específicos relacionados con (a) identificación de genes/proteínas en la ruta metabólica TIA, (b) análisis de los metabolitos correspondientes, (c) producción de estos metabolitos y (d) modulación de la producción mediante la manipulación de la expresión genética (Miralpeix et al., 2014). Las reivindicaciones en la subcategoría (a) protegen métodos que identifican genes, productos de los genes y metabolitos o determinan la función de un gen (donde se incluyen sistemas informáticos y el programario utilizado para predecir la actividad de los enzimas). La subcategoría (b) incluye una única patente que protege un método para analizar los metabolitos en una muestra biológica, incluyendo el marcaje isotópico de los metabolitos utilizando un kit. Las reivindicaciones en la subcategoría (c) se relacionaron con 6 patentes que protegen métodos para la producción de metabolitos secundarios *in vitro* mediante cultivos de células vegetales, incluyendo los biorreactores, el medio y el sistema de cultivo, y los métodos para convertir el sustrato en un producto apropiado utilizando las enzimas. Las reivindicaciones en la subcategoría (d) incluyen la protección de los promotores, transportadores, vectores y los péptidos señal y los vectores que los contienen.

Finalmente, la categoría de producción industrial incluyó 4 patentes relevantes, tres de las cuales protegían el uso de células y plantas fruto de la ingeniería genética como biorreactores para la producción a gran escala de metabolitos importantes. La cuarta patente estaba sólo disponible en japonés por lo que no se pudo determinar su importancia.

Las solicitudes de patente deberían incluir una descripción del cuerpo de conocimiento existente o "estado de la técnica" para mostrar cómo la invención es nueva, no evidente y aplicable en un entorno industrial. Por tanto, el estado de la técnica debe ser analizado comparándolo con las invenciones preexistentes o reivindicaciones con las que se solapan y que pueden influir en las posibilidades de éxito comercial. Las grandes organizaciones contratan expertos en patentes para llevar a cabo una búsqueda diligente, pero esto, a menudo, va más allá de las capacidades y posibilidades de la investigación financiada con fondos públicos. Por lo tanto, muchos investigadores hacen uso de bases de datos de patentes gratuitas que mantienen organizaciones como EPO, USPTO, JPO y CAMBIA, que aproximadamente cubren más del 80% de los documentos de patentes de todo el mundo (Eurostat, 2013).

La disponibilidad de más de 40 millones de patentes significa que la búsqueda y análisis pertinente puede ser un proceso laborioso y lento, si no se realiza de una forma enfocada. Sin embargo, centrarse sólo en las patentes relevantes no debería conllevar un alto riesgo de exclusión accidental.

En conclusión, hemos desarrollado un procedimiento de búsqueda por etapas de alta calidad, que permite la recuperación de las patentes más relevantes mientras que excluye la mayoría de falsos positivos y sirve como primera aproximación para determinar la patentabilidad de una invención sin recurrir a la ayuda de un profesional caro. Esta estrategia de búsqueda nos ha permitido identificar 49 patentes relevantes para la ingeniería de la ruta metabólica TIA en las plantas, mostrando los principales genes/proteínas, productos, productos intermedios y los métodos que necesitan ser negociados, así como las rutas sintéticas descritas anteriormente y organismos manipulados genéticamente relevantes para la investigación. Los datos así recogidos permitirán a los investigadores "inventar rodeando" estas restricciones evitando la infracción de patentes, y garantizando que no se están utilizando secuencias, vectores, biorreactores o métodos de procesamiento protegidos. Es importante destacar que la estrategia descrita en este capítulo puede ser fácilmente aplicada en otros proyectos de investigación mediante la modificación apropiada de la estrategia de búsqueda.

5.6. Referencias

- Adcock M. 2007. Intellectual property, genetically modified crops and bioethics. *Biotech. J.* 2: 1088-1092.
- CAMBIA 2010 <http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>; consultado diciembre 2009-diciembre 2010
- CAMBIA 2013a <http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>; consultado 07-enero-2013
- CAMBIA 2013b <http://www.cambia.org/daisy/cambia/about/595.html>; consultado 07-enero-2013
- CAMBIA 2013c <http://www.cambia.org/daisy/cambia/about/594.html>; consultado 07-enero-2013
- EPO 2013a <http://www.epo.org/about-us/organisation.html>; European Patent Organisation; consultado 03-enero-2013
- EPO 2013b <http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>; Espacenet; consultado 03-enero-2013
- Espacenet patent search 2010 http://worldwide.espacenet.com/advancedSearch?locale=en_EP; Advanced search, consultado diciembre 2009-diciembre 2010
- Espacenet patent search (2013a) http://worldwide.espacenet.com/?locale=en_EP; Smart search consultado 03-enero-2013
- Espacenet patent search 2013b http://worldwide.espacenet.com/advancedSearch?locale=en_EP; Advanced search, consultado 03-enero-2013
- Eurostat 2013 http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Patent_statistics; Patent statistic, consultado 04-enero-2013
- Fleck B, Baldock C. 2003. Intellectual property protection for plant-related inventions in Europe. *Nature* 4: 834-838.
- IPDL (2010) http://www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl; IPDL-Industrial Property Digital Library, consultado diciembre 2009-diciembre 2010

- IPDL (2013) http://www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl; IPDL-Industrial Property Digital Library, consultado 03-enero-2013
- JPO (2013) <http://www.jpo.go.jp/>; Japan Patent Office, consultado 03-enero-2013
- Kannan N. 2010. Importance of intellectual property rights. *Int. J. Intellect. Prop. Rights* 1: 1-5.
- Lei Z, Juneja R, Wright B.D. 2009. Patents versus patenting: implications of intellectual property protection for biological research. *Nat. Biotech.* 27: 36-40.
- Miralpeix B, Sabalza M, Twyman R, Christou P, Capell T. 2014. Strategic patent analysis in plant biotechnology: terpenoid metabolic engineering as a case study. *Plant Biotech. J.* 12: 117-134.
- Parisi C, Rodríguez-Cerezo E, Thangaraj H. 2013. Analysing patent landscapes in plant biotechnology and new plant breeding techniques. *Transg. Res.* 22: 15-29.
- Patentlens (2013) <http://www.patentlens.net/patentlens/structured.html?noScroll>; consultado 07-enero-2013
- USPTO (2010) <http://www.uspto.gov/patents/process/search/#heading-6>; Search for patents, consultado diciembre 2009-diciembre 2010
- USPTO (2013a) <http://www.uspto.gov/about/offices/index.jsp>; USPTO offices, consultado 03-enero-2013
- USPTO (2013b) <http://www.uspto.gov/patents/process/search/#heading-6>; Search for patents, consultado 03-enero-2013
- WIPO 2006 *Inventing the future, an introduction to patents for small and medium-sized enterprises. Intellectual Property for Business Series 3: 1-47.*
- WIPO (2008) *WIPO intellectual property handbook. WIPO publications 1-488.*
- WIPO (2012) *WIPO IP facts and figures. WIPO Economics & Statistics Series 1-42.*
- WIPO (2013a) <http://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf> Patent scope, consultado 03-enero-2013
- WIPO (2013b) [http://www.wipo.int/about-wipo/en/What is WIPO?](http://www.wipo.int/about-wipo/en/What%20is%20WIPO%3F), consultado 04-enero-2013

6 La identificación para el registro de variedades: examen técnico y descriptores morfológicos y moleculares

José M. Alonso¹, David Calvache², Jesús Mérida³, Luis Salaíces⁴ y Ángel Fernández i Martí^{1,5}

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

² Centro de Evaluación de Variedades de Valencia, INIA

³ Centro de Evaluación de Variedades de Sevilla, INIA

⁴ Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente

⁵ Genome Center, University of California, Davis, EE UU

6.1. Antecedentes

6.2. El registro español de variedades vegetales

6.2.1. Tipos de registros

6.2.2. El derecho del obtentor

6.2.3. La excepción del agricultor

6.2.4. Otras limitaciones al derecho del obtentor

6.2.5. Duración del derecho del obtentor

6.2.6. Vulneración de los derechos del obtentor

6.3. El examen técnico de variedades

6.3.1. Examen técnico de variedades de hortalizas

6.3.2. Examen técnico de variedades de frutales

6.3.3. Examen técnico de variedades de cultivos extensivos

6.4. La identificación molecular

6.5. Referencias

6.1. Antecedentes

Como se expone en el Capítulo 1, la mejora genética tiene como objetivo fundamental la obtención de nuevas variedades que resuelvan los problemas actuales del cultivo. Evidentemente, toda nueva variedad, antes de ser ofrecida al mercado, debe quedar perfectamente definida para su reconocimiento en todos los niveles de su utilización, desde el productor de semillas o el viverista que la propagan para ofrecerla a los agricultores para su cultivo, a estos mismos productores, al sector comercial y finalmente al consumidor. Por lo tanto, la descripción de una variedad no sólo es un paso esencial en su registro oficial, con todos los requisitos que se analizan en el Capítulo 8, sino también una definición de sus características para conocimiento de todos los sectores involucrados en su producción y comercialización, ya que tienen un interés directo en su reconocimiento, definido por la posibilidad de disponer de su "carnet de identidad" para su perfecta caracterización. En una nueva variedad se ha acumulado todo el avance tecnológico logrado mediante los trabajos de mejora.

A lo largo de los años se han ido definiendo los caracteres más significativos para la identificación varietal, siendo especialmente demostrativo el ejemplo de la vid, en el que se han desarrollado amplias descripciones ampelográficas para la caracterización de las variedades, en una discusión permanente sobre los caracteres más relevantes en la discriminación de las diferencias entre variedades. Hay que tener en cuenta que para el registro de una nueva variedad, como también se expone en el Capítulo 8, esta nueva variedad debe superar un examen técnico que demuestre que es diferente, uniforme y estable (examen DUS), para el que se deben definir los caracteres que realmente permitan establecer si una variedad supera o no este examen.

6.2. El registro español de variedades vegetales

Previo al establecimiento del registro europeo de variedades vegetales que se expone en el capítulo 8, en España ya venía funcionando un sistema de registro y protección que sigue en vigor de forma paralela y complementaria a la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV), adaptando su funcionamiento a las nuevas normativas establecidas por la Unión Europea a lo largo de los años.

En el marco español, la protección de variedades vegetales comienza con la **Ley 11/1971 de 30 de marzo**, de Semillas y Plantas de Vivero en el que definen dos puntos fundamentales de la labor del Ministerio de Agricultura, ya que debía establecer un Registro de Variedades Comerciales de de Plantas y recomendaciones o restricciones en el uso de las mismas, así como un Registro de Variedades Protegidas (Artº 51-e), así como las normas para la debida protección de las derechos del obtentor de nuevas variedades (Artº 5º-d).

A la luz del desarrollo legislativo en relación a la protección de las variedades vegetales, actualmente coexisten tres sistemas de protección en España:

1.–La **Ley 12/1975 de 12 de marzo**, cuyas normas siguen de aplicación para los títulos concedidos conforme a dicha ley, con las excepciones establecidas por la ley posterior. Entre las excepciones que no se aplican cabe destacar el privilegio del agricultor, en conformidad con el Acta de 1972 de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV).

2.–La **Ley 3/2000, de 7 de enero**, de régimen jurídico de la protección de las obtenciones vegetales, en conformidad con el Acta de 1991 de la UPOV.

3.–La protección Comunitaria establecida en el **Reglamento (CE) 2100/94, del Consejo, de 27 de julio**, relativo a la protección comunitaria de las obtenciones vegetales, de aplicación en todo el territorio de la Unión Europea, y que en materia de infracciones, acciones judiciales y sanciones remite a las legislaciones nacionales en materia sobre derechos de obtentor del país en que se cometa el delito o la infracción, conforme al Acta de 1991 de la UPOV.

La Autoridad competente para la tramitación y resolución de los procedimientos de concesión de los títulos de obtención vegetal es el Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente a través de la **Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV)**. Tramitados los expedientes por la OEVV, son estudiados por la **Comisión Nacional de Protección de Obtenciones Vegetales** que emite las propuestas de concesión o denegación del derecho al Ministro, autoridad que finalmente concede o deniega el derecho

Las Comunidades Autónomas ejercen las facultades relativas a la recepción de las solicitudes y a la apreciación del cumplimiento o falta de cumplimiento de los requisitos formales de las mismas. La potestad sancionadora se ejerce por la Comunidades Autónomas y por la Administración General del Estado, de acuerdo con sus respectivas competencias.

Los requisitos para la inscripción de una variedad son los de novedad, distinción, estabilidad y homogeneidad, a los que va dirigido especialmente el examen técnico, pero también se debe cumplir con la obligación de proponer una denominación adecuada y se deben abonar las tasas correspondientes.

El sistema "sui generis" de protección del derecho del obtentor establecido en España en la Ley 3/2000, de 7 de enero de Régimen Jurídico de la Protección de las Obtenciones Vegetales, está abierto para todos los géneros y especies vegetales.

En el marco español de la protección de variedades vegetales queda prohibida la protección por el sistema de patentes. Así mismo se establecen una serie de normas en relación al derecho del obtentor, a las limitaciones a este derecho, a su duración y a sus posibles vulneraciones, así como al beneficio del agricultor.

6.2.1. Tipos de registros

Tanto la legislación española como la de la UE establecen varias categorías de variedades que corresponden a diferentes estatus legales. El obtentor deberá decidir cuál es la opción más adecuada, dependiendo del origen del material de partida, del método de obtención, de las innovaciones introducidas, de la previsión de la extensión de su uso, y del grado de exclusividad al que se aspire en la posible comercialización de la misma. Las categorías actualmente existentes son:

Variedad comercial. Da derecho a comercializar la variedad en toda la UE.

Variedad protegida (con título de obtención vegetal). Da el derecho de **exclusividad** en la multiplicación y comercialización de la variedad en el ámbito geográfico de un Estado concreto, o en el ámbito de la UE. Es compatible y complementario con la opción anterior. Se puede aplicar también a variedades no comerciales como por ejemplo líneas parentales.

Variedad de conservación. Da derecho a comercializar la variedad en un ámbito geográfico reducido. Está pensado para variedades tradicionales específicas de una comarca. Incompatible con la protección.

Variedad sin valor intrínseco o para su cultivo en condiciones determinadas (Más conocida como variedad para amateur) Es la categoría inferior en cuanto a exigencias de calidad. De hecho se proyecta sustituir en la legislación, el nombre por la expresión "material de reproducción vegetal con nichos de mercado", probablemente para no entrar en conflicto con el concepto de variedad que implica unas exigencias de uniformidad. Es una categoría permitida con objeto de favorecer la biodiversidad, que se puede comercializar sólo en pequeños envases y cantidades limitadas.

Los requisitos de las variedades para su registro es que sean distintas (de todas las demás variedades notoriamente conocidas), homogéneas y estables (el nivel de homogeneidad, y por tanto de estabilidad, exigibles es más alto para variedades comerciales y protegidas que para variedades de conservación y para cultivo en condiciones determinadas). En el caso de las especies de gran cultivo se exige superar una prueba de valor agronómico. Además, para obtener el título de Obtención Vegetal (variedad protegida) se exige que la variedad sea nueva, es decir que no haya sido comercializada con anterioridad.

6.2.2. El derecho del obtentor

La protección de una variedad da el derecho exclusivo al obtentor de llevar a cabo las siguientes operaciones: la producción o la reproducción (multiplicación) del material vegetal; su acondicionamiento con los fines de la reproducción o de la multiplicación; la oferta en venta o la venta o cualquier otra forma de comercialización; la exportación, la importación, o la posesión para cualquiera de los fines mencionados en los apartados anteriores. También se requiere la autorización

del obtentor para los actos mencionados anteriormente realizados respecto del producto de la cosecha, siempre que **se haya obtenido por utilización no autorizada de material de reproducción o multiplicación de la variedad protegida**, y el obtentor no haya podido ejercer razonablemente su derecho en relación con dicho material de reproducción o multiplicación. Igualmente **se extiende este derecho a los productos fabricados con el producto de la cosecha**, en las mismas condiciones señaladas en el caso anterior.

Todos los actos que forman parte del contenido del derecho del obtentor vienen referidos únicamente a actuaciones realizadas respecto al material de reproducción o multiplicación. El derecho del obtentor no se extiende a los actos relativos al material de su variedad que no impliquen una nueva reproducción o multiplicación.

6.2.3. La excepción del agricultor

Los agricultores están autorizados a utilizar con fines de propagación en sus *propias explotaciones* el producto de la cosecha obtenido de la siembra en ellas de material de propagación de una variedad protegida que haya sido adquirida lícitamente y no sea híbrida ni sintética. Además se define lo que se entiende por "explotación propia" y por "agricultor". Este derecho no se aplica a todas las especies, sino sólo a las siguientes: **especies forrajeras** (zulla, almortas, altramuz blanco, altramuz azul, altramuz amarillo, alfalfa, esparceta, guisantes, trébol de Alejandría, trébol persa, alholva, veza, haba, yeros y almortas), **cereales** (avena, cebada, arroz, alpiste, centeno, triticale, trigo blando, trigo duro, escaña mayor), **patata, oleaginosas y textiles** (colza, nabina, linaza, excluido el lino textil) y **hortícolas** (lenteja, garbanzo, judías y guisantes).

En relación al derecho del agricultor, los pequeños agricultores no están obligados a pagar remuneraciones al titular del derecho, pero los demás agricultores están obligados a pagar al titular una remuneración, que será apreciablemente menor que la cantidad que se cobre por la producción, bajo licencia, de material de propagación de la misma variedad en la misma zona.

6.2.4. Otras limitaciones al derecho del obtentor

El derecho del obtentor no se extiende a los actos realizados en un marco privado con fines no comerciales, a los actos realizados a título experimental ni a los actos realizados a los fines de la creación de nuevas variedades.

También se establecen limitaciones por interés público, que deben ser establecidas por Real Decreto, acordado por el Consejo de Ministros a propuesta del Ministro de Agricultura y Medio Ambiente. Se consideran motivos de interés público casos como los que la iniciación, el incremento o la generalización de la explotación de la variedad protegida, o la mejora de las condiciones en que tal explotación se realiza, sean de primordial importancia para la salud pública o para la defensa nacional o para el medio ambiente; que la falta de explotación o la insuficiencia en

calidad o en cantidad de la explotación realizada, implique graves perjuicios para el desarrollo económico o tecnológico del país; o que las necesidades de abastecimiento nacional así lo exijan.

Cuando existan estas razones se podrá conceder **licencias obligatorias** a terceros, adoptando el Gobierno las medidas necesarias para que los titulares de los derechos afectados reciban una compensación económica equitativa.

Cuando un **obtentor no pudiera obtener o explotar un derecho de obtención vegetal** sin vulnerar una patente anterior, podrá solicitar una licencia obligatoria no exclusiva de la invención protegida por la patente, en la medida en que dicha licencia sea necesaria para la explotación de la variedad vegetal que deba protegerse, mediante el pago de una compensación económica adecuada al titular de la patente. Cuando se conceda una licencia de este tipo, el titular de la patente tendrá derecho a una licencia recíproca.

Cuando el **titular de una patente de invención biotecnológica** no pudiera explotarla sin infringir un derecho de obtención vegetal anterior, podrá solicitar una licencia obligatoria no exclusiva de la variedad vegetal protegida, mediante el pago de una compensación adecuada al titular del derecho de obtención vegetal. Cuando se conceda una licencia de este tipo, el titular del derecho de obtención vegetal tendrá derecho a una licencia recíproca.

6.2.5. Duración del derecho del obtentor

El derecho del obtentor se extiende **hasta el final** del vigésimo quinto año natural o, en caso de variedades de vid y de especies arbóreas, hasta el final del trigésimo año natural.

Durante el periodo comprendido **entre la presentación de la solicitud y la concesión del derecho**, el solicitante de un título de obtención vegetal tiene derecho a percibir una compensación económica de quien, durante el mencionado periodo, haya realizado actos que, tras la concesión del derecho, requieran la autorización del obtentor, siendo obligatorio que el titular ponga en conocimiento del tercero la existencia de la solicitud. Si el derecho de obtentor es finalmente **rechazado** el solicitante, salvo pacto en contrario, esta obligado a **devolver al tercero** las cantidades recibidas.

6.2.6. Vulneración de los derechos del obtentor

El titular del derecho del obtentor puede ejercitar ante los órganos de la jurisdicción ordinaria **las acciones civiles y penales** que correspondan contra quienes lesionen su derecho y exigir las medidas necesarias para su salvaguardia. El delito penal se ha configurado en el Código Penal español como **delito perseguible de oficio**, lo que quiere decir que no es necesario la denuncia del agraviado para su persecución.

Las infracciones administrativas pueden dar lugar a sanciones económicas, pérdida de la condición de productor de semillas o de plantas de vivero, decomiso del material vegetal, precintado de locales, y otras medidas precautorias.

6.3. El examen técnico de variedades

La Autoridad Competente en materia de examen técnico es el Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente. El ensayo para el examen técnico implica el cultivo de la variedad. La autoridad competente puede realizar el ensayo DHE por sí misma o encargarlo a las Comunidades Autónomas o a otras instituciones nacionales o extranjeras que desarrollen tareas similares. En los casos que se determinen, se pueden utilizar los resultados de los exámenes técnicos realizados en otro país con el que España mantenga acuerdos sobre la protección de derechos de obtentor y siempre y cuando técnicamente sea posible con las debidas garantías. En aquellos casos en que el examen técnico entrañe dificultades la autoridad competente podrá acordar que se tenga en cuenta los resultados de los ensayos de cultivo o de otros ensayos ya efectuados por el obtentor.

Las directrices del examen técnico son las establecidas por la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCV). Cuando la Oficina no las haya establecido, son las directrices de examen de UPOV que se encuentren en vigor en el momento de la realización del ensayo. Cuando las directrices de examen no se hayan establecido por la OCV ni por la UPOV, se utilizan las directrices nacionales.

Los requisitos del material vegetal para el examen técnico de los ensayos DHE son los equivalentes al material certificado en lo que se refiere a germinación, pureza específica, humedad y sanidad; el material no debe tener tratamiento alguno; se debe entregar sólo el primer año; es obligatoria la entrega de los componentes hereditarios en caso de variedades híbridas; se debe cumplir la legislación en vigor sobre medidas de protección contra la introducción y difusión en España y la Unión Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

La autoridad competente tiene establecidos unos centros de ensayo de variedades especializados según las especies como se especifica en el Cuadro 6.1.

6.3.1. Examen técnico de variedades de hortalizas

Sólo es necesario realizar el examen técnico en las tres primeras categorías de variedades: comerciales, protegidas y de conservación. En el caso de variedades para cultivo en condiciones determinadas, basta con una descripción presentada por el solicitante, basada en información de fuentes fiables. El examen técnico de especies hortalizas en España se realiza, por encargo de la OEVV en dos centros de examen, situados en Valencia y Madrid dependientes de INIA. Las especies exami-

Cuadro 6.1.—Centros que llevan a cabo los ensayos de identificación de variedades para la Oficina Española de Variedades Vegetales

CENTRO	ESPECIES
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) – SEVILLA	<i>Brachypodium distachyon</i> (L.) (Brachipodium) <i>Brassica napus</i> L. (Colza) <i>Cicer arietinum</i> L. (Garbanzo) <i>Distichlis spicata</i> var. <i>yensen</i> (Distichlis) <i>Glycine max</i> (L.) (Soja) <i>Gossypium hirsutum</i> L. (Algodon) <i>Helianthus annuus</i> L. (Girasol) <i>Oryza sativa</i> L. (arroz) <i>Sorghum bicolor</i> (L.) (Sorgo) <i>Zea mays</i> L. (Maíz) <i>Zoysia matrella</i> (Zoysia) <i>Sinapis alba</i> L. (mostaza) <i>Lupinus angustifolius</i> L. <i>Carthamus tinctorius</i> L. (cártamo)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) – MADRID	<i>Allium sativum</i> L. (ajo) <i>Asparagus officinalis</i> L. (espárrago) <i>Avena sativa</i> L. (avena) <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> Zenker (col de bruselas) <i>Cucurbita moschata</i> Duchesne (calabaza moscada) <i>Hordeum vulgare</i> L. (cebada) <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (judía) <i>Pisum sativum</i> L. (guisante) <i>Triticum eastivum</i> L. (trigo blando) <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) <i>Vicia ervilia</i> (L.) (yeros) <i>Vicia fava</i> L. (haba) <i>Cucurbita pepo</i> L. (calabacín) <i>Solanum melongena</i> L. (berenjena)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) – VALENCIA	<i>Allium cepa</i> (grupo Cepa) <i>Allium porrum</i> L. (puerro) <i>Borago officinalis</i> L. (borraja) <i>Brassica oleracea</i> L. convar. <i>botrytis</i> (l.) Alef. var. <i>botrytis</i> (coliflor) <i>Brassica oleracea</i> L. convar. <i>botrytis</i> (l.) Alef. var. <i>cymosa</i> Duch (broccoli) <i>Capsicum annuum</i> L. (pimiento) <i>Cichorium endivia</i> L. (escarola) <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) (sandía) <i>Cucumis melo</i> L. (melón) <i>Cucumis sativus</i> L. (pepino) <i>Daucus carota</i> L. (zanahoria) <i>Lactuca sativa</i> L. (lechuga) <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (tomate) <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) × <i>Lycopersicon hirsutum</i> L. (tomate) <i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>sativus</i> (rabanito) <i>Spinacia oleracea</i> L. (espinaca)

CENTRO	ESPECIES
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) – MURCIA	<i>Vitis</i> L. (vid)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Estación Experimental "Aula Dei"	<i>Prunus amygdalus</i> Batsch × <i>Prunus persica</i> Batsch <i>Prunus cerasifera</i> Ehrh. <i>Prunus insititia</i> L. <i>Prunus domestica</i> L. <i>Malus domestica</i> (Borkh.) Borkh. Patrones del género <i>Prunus</i> L.
Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)	<i>Juglans regia</i> L. (nogal) <i>Juglans nigra</i> L. e híbridos (nogal) <i>Corylus avellana</i> L. (avellano)
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA)	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A. Webb = <i>Prunus amygdalus</i> Batsch (almendro) <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch (melocotonero, variedades medias y tardías).
Centro de Semillas y Plantas de Vivero. Diputación de Aragón	<i>Prunus avium</i> L. <i>Pyrus communis</i> L. <i>Cydonia oblonga</i> Mill
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Unidad de Examen Técnico de Identificación Varietal (UETIV)	<i>Citrus</i> L. (cítricos en general) <i>Prunus persica</i> L. (melocotonero, variedades tempranas y muy tempranas) <i>Prunus armeniaca</i> L. (albaricoquero) <i>Prunus salicina</i> Lindl. y otros ciruelos diploides <i>Poncirus</i> L. e híbridos (patrones de cítricos)
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Dpto. de Agronomía. Univ. de Córdoba	<i>Olea europea</i> L. (olivo)
Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Centro de Investigación y Fomento Agroalimentario	<i>Fragaria</i> L. (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) (fresa)
Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Tecnológico Neiker Tecnalia	<i>Solanum tuberosum</i> L. (patata)
Centro de Investigación de la Finca La Orden y Valdesequera	<i>Ficus carica</i> L. (higuera)

nadas en cada Centro y el número de variedades examinadas en los años 2004-2013 se reflejan en el Cuadro 6.2.

Los distintos protocolos (de la OCV, de la UPOV o el nacional) establecen los caracteres a observar, la forma y el momento de observarlos, los niveles de homo-

Cuadro 6.2.—Número de variedades de especies hortícolas examinadas en los Centro de examen de Valencia y Madrid.

VALENCIA	Nº solicitudes 2004–2013	Nº variedades en C. común	MADRID	Nº solicitudes 2004–2013	Nº variedades en C. común
Acelga	0	51	Ajo	15	113
Alcachofa	11	44	Berenjena	26	318
Apio	5	115	Berza	0	45
Borraja	0		Calabacín	40	649
Brocoli	5	198	Calabaza	1	32
Cardo	0	12	Col Repollo	4	1040
Cebolla	55	1019	Esparrago	11	80
Col China	0	82	Guisante	25	750
Coliflor	0	737	Haba	9	120
Escarola	0	260	Judía	92	1320
Espinaca	0	365			
Lechuga	114	2263			
Melon	151	994			
Nabo	4	156			
Pepino	65	1360			
Pimiento	235	2357			
Rabanito	2	410			
Sandia	49	481			
Tomate	411	3850			
Portainjertos Tomate	8	31			
Zanahoria	0	592			

geneidad exigibles, los caracteres de agrupación, que por ser más consistentes se utilizan para seleccionar las variedades de la colección que hay que incluir en los ensayos, y que por tanto el obtentor debe declarar en la solicitud rellenando un cuestionario técnico.

El examen técnico de variedades de especies hortícolas tiene algunas peculiaridades con respecto al de otros grupos de especies:

1. En el examen técnico de híbridos, no es necesario identificar ni por tanto presentar semilla de sus líneas parentales.
2. No se evalúa el valor agronómico.
3. En las especies hortícolas son de particular importancia los caracteres de resistencia a enfermedades, que son objetivo prioritario de la mejora en algunas de las más importantes, y cuya comprobación es una parte fundamental del examen técnico. Para comprobar la resistencia de la variedad a una determinada raza de una enfermedad, se realiza un ensayo biológico con inoculación y observación de síntomas, de acuerdo a un protocolo incluido en el protocolo técnico de la especie. También se testan en el mismo ensayo al menos una variedad testigo de susceptibilidad y una o más variedades como testigo de resistencia.

En enfermedades en las que están descritos marcadores moleculares predictores de resistencia, se pueden utilizar como herramienta de apoyo, pero no se consideran válidos a los efectos de descripción oficial de una variedad. Hay una excepción que es la resistencia al virus del bronceado en tomate, para el que se admite como oficial la prueba biomolecular, siempre que se compruebe sobre 20 plantas. Esta excepción se ha admitido tras haber comprobado varios países la correlación 100% entre los resultados de la prueba biomolecular y la biológica. Es de esperar que se pueda ir ampliando este criterio a algunas otras enfermedades, pero siempre que la resistencia dependa de un solo gen. En casos en que intervengan más genes, las pruebas biomoleculares se van haciendo más complicadas y pierden interés.

Las enfermedades más importantes que se testan en los exámenes técnicos realizados en España son:

Para el tomate: **Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, razas 0,1,2, **Verticillium dahliae*, **Meloidogyne incognita*, *Mosaico del tomate (ToMV) patotipo 0, Mosaico del tomate (ToMV) patotipos 1y2, *Fusarium oxysporum radices lycopersici*, Virus del bronceado del tomate (TSWV), Virus de la cuchara (TYLCV) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Otras enfermedades consideradas en el protocolo son: *Fulvia fulva* raza 0, grupos A,B,C,D,E, *Leveillula taurica*, *Oidium lycopersicum*, *Phytophthora infestans*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Ralstonia solanacearum*, *Stemphyllium* y Virus del torrado del tomate (ToTV).

Para el pepino: Mosaico del pepino (CMV), Oidio (*Podosphaera xanthii*) y *Corynespora cassiicol*. Otras enfermedades consideradas en el protocolo: Virus de las venas amarillas (CVYV), *Cladosporium cucumerinum*, *Pseudoperonospora cubensis* y *Erysiphe cichoriacearum*.

Para la lechuga: *Mildiu (*Bremia lactucae*) razas (16,18,20,21,22,23,24,25,26,27 y28), Mildiu (*Bremia lactucae*) razas (2,5,12,17). Otras enfermedades consideradas en el protocolo: Mosaico de la lechuga (LMV) y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* raza 1.

Para el melón: **Fusarium oxysporum f.sp. melonis* razas 0, 1 y 2 y Virus del cribado (MNSV). Otras enfermedades consideradas en el protocolo: Oidio (*Podosphaera xanthii*) razas 1,2 y 5, Pulgón (*Aphis gossypii*), *Erysiphe cichoriacearum*, Mosaico del pepino (CMV), Virus de la papaya (PRSV) y Virus del mosaico del calabacín (ZYMV).

Para la judía: *Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) raza 6, Grasa (*Pseudomonas syringae phaseolicola*) raza 6 y Mosaico de la judía (BCMNV). Otras enfermedades consideradas en el protocolo: *Xanthomonas campestris*.

Para el guisante: *Fusarium oxysporum pisi* razas 1, 5, 6. Otras enfermedades consideradas en el protocolo: *Ascochyta pisi* raza C y *Erysiphe pisi*.

Para el pimiento: *Tobamovirus patotipos 0, 1-2, 1-2-3, *PVY patotipo 0 y Virus del bronceado del tomate (TSWV). Otras enfermedades consideradas en el protocolo: *Phytophthora capsici*, Mosaico del pepino (CMV) y *Xanthomonas campestris*.

Para la sandía: otras enfermedades consideradas en el protocolo: *Fusarium oxysporum niveum* y *Colletotrichum lagenarium*.

Los obtentores están obligados a declarar en la solicitud de registro, el comportamiento de la variedad con respecto a las enfermedades marcadas con asterisco. Las demás son de declaración voluntaria. Las resistencias enfermedades marcadas con asterisco y algunas otras importantes, como virus del bronceado en tomate y pimiento, virus del cribado del melón, se utilizan, junto con algunos caracteres morfológicos para hacer grupos de variedades que ayudan al manejo de la colección de referencia de las especies grandes, subdividiéndola en conjuntos de variedades más reducidos, a los efectos de seleccionar las variedades con las que hay que comparar la variedad candidata para comprobar la distinción. Por tanto es muy importante declarar bien estas enfermedades obligatorias para no dilatar y encarecer el examen técnico.

Para ayudar a obtentores que no dispongan de medios para comprobar las resistencias de sus líneas y variedades, INIA ofrece servicios de testado biológico para todas las enfermedades de declaración obligatoria y algunas otras, así como algunas pruebas de marcadores moleculares predictores de genes de resistencia. Los precios de dichos servicios se publican junto con los demás precios públicos de INIA, en el BOE.

El examen técnico de las variedades hortícolas requiere normalmente 2 años de ensayo para comprobar la distinción y redactar una descripción de la variedad con un grado aceptable de precisión. En algunas especies en las que la evaluación de la distinción es más difícil por la gran cantidad de variedades dentro del mismo grupo, es necesario un tercer año de ensayo para algunas variedades. Actualmente, al solicitar el registro de una variedad como variedad comercial, se solicita simultáneamente una autorización provisional de comercialización que se concede automáticamente, con sólo haber presentado correctamente la solicitud de registro

con el cuestionario técnico debidamente relleno y haber entregado la muestra de semillas, con la cantidad requerida, a la cámara de conservación de semillas de INIA. La autorización provisional permite comercializar la variedad en toda la UE sin límite de cantidad. Tiene una duración de 3 años. En consecuencia en casi todos los casos, el examen técnico finaliza sin haber interrumpido la comercialización de la variedad.

El informe final del examen contiene un documento sobre los resultados de la distinción, homogeneidad y estabilidad de la variedad, y una descripción oficial de la variedad donde además de la descripción de todos los caracteres que figuran en el protocolo técnico, se informa de cuál es la variedad más parecida y se detallan las diferencias entre ambas.

El índice histórico medio de variedades hortícolas evaluadas en el centro del INIA en Valencia con resultado negativo del examen técnico, es del 13%, de las que un 10% fue debido a insuficiente homogeneidad y un 3% a su no distinción con respecto a otra variedad.

6.3.2. Examen técnico de variedades de frutales

El Examen Técnico de los nuevos clones frutales, tanto de variedades como de patrones, presenta un conjunto de peculiaridades, sobre todo por tratarse de cultivos leñosos plurianuales, con un período improductivo más o menos largo dependiendo de la especie. Ello condiciona entre otras cosas la duración del examen, ya que se deben realizar las observaciones para la descripción varietal durante un mínimo de dos ciclos productivos. En consecuencia, en la mayoría de especies del género *Prunus*, la conclusión del examen DHE requiere de cuatro a cinco años desde la plantación en la parcela de examen. En el olivo, sin embargo, este período de examen puede alargarse mucho, dependiendo de la variedad, de los 8 a incluso más de 12 años. Otra peculiaridad es que la propagación de las nuevas obtenciones es vegetativa, de manera que el obtentor debe enviar su variedad candidata, dependiendo también de la especie, o bien en varetas, esquejes autoenraizados, o la variedad ya injertada en un patrón específico, indicado en la directriz de examen (Cuadros 6.3 y 6.4).

Otro requisito fundamental que debe cumplir el material vegetal que el obtentor entrega al centro de examen es su perfecto estado fitosanitario, requisito que debe ser una premisa en todo tipo de material vegetal élite de los programas de mejora. Las plantas deberán estar visiblemente sanas y libres de enfermedades transmisibles por injerto y por otros vectores de transmisión. Es de exigencia común que el material vegetal vaya acompañado de un certificado de análisis serológico de laboratorio autorizado u oficial, con resultado negativo para las virosis fijadas en cada directriz de examen. En algunas especies, como la vid, se exige que la planta esté certificada. Además, el material vegetal entregado al centro de examen no habrá sido objeto de tratamiento químico no autorizado.

Cuadro 6.3.—Directrices de examen para las principales especies leñosas alimentarias

Nombre común	Taxón botánico	UPOV	CPVO	Carac- teres	Entrada en vigor
Manzano	<i>Malus domestica</i> Borkh.	TG/14/9	CPVO-TP 014/2	57	Marzo 2006
Peral	<i>Pyrus communis</i> L.	TG/15/3	CPVO-TP 015/1	65	Marzo 2003
Cerezo	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	TG/35/7	CPVO-TP 035/2	41	Noviembre 2006
Guindo	<i>Prunus cerasus</i> L.	TG/230/1	CPVO-TP 230/1	47	Noviembre 2006
Ciruelo Europeo	<i>Prunus domestica</i> L.	TG/41/1	CPVO-TP 041/1	62	Noviembre 2003
Ciruelo japonés	<i>Prunus salicina</i> Lindl.	TG/84/4	CPVO-TP 084/2	61	Enero 2012
Melocotonero	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	TG/53/7	CPVO-TP 053/2	68	Enero 2012
Almendro	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D. A. Webb	TG/56/4	CPVO-TP 056/1	44	Enero 2011
Albaricoquero	<i>Prunus armeniaca</i> L.	TG/70/4	CPVO-TP 070/2	57	Marzo 2008
Patrones <i>Prunus</i>	<i>Prunus</i> L.	TG/187/1	CPVO-TP 187/1	39	Marzo 2008
Olivo	<i>Olea europaea</i> L.	TG/99/4	CPVO-TP 099/1	41	Enero 2011
Mandarino	<i>Citrus</i> L. Group 1	TG/201/1	CPVO-TP 201/2	110	Noviembre 2009
Naranja	<i>Citrus</i> L. Group 2	TG/202/1	CPVO-TP 202/1	95	Noviembre 2004
Limonero y limas	<i>Citrus</i> L. Group 3	TG/203/1	CPVO-TP 203/1	79	Noviembre 2004
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i> , <i>Citrus grandis</i> (L.)	TG/204/1	CPVO-TP/204/1	94	Marzo 2014
Vid	<i>Vitis</i> L.	TG/50/9	CPVO-TP 050/2	44	Enero 2008
Higera	<i>Ficus carica</i> L.	TG/265/1		78	Marzo 2010
Nogal	<i>Juglans</i> L -				
Avellano	<i>Corytus avellana</i> L.				
Caquí	<i>Diospyros kaki</i>				
Granado	<i>Púnica granatum</i> L.				
Nispero					

Cuadro 6.4.—Especificaciones de entrega de material vegetal al centro de examen.

Especies	Fecha límite de presentación de solicitudes	Material necesario para los ensayos	Fecha límite de entrega del material
Manzano	1 de diciembre	– Variedades obtenidas por cruzamiento, 10 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal <i>B</i> . – Variedades obtenidas por mutación, 15 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal M 26.	10 de enero al 28 de febrero
Peral	1 de diciembre	– Variedades obtenidas por cruzamiento, 9 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal membrillero BA 29 y en caso de incompatibilidad sobre peral MANTECOSA HARDY. – Variedades obtenidas por mutación, 15 plantas en las mismas condiciones que la anterior.	Del 10 de enero al 10 de febrero
Membrillero	1 de diciembre	– Variedades obtenidas por cruzamiento, 9 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal membrillero BA 29 y en caso de incompatibilidad sobre peral MANTECOSA HARDY. – Variedades obtenidas por mutación. 15 plantas en las mismas condiciones que la anterior.	10 de enero a 10 de febrero
Albaricoquero	1 de noviembre	9 árboles injertados de un año sobre patrón clonal ADESOTO 101	Del 1 de diciembre a 31 de enero
Almendo	1 de noviembre	9 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal GF677	10 de enero al 10 de febrero
Cerezo	1 de diciembre	9 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal SANTA LUCÍA 64 (SL 64)	Del 10 de enero al 15 de febrero
Ciruelo europeo	1 de diciembre	10 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal SAN JULIÁN A	Del 10 de enero al 28 de febrero
Ciruelo japonés	1 de noviembre	9 plantas injertadas de un año sobre patrón MARIANA 26-64	Del 1 de diciembre al 1 de enero
Melocotonero, nectarina (variedades medias y tardías)	1 de noviembre	10 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal GF677	10 de enero al 10 de febrero
Melocotonero, nectarina (variedades tempranas)	1 de noviembre	11 plantas injertadas de un año sobre patrón clonal GF677	1 de diciembre a 31 de enero

Especies	Fecha límite de presentación de solicitudes	Material necesario para los ensayos	Fecha límite de entrega del material
Patrones del género <i>Prunus</i>	1 de diciembre	15 plántones autoenraizados	Del 10 de enero a 10 de febrero
Olivo	1 de enero	8 plantas autoenraizadas de un año	Del 1 de febrero a 10 de marzo
Cítricos (todas las especies)	15 de abril	Cuatro varetas de 6 a 10 mm de diámetro de un año de edad con al menos 20 yemas útiles	15 de mayo al 30 de junio
Vid	1 de diciembre	– Patrones: 15 barbados – Variedades viníferas o de mesa: 15 plantas injertadas sobre patrón 110 RICHTER	Del 10 de enero a 10 de febrero
Nogal	15 de enero	5 varetas de 40 cm de madera del año, bien lignificadas, tomadas de los dos primeros tercios de la rama del año, o 8 plantas injertadas de un año sobre patrón híbrido MJ 209 x RA	Del 15 de febrero al 16 de marzo
Avellano	1 de diciembre	8 plantas autoenraizadas de un año	Del 1 al 31 de enero
Higuera	1 de marzo	7 plantas de un año enraizadas en macetas	Del 1 de abril al 15 de mayo
Caqui	9 de noviembre	9 plantas de un año injertadas sobre el patrón adecuado, que será para: – Variedades de caqui NO astringentes (PCNA) <i>Diospyros kaki</i> – Variedades de caqui astringentes (PCA, PVA, PVNA) <i>Diospyros iotas</i> .	Del 1 de diciembre al 31 de enero
Granado	15 de diciembre	9 plantas de un año obtenidas de esquejes enraizados o injertadas en la misma especie (<i>Púnica granatum</i>)	Del 15 de enero al 28 de febrero

Cada una de las plantas entregadas deberá estar perfectamente identificada mediante una etiqueta identificadora que incluya los siguientes datos: Especie, Variedad, Patrón, nombre del solicitante y el número de referencia de la solicitud en la OCW o en la OEVV.

Si el material vegetal incumple las condiciones de entrega descritas en la Directriz Técnica (TG) de su especie, éste se rechaza procediendo a la comunicación de la incidencia a la OEVV, quien comunica al solicitante un plazo para la devolución del material vegetal, pasado el cual, el centro de examen procede a su destrucción.

Una vez aceptado el material vegetal para la realización del Examen DHE, se procede al diseño del ensayo agronómico del examen, el cual tiene también sus peculiaridades como consecuencia de la característica leñosa de las especies. En la mayoría de especies resulta imposible plantar las variedades más similares junto a la variedad candidata. Las variedades similares de una variedad candidata se determinan al comparar la información facilitada por el solicitante en el cuestionario técnico de la variedad candidata con la información que el centro de examen dispone de su colección de referencia. La plantación de variedades candidatas y sus similares supondría disponer de plantones de las variedades similares de la misma edad que las variedades candidatas. Ello es imposible ya que el período desde que se realiza la solicitud hasta la llegada del material vegetal de la variedad candidata es normalmente de 2 a 3 meses, con lo que no se dispone de tiempo material para la preparación de una planta similar. Para ello se tendría que retrasar el envío de material vegetal de la variedad candidata al menos un año desde el envío de la solicitud para poder producir planta de las variedades candidatas de un año de edad. Todo ello supondría un retraso considerable en el período de examen y un encarecimiento excesivo de su coste. Además, en alguna especie como el melocotonero, sería impracticable, por el elevado número de variedades candidatas que solicitan su protección cada año. Por ello, la solución más adoptada a este inconveniente es realizar la toma de datos de las variedades similares presentes en la colección de referencia durante los mismos dos años productivos que se toman datos de la variedad candidata durante el examen DHE y anotar las diferencias más claras y evidentes.

El número de árboles que se plantan por variedad candidata en la Parcela de Examen suele ser de 5 en la mayoría de las especies. Parte de la planta suministrada se utiliza para la incorporación de la obtención a la colección de referencia y otra parte se conserva para la reposición de posibles fallos. Las parcelas de examen deben estar en las mejores condiciones posibles para su producción. El marco de plantación, el régimen de riego, de fertilización y demás prácticas agronómicas de producción se deben ajustar lo más posible a las prácticas de las plantaciones comerciales, de manera que es conveniente tecnificar la plantación de examen en el mismo grado que el usual en cualquier empresa agrícola.

Durante los dos ciclos productivos en los que se realiza el examen, se van tomando los datos descriptivos de las variedades candidatas y variedades similares que aparecen en las directrices técnicas. Los datos correspondientes al vigor, arquitectura y densidad floral, en el caso de las especies caducifolias, se realizan en invierno, antes de la poda, y cuando se han caído completamente las hojas, momento en el cual se aprecia mejor el porte de ramificación de los árboles, el crecimiento vegetativo producido durante el ciclo, y cuando es posible distinguir las yemas vegetativas respecto de las florales. Es el momento en el que se pueden recoger muestras de ramos mixtos y determinar las mediciones cualitativas y cuantitativas en laboratorio, como por ejemplo, coloraciones de las ramas, cantidad de

ramos anticipados, distancias de entre nudos, grosores de los ramos, densidad de yemas florales... En especies perennes, el porte y el vigor también se determinan en invierno y la densidad de floración se realiza poco antes de producirse la floración. En la floración se determina la fecha de plena floración, la evolución de la misma, el color predominante de las corolas, y los parámetros morfológicos de la flor, como cantidad y tamaños de pétalos, longitudes de pistilos, cantidad de estambres, etc., y en el caso de especies caducas se determina el espaciado entre la plena floración y la brotación de las yemas vegetativas. La fecha de plena floración suele ser un carácter de agrupamiento dentro de las distintas especies y sirve para descartar la similitud entre muchas variedades.

Una vez se encuentran las hojas completamente desarrolladas se caracterizan morfológicamente las hojas. Muchas variedades difieren en la relación longitud/ancho de las mismas, así como la longitud y coloración de los pedúnculos de las hojas.

Al igual que ocurre con la fecha de floración, la fecha de maduración de fruto es una característica de agrupamiento dentro de la variedad y sirve para descartar la similitud de las variedades candidatas con las variedades de distinto grupo de maduración. Una vez la variedad alcanza la madurez de consumo, en laboratorio se determinan los caracteres morfológicos del fruto y se determinan los aspectos físico-químicos de la calidad del fruto que se indican en las directrices técnicas de cada especie, como la firmeza de la pulpa, el contenido en sólidos solubles (principalmente azúcares), la acidez del zumo, etc. Una excepción es el caso del almendro, en el que el fruto se caracteriza dos veces, una en verde, al alcanzar su tamaño definitivo y, la otra con el fruto maduro, con la apertura de su mesocarpo. La caracterización del fruto suele aportar una gran información para la distinción de las variedades.

A parte de la descripción obligada por la directriz de examen pertinente, los centros de examen documentan con otra información la descripción de las variedades, con toma de fotografías en laboratorio de las distintas partes morfológicas del árbol (flores, hojas, ramos, fotografías del fruto desde sus distintos de vista, aspecto general de los frutos de la variedad, aspecto general del árbol con frutos, árbol sin hojas...) así como realizar una caracterización molecular básica, normalmente con microsatélites o "Simple Sequence Repeats" (SSRs).

Al concluir el segundo año de toma de datos, se realiza el análisis estadístico de los datos recolectados de los diferentes caracteres cuantitativos (QN) y se determina su nota. También se evalúa la consistencia de las notas obtenidas para cada característica y la descripción técnica obtenida de la variedad candidata se compara con las variedades que previamente se habían seleccionado como más similares a la candidata. En ese momento se determina si hay que realizar el examen un tercer ciclo para despejar alguna duda sobre la nota de alguna característica o para confirmar la distinción con alguna variedad muy similar.

Aclaradas las posibles dudas, el centro de examen redacta el Informe Final sobre el Examen DHE de la variedad candidata, que puede ser favorable o desfavorable. Un informe final es desfavorable cuando la variedad candidata no cumple con alguna de las condiciones de obtención vegetal, la "distinción", la "homogeneidad" y la "estabilidad". Un informe final favorable incluye tres documentos.

El primer documento es el informe DHE, en el que se indica que la variedad candidata tras la realización del ensayo DHE se ha comprobado que es distinta, homogénea y estable. La distinción de la variedad se obtiene al comprobar las diferencias existentes con las variedades notoriamente conocidas que componen la colección de referencia disponible. La homogeneidad se observa con la uniformidad de las características descritas entre los árboles plantados en el ensayo DHE. En cultivos leñosos es muy difícil obtener plantas fuera de tipo, ya que su propagación es vegetativa. Si alguna vez ocurre, es por la inclusión errónea por parte del solicitante, de algún plantón perteneciente a otra variedad o selección. Una variedad candidata no superaría la condición de homogeneidad si apareciese una sola planta fuera de tipo en el caso de la plantación de cinco árboles en la parcela de examen o dos en el caso de más de cinco árboles plantados. Finalmente la estabilidad, al ser cultivos plurianuales, se determina al comprobar que las características descritas no varían de un ciclo productivo a otro, exceptuando variación de la expresión causadas por las condiciones medioambientales.

El segundo documento es la descripción técnica oficial de la variedad candidata obtenida tras el examen DHE, en la que se recoge la nota obtenida en cada característica indicada en la directriz técnica de la especie.

El último documento del informe final del examen técnico es la comparación con variedades similares, en la que se indica las características en que se diferencia la variedad candidata de las variedades similares seleccionadas al recibir la solicitud. Un aspecto importante es que el valor de las notas de las características de la variedad candidata debe diferenciarse al menos en dos grados de la variedad similar.

Una vez que el Informe Final DHE favorable llega a la Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV), se comprueba la condición jurídica de "novedad" y que la variedad candidata está al corriente de pago de las tasas del examen. Son nuevas las variedades que no han sido puestas en el comercio o, habiéndolo sido, no haya transcurrido en el caso de especies frutales 1 año en España y 6 años fuera de España.

Una vez se cumplen todos los requisitos, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente concede el Título de Obtención Vegetal, procede a su publicación en el Boletín Oficial del Estado y la variedad queda inscrita en el Registro Nacional de Variedades Protegidas.

6.3.3. Examen técnico de variedades de cultivos extensivos

Una cuestión fundamental en los ensayos de identificación es una buena elección de la parcela en la que se van a ubicar estos ensayos, ya que si la parcela no

es la adecuada, aunque se haga cuidadosamente la toma y el proceso de datos, sería imposible obtener unos resultados fiables. Lo más importante es que la parcela sea homogénea, además de tener las características idóneas para el cultivo. El altramuz se desarrolla bien sólo en terrenos ácidos por lo cual para el examen técnico de esta especie el terreno de la parcela debe ser ácido. Si se siembra un ensayo de girasol en un terreno contaminado de jopo y hay variedades sensibles a jopo, será imposible comprobar las diferencias morfológicas que existan entre las variedades.

Otro de los aspectos más importantes a la hora de elegir las parcelas es que ésta cuente con posibilidad de riego en cualquier momento, tanto por aspersión como a pie. Si después de sembrar, el terreno no tiene un tempero adecuado y no es posible regar, la nascencia no será uniforme y esto condicionará toda la toma de datos posterior ya que habrá plantas más precoces, más tardías, más altas, más bajas etc., por lo que habrá una gran heterogeneidad en el ensayo aunque el terreno sea uniforme.

El marco adecuado es un tema muy debatido, habiendo diversos puntos de vista. Hay quien piensa que el marco debe ser el mismo que en una siembra normal; otros por el contrario piensan que las plantas deben estar totalmente aisladas; lo más lógico es mantener un equilibrio, aunque esto depende de la especie de que se trate. En el caso del algodón a un marco muy amplio se distorsionan los datos, lo mismo ocurre en el girasol. El problema es menor en el maíz y cereales de invierno. El número de plantas a estudiar depende de la especie de que se trate aunque, un número razonable de plantas estaría entre las 50 y 100.

Los caracteres que se utilizan para la identificación varietal en cada especie son los que se consideran importantes para distinguir una variedad de otra. Estos caracteres pueden ser morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o de otra naturaleza. Pueden también incluirse caracteres basados en la reacción a organismos vivos, (por ejemplo, los caracteres de resistencia a enfermedades), a los productos químicos (por ejemplo los caracteres de resistencia a los herbicidas), etc. Todos estos caracteres deberán reconocerse y describirse con precisión. La mayor parte de los países utilizan los caracteres que figuran en las Directrices de Examen de la UPOV para cada especie y se añaden otros caracteres que consideran de utilidad.

Los caracteres pueden tomarse por:

Observación visual (V), una observación basada en la observación visual del experto, aunque también se incluyen en este grupo las observaciones sensoriales, como pueden ser el olor, el sabor y el tacto.

Medición (M), una observación objetiva que se realiza frente a una escala lineal calibrada, por ejemplo, utilizando una regla, una báscula, un colorímetro, fechas, recuentos, etc.

Los caracteres observados por separado pueden combinarse posteriormente, por ejemplo la relación longitud \times anchura o la longitud/anchura. Los caracteres que se utilizan no son única y exclusivamente aquellos que se observan en las parcelas de campo, o en muestras tomadas de éstas, para su posterior observación en gabinete. Se utilizan además determinadas técnicas en laboratorio (fitotrones, invernaderos, macetas, etc.) para la observación de ciertos caracteres y sus diferentes niveles de expresión. Estas técnicas, al realizarse en condiciones controladas, permiten efectuar determinaciones cuantas veces se considere necesario, pudiéndose comparar los resultados de diferentes determinaciones. Por ello siempre se estudian junto a las variedades cuyos caracteres hay que observar, variedades de referencia, lo cual sirve también para poder detectar resultados anómalos debido a causas fortuitas y una vez solucionados los problemas repetir los análisis en las condiciones fijadas.

Como ejemplos de caracteres que se observan utilizando estas técnicas se relacionan entre otros los siguientes:

- Determinación de la intensidad de la pigmentación del coleóptilo en fitotrón o invernadero, en condiciones controladas de luz y temperatura en soja, sorgo, maíz, girasol, etc.
- Determinación de la intensidad de la coloración que adquieren los granos de sorgo al tratarlos con fenol.
- Test de mildiu en girasol.
- Contenido en ácido oleico en girasol.
- Índice de flotabilidad en maíz.
- Riqueza grasa en girasol, colza, etc.
- Análisis de fibra en algodón.
- Comprobación de las modificaciones genéticas.
- Electroforesis para comprobación de la identidad o pureza de una muestra.

El gran número de variedades a comparar entre sí hace muy difícil esta labor. Para facilitar el trabajo, las variedades se agrupan según algunas de sus características; de esta forma cada variedad se siembra al lado de las de su grupo, que en definitiva, son a las que se parece. Igualmente se comparan sus características con las características de las variedades de su grupo.

Tanto los caracteres cualitativos como los cuantitativos pueden estar sujetos, en mayor o menor medida, a la influencia del medio ambiente que posiblemente modifica la expresión de diferencias genéricamente controladas. Para agrupar las variedades, son preferible los caracteres menos influidos por el medio ambiente. Si en determinados casos la expresión de un carácter ha sufrido influencias mayores de lo normal debido a factores ambientales, no deberá utilizarse este carácter. Los caracteres que no son influidos por el medio ambiente en ninguna o casi ninguna medida y además pueden ser claramente definidos, son los que se utilizan para agrupar variedades antes de la siembra.

Como ejemplo en maíz se utilizan el ciclo de floración, el color de las sedas, la altura de la planta, el tipo de grano y el color del zuro.

Mediante estos caracteres las nuevas variedades se integran en los diferentes grupos existentes, donde están también otras variedades solicitadas con anterioridad y las variedades de la colección de referencia. Las siembras se van a realizar siempre respetando estos grupos, por lo que van a sembrarse juntas las variedades que más se parecen entre sí, sean o no de la colección de referencia, se van a estudiar juntas y se van a comparar entre ellas.

Las variedades incluidas en la colección de referencia no deberían limitarse a las existentes a nivel nacional, una solicitud de protección o de inscripción en un registro oficial en cualquier parte del mundo confiere a la variedad la calidad de notoriamente conocida. Es poco probable que las variedades de muchas especies seleccionadas en entorno considerablemente diferente de aquel en el que se ha desarrollado la variedad candidata sean similares a la variedad objeto de examen, lo que puede servir para restringir el tamaño de la colección de referencia con arreglo a la cual deberán examinarse las variedades candidatas.

Para la organización de las siembras hay que conocer qué material va a haber en el ensayo de identificación y qué características tiene; para ello es fundamental que la información de los obtentores sea correcta y clara. Se incluirán al menos las variedades de la colección de referencia con características similares a las que estén en estudio.

En el primer año de ensayo se establecen los grupos de siembra dentro de cada tipo de material. En girasol hay los siguientes tipos: restauradores, hembras, HS fundacionales, HS, H3L y población. En maíz: líneas puras, HS fundacionales, HS, H3L, y HD, población. Dentro de cada tipo se van agrupando las variedades según la descripción presentada por el obtentor. Así por ejemplo en maíz se ordenarían las variedades por ciclos 200, 300, 400, 500, 600,700 y 800.

Dentro de cada ciclo se sembrarían de un lado las variedades de zuro blanco y de otro las de zuro rojo; dentro de cada grupo se ordenarán por precocidad, después las de grano liso y las de grano dentado; las que tengan las sedas coloreadas y las sin coloración; etc. De esta manera si la descripción del obtentor no es correcta la variedad estará en un grupo que no le corresponde, con el consiguiente problema a la hora de relacionar esta variedad con el grupo correspondiente. Una vez establecidos los grupos de siembra se eligen las variedades testigo para cada uno de ellos.

En el segundo año de estudio se planifica la siembra según las observaciones realizadas el año anterior, pudiendo efectuarse la siembra de una variedad junto a otra perteneciente a la colección de referencia o en estudio, si se tienen dudas de su novedad con respecto a ésta. Para los híbridos podría efectuarse un control de identidad durante el segundo año, entre las semillas depositadas el primer año por

el obtentor y las semillas resultantes del cruzamiento realizado el primer año, conforme a la fórmula anunciada.

Tanto el primer como el segundo año se sembrarán juntas las muestras de identificación y de V.A. para comprobar que son iguales. En los parentales se sembrarán el material enviado al inicio del ciclo de estudio junto al obtenido por autofecundación durante el primer año, al objeto de comprobar la estabilidad del parental. Se compararán también las líneas mantenedoras de esterilidad con las líneas androestériles.

Una variedad se considera distinta si en el momento en que se pide su inclusión en el Registro se diferencia claramente por uno o varios caracteres morfológicos o fisiológicos importantes de todas las demás variedades incluidas o en proceso de inclusión en el Registro correspondiente. Dos variedades se consideran distintas para un determinado carácter cualitativo, cuando existe una separación entre los niveles de expresión de dichas variedades, al menos igual a la anchura de clase definida para dicho carácter. Dos variedades se consideran distintas para un determinado carácter cuantitativo, cuando la diferencia entre las medias de dichas variedades para ese carácter, sea superior a la mínima diferencia significativa al 5%, con el mismo sentido en los dos años de estudio.

En el caso de un híbrido comercial, su novedad estriba en la novedad de los parentales que lo forman, o en la originalidad de la fórmula que los asocia. A falta de poder establecer la novedad de un híbrido sobre la base de esta regla general, se realizará un estudio complementario de la distinción en los híbridos comerciales a fin de verificar las diferencias entre variedades parecidas.

Diferencias menores a la anchura de clase en varios caracteres importantes, podrían ser consideradas suficientes para la separación de variedades. A cada carácter se le da una anchura de clase mayor o menor dependiendo de la importancia del carácter y después, si no es suficiente para separar dos variedades, se ve si existen diferencias en varios caracteres menores a la anchura de clase establecida.

Una variedad o una línea se considera homogénea cuando las plantas que la componen poseen las mismas características morfológicas o fisiológicas. En el caso de líneas puras el estudio de homogeneidad puede incluir la descendencia obtenida por autofecundación de las líneas.

En relación con el estudio de identificación se establece niveles máximos de tolerancia de plantas fuera de tipo, dependiendo del material de que se trate. Normalmente se separan las especies autógamas y las alógamas, aunque cada especie tiene unas peculiaridades propias. Por ejemplo, tan autógama es el trigo como el algodón, sin embargo en el algodón se empieza a considerar una variedad ya estable a partir solamente de la F4 mientras que en el trigo se hace mucho más tarde, con lo que la homogeneidad que presenta el material es menor que en trigo. Por

otra parte, dentro de la misma especie, el tratamiento es distinto si es una población, o un híbrido comercial, o una línea pura.

Para la aplicación de los baremos establecidos en los niveles de tolerancia, se tendrá en cuenta las tablas de distribución binomial para cada uno de estos porcentajes. Para comprobar la homogeneidad se puede aprovechar el ensayo de distinción, marcándose las plantas fuera de tipo, o hacer un ensayo especial para comprobar la homogeneidad.

Una variedad se considera estable, si después de sucesivas multiplicaciones conserva la misma definición en sus caracteres esenciales. Si no hay duda sobre la base de la homogeneidad se supone que es estable.

Debido a la gran cantidad de datos que hay que manejar, en girasol y maíz en el ensayo puede haber 500 o más variedades, es imprescindible el uso de ordenadores con programas específicos que ayuden al manejo de la gran cantidad de datos tomados en campo. Estos programas en definitiva lo que hacen es darnos las variedades que morfológicamente no se separan entre sí y por tanto, después hay que compararlas directamente en campo, una al lado de la otra, para ver si las posibles diferencias que tengan son suficientes o no para considerarlas diferentes.

Con la información obtenida de todos estos ensayos, después de al menos dos años de estudio, se elaboran los informes que son sometidos a discusión en Grupos de Trabajos y Comisiones Nacionales de Estimación que deciden las variedades que van a ser incluidas en las listas correspondientes y de esta manera poder ser comercializadas.

6.4. La identificación molecular

La información sobre identificación varietal, diversidad genética y relaciones entre genotipos es de gran importancia para la conservación eficiente, para los programas de mejora y para la utilización de los recursos genéticos. La caracterización e identificación tradicional de variedades es el primer paso en la mejora de los cultivos y en los programas de conservación y se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos. Estos marcadores agronómicos establecen las bases para identificar y diferenciar variedades, sin embargo presentan algunas limitaciones: son demasiado lentos para ser aplicados en un posible control de identidad in vivo o para la protección de los derechos de obtentor. Además son métodos complejos, limitados, subjetivos, influenciados por el ambiente e involucran estados de desarrollo específicos del cultivo.

Por ello, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización de material vegetal basado en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los marcadores morfológicos. Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros y presentan mayor polimorfismo que los morfológicos.

Además pueden evaluarse desde los primeros estados de desarrollo de las plantas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de efectos epistáticos, permitiendo establecer en pocos días un perfil único para cada variedad (Tanksley, 1983; Rallo et al., 2002).

De entre todos los marcadores de ADN, los microsatélites (SSR) son actualmente los marcadores más populares en los estudios de identificación de material vegetal (Scott, 2001). Su alta tasa de mutación y naturaleza codominante permiten la estimación de la diversidad genética dentro y entre especies, así como la mezcla genética entre ellas incluso si están estrechamente emparentadas. Otro tipo de marcadores de nueva generación y que posiblemente sean la alternativa a los microsatélites para estudios de diversidad genética, son los 'Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP)'. Estos se basan en la identificación de la sustitución de un nucleótido por otro, representando solamente dos alelos simples. Los SNP parecen ser marcadores atractivos para aplicarlos en el futuro a estudios de diversidad genética ya que se pueden usar fácilmente en la evaluación de la variación funcional o neutra. Sin embargo, la fase preliminar del descubrimiento o selección de los SNP a partir de bases de datos es crítica. Al ser marcadores bialélicos, los SNP poseen un contenido de información bastante bajo, y hay que usar muchos para llegar al nivel de información obtenido a partir de un panel estándar de 30 loci de microsatélites. No obstante, las tecnologías moleculares están en constante evolución, aumentando la automatización y disminuyendo el costo del tipaje de SNP. Probablemente, en el futuro próximo, ello permitirá el análisis en paralelo de un gran número de marcadores a un costo inferior. Con esta perspectiva, están en marcha proyectos a gran escala en varias especies de plantas para identificar millones SNP y validar varios miles de ellos.

El Grupo de Trabajo de la UPOV especializado en Técnicas Bioquímicas y Moleculares (BMT) ha revisado recientemente tres modelos de estudio que sirvan para introducir técnicas moleculares en el sistema de la UPOV. Las principales aplicaciones de interés son el uso de marcadores asociados a genes específicos que permitan identificar una característica fenotípica (opción 1) y gestionar colecciones de referencia (opción 2). Una tercera propuesta (opción 3), en la que aún siguen debatiendo y realizando ensayos experimentales, es la posibilidad de usar un número limitado de marcadores moleculares que sean capaces de encontrar diferencias entre variedades. Sin embargo, surge la incertidumbre de saber qué sucedería si estos marcadores encuentran diferencias a un nivel genético que no se reflejaría en su fenotipo.

Recientemente, el grupo de estudio y control de variedades y semillas francés (GEVES), así como el Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales británico (DEFRA) han usado marcadores moleculares para el examen de DHE. Además, ambos organismos están siendo muy activos en cuanto a la inves-

tigación de marcadores moleculares, financiando varios proyectos para confirmar el uso de marcadores en las tres opciones previamente mencionadas. DEFRA financió un proyecto en trigo usando microsátélites para ser usados en un examen de DHE, siendo los resultados muy satisfactorios por dicho grupo. Por otro lado, los estudios realizados en maíz, melocotón, colza o rosal han sido propuestos como posibles modelos de aplicación en lo que respecta a la utilización de marcadores moleculares para exámenes de DHE. En todos ellos se concluye la eficacia de los marcadores de ADN para su utilización en estos estudios. Así mismo la variabilidad observada por medio de los marcadores en el seno de las variedades es mayor que la variabilidad observada con los caracteres tradicionales. Además, según se recoge en los anexos del documento UPOV/INF/18/1, los marcadores moleculares podrán utilizarse para establecer un umbral de "distinción *plus*", basado en la distancia genética, para la gestión de colecciones de referencia y no serán utilizados para evaluar la distinción mediante un enfoque de carácter por carácter.

El desarrollo de estas técnicas está evolucionando muy rápidamente, pero por el momento no se ha establecido su utilización en los descriptores para la identificación varietal, aunque sí se han aceptado en casos de litigios sobre apropiación de materiales vegetales. Ante esta situación no es posible prescindir de las observaciones de carácter morfológico y fisiológico que se realizan en los ensayos en campo o invernadero durante el período vegetativo, y del estudio de las partes de las plantas recolectadas que se efectúan en gabinete.

6.5. Referencias

- Tanksley S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 3-8.
- Rallo P, Belaj A, de la Rosa R, Trujillo L. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm
- Scott KD. 2001. Microsatellites derived from ESTs and their comparison with those derived by other methods. En: Henry RJ (ed.) *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 225-237.
- UPOV/INF/18/1. 2011. Unión Internacional para la protección de las obtenciones vegetales: posible utilización de marcadores moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad.

7 Los centros públicos y las empresas privadas en la obtención de nuevas variedades

José M^a Fontán del Junco¹, Marisol Arnedo Andrés², Juan Negueroles³
y Andrés Stewart⁴

¹ Eurosemillas S.A.

² Ramiro Arnedo S.A.

³ Dr. Ingeniero agrónomo

⁴ Frutaria-Grupo ALM

7.1. Introducción

7.2. Plantas de gran cultivo

7.2.1. Introducción

7.2.2. Colaboración público-privada: trayectoria y actualidad

7.2.3. Cereales

7.2.4. Leguminosas de grano

7.2.5. Oleaginosas

7.2.6. Conclusiones

7.3. Cultivos hortícolas

7.3.1. Introducción

7.3.2. La obtención de variedades hortícolas en la empresa Ramiro Arnedo S.A.

7.3.3. Principales objetivos de los programas de mejora

7.3.4. Desarrollo de los programas de mejora

7.3.5. Implicaciones de los laboratorios de cultivo 'in vitro' y biotecnología en los programas de mejora

7.3.6. Nuevas tecnologías implicadas en los programas de mejora

7.4. Cultivos leñosos

7.4.1. Origen del programa de mejora genética tradicional del grupo ALM

7.4.2. Objetivos del programa

7.4.3. Metodología del proyecto

7.4.4. Desarrollo del proyecto

7.4.4.1. *Material vegetal*

7.4.4.2. *Laboratorio de cultivo "in vitro"*

7.4.4.3. *Parcelas experimentales. Estructura*

7.4.5. Fase de registro

7.4.6. Resultados obtenidos

7.4.7. Agradecimientos

7.5. Referencias

7.1. Introducción

La mejora vegetal es parte de una cadena de innovación que va desde la investigación fundamental hasta la producción, el marketing y la venta de semillas o plantas. La mejora vegetal hace uso de diversas técnicas y metodologías, pertenecientes a diferentes disciplinas como la genética, la estadística, la fisiología, la fitopatología, la bioquímica y desde hace unas décadas se han añadido la biología molecular, la biotecnología y la bioinformática.

La mejora vegetal es la base para crear las nuevas variedades, desde el objetivo de aumentar la producción, contribuir a mejorar la seguridad alimentaria o mejorar la sostenibilidad. Las nuevas variedades tienen que adaptarse tanto a nuevos sistemas de cultivo como a tender a reducir el empleo de plaguicidas. Además de adaptarse a nuevas demandas en la calidad de los frutos, en relación por ejemplo al sabor y los contenidos nutricionales. También sirve para crear variedades cada vez más adaptadas a condiciones de cultivo más extremas y con resistencias y/o tolerancias frente a plagas y enfermedades emergentes y consolidadas.

Todas estas iniciativas en el sector de la mejora vegetal hacen que sea un sector, tanto a nivel público como privado, muy activo y abierto a los cambios continuos a los que están sometidos. Para acometer todos estos trabajos, ambos sectores requieren de estructuras fuertes y desarrolladas, tanto a nivel económico como de conocimiento científico, capaces de ir adaptándose a las circunstancias cambiantes.

La cooperación tecnológica con centros públicos de investigación es una de las piedras angulares de la estrategia de innovación de la empresa. Las ventajas derivadas de la colaboración público-privada en I+D son numerosas: se comparten riesgos y costes, permite aprovechar economías de escala y es un mecanismo por el que se generan sinergias y complementariedades entre centros públicos de investigación y empresas. No obstante, existen también problemas específicos que pueden inhibir este tipo de colaboraciones, como las dificultades que tienen los agentes para apropiarse en su totalidad de los conocimientos que han generado, así como los costes de negociación y las diferencias culturales existentes entre las partes implicadas.

7.2. Plantas de gran cultivo

7.2.1. Introducción

Tal como afirma el informe del parlamento europeo de 2013, la investigación sobre la mejora vegetal reviste una importancia fundamental para el futuro de la producción agrícola, en particular en lo que se refiere al desarrollo de variedades existentes y de nuevas variedades de modo que se pueda garantizar el abastecimiento de alimentos en el futuro. Al mismo tiempo en dicho informe se expresa la

preocupación acerca de que el mercado mundial de mejora vegetal esté dominado en la actualidad por un número reducido de grandes empresas multinacionales, y que estas compañías centren su acción en un número limitado de variedades de un número reducido de cultivos «importantes», como maíz, soja y cereales. Dentro del grupo de las plantas de gran cultivo actualmente existe una marcada diferencia entre el grado de mejora vegetal según las distintas especies, como se verá más adelante. Lo que sí tienen todas las especies en común son, al menos, dos necesidades que son claves:

a) La necesidad de utilizar, de manera complementaria a los métodos clásicos de mejora (normalmente muy demandantes en tiempo, trabajo e inversión económica), los avances propiciados por la innovación en el campo de la biotecnología y la biología molecular. Éstos pueden permitir ahorrar considerablemente tiempo así como recursos humanos y económicos a la hora de obtener nuevas variedades comerciales.

b) La necesidad de establecer colaboraciones público-privadas que impulsen el avance del sector, de manera que éste saque el máximo partido posible a los recursos fitogenéticos disponibles, a la investigación de base que se va generando, a la innovación en la creación de nuevas herramientas aplicables a los programas de Mejora, etc.

En las plantas de gran cultivo, las compañías privadas cuentan con programas de mejora que están dirigidos en su mayoría al desarrollo de híbridos, ya que supone la mejor forma de asegurar el retorno de la inversión en investigación. Esto implica fuertes inversiones, y también importantes ganancias que permiten recuperar el capital empleado así como seguir invirtiendo en nuevos programas de mejora vegetal. Sin duda, la estrategia adoptada por los agentes involucrados en la colaboración público-privada ha de contemplar, en mayor o menor medida, qué tipo de instrumento es el más adecuado para proteger el conocimiento científico y tecnológico generado como resultado de dicha cooperación.

7.2.2. Colaboración público-privada: trayectoria y actualidad

En los decenios de 1960, 1970 y 1980, la inversión del sector privado en investigaciones fitogenéticas fue limitada, especialmente en el mundo en desarrollo, debido a la falta de mecanismos eficaces para proteger los derechos de propiedad sobre los productos mejorados. Esta situación cambió cuando se empezó a comercializar de manera más intensa los híbridos para cultivos alógamos como el maíz. La viabilidad económica de los híbridos dio origen a una industria de las semillas en el mundo en desarrollo, iniciada por empresas multinacionales de países desarrollados y seguida de la creación de empresas nacionales. A pesar del rápido crecimiento de la industria de las semillas en los países en desarrollo, hasta ahora su actividad ha sido limitada y muchos mercados han quedado desatendidos. Los incentivos para la investigación agrícola privada aumentaron aún más cuando los

EE UU y otros países industrializados permitieron patentar genes contruidos por medios artificiales y plantas modificadas genéticamente. Las grandes empresas agroquímicas multinacionales fueron las primeras en invertir en la obtención de cultivos transgénicos, aunque gran parte de la investigación científica en que se basaron había sido realizada por el sector público y puesta a disposición de las empresas privadas mediante licencias exclusivas.

Una mirada a los objetivos originales del binomio formado por lo público y lo privado nos da algunas ideas iniciales sobre los problemas que deben superarse. El objetivo de las universidades y los organismos públicos de investigación se encuadra en transferir conocimiento o crearlo. Aunque en la práctica la frontera no es tan definida, ya que las universidades crean conocimiento como resultado de investigaciones realizadas por su personal docente, y los organismos públicos de investigación realizan acciones orientadas a difundirlo al formar futuros profesionales en sus ramas altamente especializadas.

La diversidad de aspectos técnicos y legales relacionados con la transferencia de tecnología se ven agravados por esta diferencia de fondo que genera culturas totalmente diferentes y bastante contradictorias. Los principales aspectos que se plantean en este ámbito son los siguientes:

a) El proceso de negociación de una transferencia de tecnología requiere de numerosas decisiones tanto por parte de los oferentes como de los receptores. Se plantean un conjunto de preguntas que deben responderse adecuadamente antes de concretar un proceso de transferencia de tecnología con éxito, por ejemplo, ¿qué hacer, licenciar la tecnología o crear una empresa para explotarla?, ¿cómo asegurarse de que la tecnología llegará al mercado y no será usada, incluso secuestrada, simplemente para defenderse de la competencia?, ¿cuál es el precio de una tecnología nueva?, ¿qué parte de la tecnología proteger legalmente?, ¿cuál es el mercado disponible?, ¿cómo evitar que la protección de la propiedad industrial e intelectual afecte al acceso público al conocimiento?

b) Otro grupo de elementos a contemplar se derivan directamente de las restricciones que imponen los diferentes objetivos de las organizaciones implicadas. Esto incluye trabas legales y financieras a la transferencia de tecnología.

c) Por último, pero no menos importante, se encuentran aquellos relacionados con las diferencias culturales de los actores implicados derivadas de sus diferentes objetivos: la comunidad de I+D y la empresarial poseen diferentes estilos de trabajo, modelos de gestión, sentido del tiempo, enfoques de confidencialidad, actitudes hacia la colaboración, entre otras.

Estos condicionantes no son triviales. Una importante contradicción que afecta directamente a la gestión de los instrumentos de propiedad industrial es la tradicional apertura de conocimiento enraizada en las universidades y organismos públicos de investigación, donde el objetivo de los investigadores y la medida de su

prestigio académico es la publicación de los resultados de las investigaciones. En el lado opuesto, las empresas generalmente mantienen estrategias de secreto industrial y exigencias de confidencialidad estrictas para defender sus posiciones frente a la competencia.

Actualmente quizás los enfoques que más frecuentemente se dan en el ámbito de la colaboración público-privada son los siguientes:

a) Enfoque de licenciamiento puro: en el que las variedades comerciales surgidas de los programas de investigación de organismos y/o instituciones públicas son licenciadas a compañías privadas (en exclusiva o no, con carácter internacional o no) que se encargan de su explotación comercial, retribuyendo a los obtentores con parte de los royalties percibidos. En este enfoque la empresa privada ejerce únicamente de brazo comercializador, sin que se intervenga directamente en el proceso de mejora vegetal.

b) Enfoque de licenciamiento colaborativo: Al igual que en el caso anterior se establece un contrato público-privado para la comercialización de las variedades vegetales surgidas del programa de mejora, pero la empresa privada sí interviene directamente en dicho programa, pudiendo ser, en algunos casos, co-obtentores de las variedades comerciales.

c) Enfoque colaborativo puro: La compañía privada toma la iniciativa y ejecuta el programa de mejora vegetal, contando con la ayuda de los organismos públicos en diferentes aspectos posibles: cesión de germoplasma de interés, aplicación de tecnología/herramientas concretas, etc.

En los siguientes apartados se mostrará una perspectiva sobre las especies de mayor interés y a las que se les está dedicando mayores esfuerzos en la obtención de nuevas variedades dentro del grupo de grupos de las plantas de gran cultivo.

7.2.3. Cereales

Dentro de las plantas de gran cultivo, posiblemente el maíz es el cultivo que mayores avances ha propiciado en la mejora genética vegetal actual, y sobre el que se ha invertido más esfuerzo para la obtención de nuevas variedades híbridas, generadas a partir de líneas puras. Como es sabido, los cruces entre líneas endogámicas o líneas puras generan genotipos más vigorosos y productivos. A este vigor híbrido se le denomina heterosis. Durante mucho tiempo tres de las cuatro líneas puras de maíz que se usaron con mayor frecuencia como parentales de los híbridos de más éxito fueron obtenidas por universidades americanas. Aunque los híbridos de maíz existen desde los años 1920, no empiezan a tener importancia comercial relevante hasta después de la II Guerra Mundial, tras haberse puesto a punto el sistema de androesterilidad génico-citoplásmica gracias al citoplasma "texas" y de buenos genes de restauración. Eran híbridos dobles por necesidades comerciales (las líneas hembra eran muy poco productivas). Posteriormente, entre

que la epidemia de *Helminthosporium* arrasó todo lo que llevaba el citoplasma texas, y que se habían conseguido líneas puras extraordinarias (entre ellas la B73), se pasó a híbridos simples.

La estrategia que se usa todavía hoy está basada precisamente en el aprovechamiento de la heterosis, ya que las semillas de los híbridos no se pueden guardar para la siembra de la próxima generación, puesto que la uniformidad y vigor de la primera generación híbrida (F_1) se pierde en las siguientes generaciones. Por ello la hibridación del maíz representó el inicio de la comercialización de la semilla, y de la división del trabajo, entre lo público y lo privado, a nivel de investigación agrícola. Es de destacar que la comercialización de semillas de variedades híbridas por parte de las empresas privadas no hubiera sido posible sin el esfuerzo inicial de iniciativa pública. Entre las razones más destacables, resulta especialmente remarcable uno de los estudios más completos para determinar los principales grupos heteróticos, que fue llevado a cabo en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en México. Otro paso importante en la obtención de nuevas variedades de maíz ha venido de la mano de la ingeniería genética, que permitió generar nuevas variedades comerciales transgénicas como el maíz Bt resistente a taladro, el maíz RR (Roundup Ready) resistente al herbicida glifosato, el maíz transgénico resistente al rayado fino, etc.

Hoy día las grandes multinacionales son las que invierten mayores recursos en la obtención de nuevas variedades, de la mano de las instituciones públicas. Éstas últimas centran sus esfuerzos en aprovechar los recursos fitogenéticos disponibles y emplear las técnicas más sobresalientes para generar líneas puras. Un caso a señalar es el que podemos encontrar en el área del llamado *cinturón de maíz* (*Corn Belt*) en EEUU. En los Estados que comprenden esta zona existe un gran entramado de pequeñas empresas que cuentan con su propio germoplasma (normalmente generado a partir de germoplasma público) que lo ponen a disposición de otras empresas mayores o de las grandes multinacionales, al mismo tiempo que prestan servicios para el desarrollo del germoplasma de terceros y generación de líneas de algún interés específico (marcados nichos de mercado).

Un ejemplo sobresaliente de colaboración público-privada es el proyecto GEM (Germplasm Enhancement of Maize Project) en EE UU, que originalmente utilizó el germoplasma generado en el seno del Proyecto de Maíz Latinoamericana (LAMP) como material de origen, y tiene como misión aumentar de manera efectiva la diversidad de germoplasma de maíz en EE.UU. El proyecto GEM fue iniciado en 1995 y hoy día está financiado con 1,3 millones de dólares por el gobierno federal y cuenta con 26 colaboradores privados, 21 colaboradores públicos, una organización no gubernamental, 12 cooperadores internacionales privados y 4 colaboradores públicos internacionales.

El arroz es otro de los grandes cultivos a los que se le ha dedicado mucha atención desde el punto de vista de la mejora genética. Quizás el caso más célebre en

esta especie ha sido el arroz dorado (Golden Rice), auspiciado por la Fundación Rockefeller y la UE y desarrollado por el Dr. Ingo Potrykus y el Dr. Peter Beyer. El arroz dorado es un arroz modificado genéticamente para acumular en su embrión beta-caroteno y otros carotenos, que son precursores de la vitamina A. Este beta-caroteno "extra" es el que le otorga un característico y peculiar color dorado, y da origen a su nombre. Este arroz pretende aportar vitamina A "extra" a las poblaciones que no consumen la suficiente cantidad de esta vitamina, imprescindible en la dieta diaria para evitar la avitaminosis y pérdida de la vista, lo cual afecta especialmente a los niños. En 2005 la nueva variedad Golden Rice 2 se anuncia que produce más de 23 veces más beta-caroteno que el arroz dorado original. Todavía ninguna de estas variedades está disponible para consumo humano. A pesar de su concepción humanitaria, tiene significativa oposición de los ambientalistas y activistas anti-globalización. Otro caso a destacar es el arroz híbrido Bt en China. Las variedades han sido obtenidas conjuntamente por científicos chinos y del Centro Mundial de Mejora del Arroz (IRRI), con sede en Filipinas, una institución de la Red Internacional de Investigación Agraria (CGIAR) que se dedica de forma especial a la mejora genética de plantas, y que está financiada por numerosas instituciones públicas y privadas, incluyendo gobiernos, universidades, empresas, instituciones y el Banco Mundial. El arroz tiene sus particularidades respecto a los transgénicos, ya que se trata de una planta autógama, es decir, que (salvo en el caso de híbridos, que son relativamente recientes y muy poco extendidos) se puede reemplazar la semilla. De hecho en Asia, la mayor parte de los agricultores reemplazan semilla (en España también en gran medida), por lo que es difícil hacer rentable para una empresa privada la inversión en investigación, ya que es muy fácil que se utilicen las nuevas semillas sin pagar royalties. Este hecho frena mucho la investigación privada, y puede ser una razón por la que en el caso del arroz se dé la sensación de un cierto liderazgo de la investigación pública respecto a la privada en la obtención de variedades.

El trigo es también una especie de importancia capital, y es un cultivo básico en la alimentación humana. En este contexto, los países productores coinciden en la necesidad de acelerar el progreso genético del trigo para mejorar el rendimiento, la eficacia en la utilización del agua y de los nutrientes, así como la adaptación al estrés biótico y abiótico, al tiempo que se garantiza una producción segura y de calidad. Actualmente existen iniciativas de colaboración público-privada, como el consorcio internacional *Wheat Initiative* formado por instituciones públicas y empresas privadas. Tal como opina Hélène Lucas, coordinadora científica internacional de *Wheat Initiative*, "a lo largo de los últimos 20 años, el trigo ha dejado de contar con inversiones para la investigación, pese a su importancia en materia de seguridad alimentaria mundial. Para abordar el reto de la producción de trigo a escala internacional, los sectores público y privado deben invertir más, y de forma coordinada, en investigación".

Si comparamos con el maíz, el nivel de avance en la mejora del trigo es menor, ya que la mayor complejidad de esta especie motivada por su carácter autógamo hace mucho más costosa esta labor. A diferencia del maíz, no están definidos los grupos heteróticos, y la generación de variedades comerciales de trigo híbrido es aún un objetivo por alcanzar para las compañías privadas. Dado que en el proceso de obtención de líneas puras es necesaria la castración para asegurar que la descendencia cosechada es procedente de autofecundación, y que la castración no es rentable hacerla manualmente (castración mecánica o eliminación de las anteras, llamada también emasculación), se han puesto en marcha diferentes metodologías, empleadas tanto por las compañías privadas como por los organismos públicos. Los procedimientos que se utilizan son: la castración química (sustancias que eliminan o inactivan los gametos masculinos), la genética (nuclear) y la génico-citoplásmica. Esta última es la que ha tenido mayor éxito comercial, dando de hecho a algunas patentes (Martín, 2010; Konzak, 2002). Por otro lado, el desarrollo de trigos transgénicos se ha manifestado con cierto retraso en comparación con otros granos y oleaginosas. A pesar de ello, en fechas recientes se han realizado trabajos de modificación genética a este importante cultivo. Por ejemplo, en EEUU se comenzó a trabajar en la tolerancia a herbicidas, principalmente al glifosato, bajo el liderazgo de las multinacionales. Otras investigaciones que han contado con la participación de centros públicos y el CIMMYT se basan en la resistencia a la fusariosis y a la sequía. Sin embargo, las dificultades para aprobar el uso comercial de trigos genéticamente modificados han frenado su desarrollo, a pesar de que muchos grupos de interés, como la Asociación de Trigo estadounidense o la Junta Canadiense del Trigo, han manifestado su deseo de contar con este tipo de productos. En Australia, en ciertas regiones, se ha probado el trigo tolerante a sequía con mayores rendimientos en comparación a la semilla convencional. De acuerdo con cifras oficiales de ese país, el incremento promisorio en la producción alcanzaría los 20 puntos porcentuales más, por lo que se espera que en algunos años se liberen estos cultivos en forma comercial. Por otra parte, expertos de Hungría, Australia y el Reino Unido han evaluado líneas transgénicas de trigo modificado genéticamente y, a partir de pruebas de campo, reportaron mejoras en rendimiento y mayor extensibilidad y fortaleza de la pasta resultante. Esta investigación demuestra que la modificación genética puede resultar significativa en la composición y propiedades funcionales del grano, y no sólo en el aspecto productivo. En el caso de la Universidad de Cornell (EEUU), sus estudios están orientados a desarrollar diversas alternativas biotecnológicas para combatir la roya del tallo, una enfermedad derivada de la raza Ug99 de este hongo. De acuerdo con el responsable de la investigación, doctor Evans Lagudah, la producción mundial depende de unos cuantos genes de resistencia a la roya, pero éstos presentan actividad limitada contra la nueva cepa, por lo que el reto es desarrollar combinaciones de genes que protejan al trigo. Parte del trabajo de los expertos es analizar la resistencia del arroz a la roya con el fin de transferir este mecanismo al trigo.

7.2.4. Leguminosas de grano

Por leguminosa de grano se entienden aquellas especies pertenecientes a la familia Fabaceae cuya utilidad primaria reside en las semillas más que en ninguna otra parte del vegetal, si bien en algunas especies existen variedades en las que también es utilizable la legumbre. Las leguminosas de grano tienen también utilidad, generalmente considerada como secundaria, como forraje, abono verde, ensilado, henificado o paja. La importancia del grano se debe, principalmente, a su composición proteínica, aunque en épocas recientes el aceite ocupe el primer lugar en algunas especies (soja, cacahuete) sin que esto quiera decir, ni mucho menos, que la proteína, aunque industrialmente considerada un subproducto, no tenga valor en ellas. Dado que las leguminosas-grano no han sufrido, en general, un proceso de mejora tan continuada como los cereales, cabe pensar que la potencialidad de este grupo es verdaderamente grande, al haber sido la respuesta a la selección muy rápida en todos los casos en que se han utilizado técnicas modernas de mejora.

Podemos preguntarnos ahora por el espectro actual de las leguminosas-grano en el mundo. Realizando una simple división entre la producción y la superficie de cada especie, se pueden comprobar los bajos rendimientos que muestran las especies de este grupo, índice de una agricultura de caracteres primitivos, rendimientos que apenas si han aumentado en los últimos 25 años, manteniéndose superficie y producción más o menos constante. Los avances más significativos pueden relacionarse con la aplicación de la ingeniería genética, la cual puede permitir la transferencia de genes que codifiquen proteínas de alto contenido en azufrados, como ya se ha logrado, a título experimental de momento, con el guisante y la soja.

La mayor parte del germoplasma disponible de las leguminosas de grano se conserva en instituciones públicas internacionales pertenecientes a la red CGIAR como el ICRISAT (India), el ICARDA (Siria), el CIAT, el IPGRI o el IITA; o en organismos nacionales como el Instituto Vavilov (Rusia), el USDA (EEUU), el CSIRO (Australia), el Nordic Gene Bank y el Weibullshom Plant Breeding Institute de Landskrona (Suecia), el Zentralinstitut de Gatersleben (Alemania), el CNR de Bari (Italia) o el INIA (España).

Respecto a los métodos de mejora, en casi todas las especies de este grupo se emplean casi mayoritariamente los métodos clásicos. No es frecuente aún el empleo de la selección asistida por marcadores moleculares, ni de técnicas modernas de mejora, a excepción del caso de la soja. Cabe mencionar también que la soja ha sido uno de los principales cultivos que se han mejorado por técnicas de ADN recombinante (ingeniería genética). Existen variedades comerciales transgénicas extensamente cultivadas, desarrolladas por compañías privadas, que son resistentes a un herbicida (glifosato) y a larvas de lepidópteros; los genes transferidos provienen, respectivamente, de *Agrobacterium tumefaciens* y de *Bacillus thuringiensis*. Otra excepción a destacar en el empleo de las nuevas herramientas que la biotecnología aporta es en la mejora de las habas, guisantes y garbanzos. Actualmente el grupo de Mejora Genética Vegetal de la Universidad de Córdoba (España) está

trabajando en la construcción del mapa genético de *Vicia faba* mediante el empleo de caracteres morfológicos, isoenzimáticos, genes de proteínas de almacenamiento y microsatélites, permitiendo la detección de QTLs de importancia agronómica como resistencia a jopo, *Ascochyta fabae* y a *Uromyces fabae*. Asimismo, un grupo mixto Universidad de Córdoba e IFAPA ha participado en la secuenciación del genoma del garbanzo y utiliza marcadores moleculares en su programa de mejora.

7.2.5. Oleaginosas

Uno de los principales cultivos oleaginosos es el girasol. Actualmente, por razones vinculadas al cuidado de la salud, la industria alimentaria mundial manifiesta una marcada tendencia a recurrir a dietas con grasas vegetales que tienen altos niveles de ácidos grasos insaturados. En este sentido, el aceite de girasol es considerado de excelente calidad comestible por su elevado contenido en ácidos grasos insaturados (oleico). Desde que en el año 1976, a partir de una mutación en una variedad rusa, se obtuvieron plantas con más del 50% de ácido oleico (que con sucesivas selecciones alcanzaron el 80/90%), muchas empresas privadas dedicadas a la mejora vegetal han empleado esta mutación para la creación de los híbridos comerciales de alto oleico, incluidos materiales con diferentes proporciones de ácido oleico. Se han obtenido así los genotipos "Alto Oleico" (más del 70% de ácido oleico) y "Medio Oleico" (65% de ácido oleico). Otra línea de interés en girasol por parte de las compañías privadas es la resistencia a diferentes plagas y enfermedades. Cabe destacar la búsqueda de variedades resistentes al jopo (*Orobanche cernua* sp. *cumana*), cuya tasa de variación es muy alta haciéndose cada vez más complicada la resistencia. Otra de las líneas que actualmente se está explotando, esta vez por parte de los centros de investigación públicos, es la obtención de variedades de girasol más resistentes al frío para condiciones de clima mediterráneo. Con ello se conseguiría un mejor desarrollo del cultivo, así como el escape a diversas plagas y enfermedades. Por otro lado, cabe mencionar cómo actualmente algunos centros públicos son pioneros en cuanto a la obtención de nuevas herramientas a emplear en los programas de mejora. Así, el Departamento de Bioinformática y Genómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe en España (CIPF) ha diseñado y desarrollado el primer dispositivo de análisis genómico por medio de la bioinformática (micromatrices o "*microarrays*"), para ser usado en los procesos de mejora genética de los cultivos de girasol. Con micromatrices se detectan los genes activos en distintas especies de girasol, y se catalogan aquellos que funcionarían mejor en los cruces destinados a la mejora genética tradicional. Asimismo, el IAS del CSIC en Córdoba (España) utiliza la genómica y las aproximaciones de genes candidatos para la caracterización funcional y mapeo de genes/QTL asociados con caracteres de interés en la mejora genética, así como la técnica de selección asistida por marcadores.

La colza es otro de los cultivos oleaginosos sobre el que se han aplicado técnicas de ingeniería genética para obtener colza híbrida resistente a un herbicida (glifosato), de la mano de compañías privadas.

Aunque es un cultivo más importante por su fibra que por su contenido en aceites, el algodón también es una de las principales especies en las que se han obtenido variedades transgénicas. El algodón transgénico que encontramos en el comercio hoy en día ha sido modificado genéticamente para que sea tolerante a los herbicidas o resistente a los insectos. Asimismo empresas multinacionales han producido semillas modificadas genéticamente de las cuales se obtienen distintos colores, especialmente el azul índigo que se utiliza en la confección de los pantalones "vaqueros".

7.2.6. Conclusiones

La historia de la mejora genética en los grandes cultivos nos ha mostrado cómo la colaboración público-privada resulta esencial para conseguir nuevas variedades que respondan a las necesidades del momento. Hoy día resulta también imprescindible dicha colaboración, aunque la intensidad de la misma varía según la especie que se trate. Un correcto enfoque por ambas partes sería el que permitiera el avance del sector agrícola, generando riqueza económica para las empresas a través de la comercialización de las variedades obtenidas. Dichos beneficios deberían emplearse para nuevos programas de investigación que, en colaboración con las instituciones públicas, permitiesen resolver los problemas que se plantean a la humanidad actual, a la vez que son fuente de desarrollo social a través de la creación de empleo y del progreso científico.

7.3. Cultivos hortícolas

7.3.1. Introducción

Las empresas que llevan a cabo mejora genética de hortícolas pueden tener y en realidad tienen estructuras muy diversas. Las compañías tradicionales integran el desarrollo de variedades, la producción y el marketing y venta de variedades. Algunas compañías hacen la mejora y comercializan sus variedades en su país de origen, pero venden las licencias de estas variedades a compañías de otros países. Cada vez más compañías están desarrollando sus propios departamentos de biotecnología aplicada a la mejora de variedades. Además existen compañías especializadas únicamente en la biotecnología aplicada a la mejora vegetal, y estas compañías no realizan la mejora de variedades, ni el desarrollo de variedades, ni la producción de semillas. Por último, algunas empresas añaden a todas las estructuras anteriores, departamentos de investigación básica e investigación aplicada a la mejora de especies hortícolas.

La mayoría de las compañías denominadas tradicionales ya han incorporado y están continuamente incrementando sus departamentos de biotecnología y cultivo de tejidos, aplicados a los programas de mejora de especies hortícolas. De todas maneras, están compañías siguen teniendo en la venta de variedades la mayoría

de sus beneficios, y no en el desarrollo de patentes o licencias. Las compañías más biotecnológicas están enfocadas en trabajar bajo contrato con las compañías de mejora de hortalizas, a través de licencias y patentes de sus obtenciones.

El volumen de ventas anual del mercado de las semillas hortalizas es de 2.700 millones de euros y se están produciendo unos incrementos anuales entre el 5-7% en el volumen de ventas. El sector de las empresas de mejora y comercialización de variedades de especies hortalizas está en una continua evolución y las empresas están constantemente introduciendo y comercializando nuevas variedades de hortalizas. Estas nuevas variedades van incorporando mejoras, especialmente enfocadas hacia la resistencia frente a plagas y enfermedades, aumento de la producción y mejora de la calidad (vida útil, sabor, etc.). Las compañías cuando introducen una nueva variedad, que incorpora un nuevo carácter de mejora, tienen alrededor de 4 años de ventaja frente a sus competidores, antes de que sean capaces de desarrollar e introducir variedades con ese carácter mejorado. Este es uno de los aspectos por los cuales la evolución y el desarrollo de las empresas del sector son tan dinámicos.

La inversión en I+D en las empresas de este sector, está en porcentajes bastante elevados, entre el 15 y el 25% del volumen de ventas y estos valores se van manteniendo, al ritmo de aumento de las ganancias, en general. La mejora de especies hortalizas es una actividad que requiere una inversión alta y a largo plazo. Hasta la década de los 80, la mejora de hortalizas estaba basada en el conocimiento, la experiencia y la aplicación de disciplinas como la estadística al estudio para la heredabilidad de los caracteres, para ser capaces de seleccionar los mejores parentales, híbridos o selecciones. Estos procesos también están influenciados por las condiciones de cultivo, y los posibles stresses bióticos y abióticos. Por tanto, el tiempo requerido para el desarrollo de una nueva variedad (por ejemplo, un híbrido nuevo), era entre 10-20 años, dependiendo de la especie a mejorar. Estos períodos tan largos de tiempo han disminuido a entre 4-11 años, por la aplicación de un amplio número de tecnologías biotecnológicas tales como el cultivo de tejidos, el empleo de las mutaciones, todas las tecnologías del ADN o la mejora molecular. La aplicación de todas estas tecnologías ha disminuido el tiempo necesario para generar una nueva variedad y también ha hecho el proceso menos dependiente de espacio de cultivo y más eficiente. A pesar de ello, la inversión en I+D ha aumentado mayoritariamente, aunque el retorno de estas inversiones es más rápido por la producción a mayor ritmo de nuevas variedades con características mejoradas.

En la actualidad un elevado número de nuevas tecnologías y procedimientos están involucrados en el estudio de germoplasma, la identificación de genes, de marcadores asociados a caracteres o para llevar a cabo multitud de estudios. Todos estos métodos están utilizándose paralelamente e intercalándose con los métodos tradicionales de mejora y permitiendo hacer una mejora más eficiente. En la actualidad, las muy diversas empresas que realizan mejora de hortalizas están centradas en la obtención de variedades de las especies hortalizas con mayor importancia

económica. Los centros públicos de investigación, si llevan a cabo programas de mejora, están centrados en especies de menor o escasa importancia económica. Si estos centros obtienen variedades de alto valor económico, se centran en mejorar aspectos que en general no resultan de interés para las empresas (p.ej. para escasas zonas de cultivo, cultivos tradicionales, etc.). En general, las colaboraciones entre centros públicos de investigación y empresas de mejora de hortalizas están orientadas a que las empresas obtengan las variedades a partir de materiales de pre-mejora o de la investigación básica originada en los centros públicos de investigación. Este tipo de colaboraciones hacen que algunas de las investigaciones más básicas (estudio del germoplasma, identificación de genes de interés, estudio de estos genes, su herencia, estudios moleculares de estos genes, etc.) lleguen con mayor rapidez a ser introducidos en una variedad hortícola comercial.

Además en el caso de países en vías de desarrollo, la mejora y obtención de variedades de las especies de mayor interés, por ser base de la dieta de esas regiones, suele estar en manos de organismos internacionales, tipo CGIAR.

7.3.2. La obtención de variedades hortícolas en la empresa Ramiro Arnedo S.A.

Ramiro Arnedo S.A. fue creada hace más de 50 años por el actual presidente de la compañía D. Ramiro Arnedo Eguizábal. En sus principios, el negocio surgió para suministrar semillas de calidad a los agricultores, principalmente del Valle del Ebro. En aquellos tiempos, la compañía introdujo el sistema forzado de cultivos, mediante el uso de plástico agrícola, preconizando lo que hoy es el cultivo forzado bajo plástico, tan importante sobre todo en el Sudeste Español. Además introdujo el primer híbrido en España en 1963, en concreto de pepino. En épocas posteriores, la empresa pasa de ser mayoritariamente una empresa comercializadora de variedades de especies hortícolas a iniciar sus propios programas de investigación, que han conducido a que la empresa en el siglo XXI, con un gran esfuerzo, tenga mayoritariamente sus ventas basadas en variedades de investigación propia, y permitirle seguir siendo una empresa familiar española e independiente.

En la actualidad la empresa cuenta con tres centros principales de trabajo. En la sede central en Calahorra (La Rioja) se encuentran los almacenes generales, la planta de limpieza de semillas, envasado y los laboratorios de control de calidad y fitopatología. También se encuentra en este centro una fábrica de empildorado de semillas. En la sede central se llevan a cabo los programas de investigación de pimiento de aire libre, lechuga, apio y cebolla, entre otros. Desde el año 2007 se cuenta con un centro de investigación en El Ejido (Almería), donde se desarrollan los programas de investigación principalmente de pimiento de invernadero, berenjena y melón. Además allí están localizados los laboratorios de cultivo 'in vitro' y biotecnología de la empresa. Además la empresa dispone de una finca experimental en el Campo de Cartagena (Murcia), donde se desarrollan también los programas de mejora de pimiento de aire libre e invernadero, lechuga y melón, entre otras especies.

7.3.3. Principales objetivos de los programas de mejora

A continuación se van a detallar brevemente los principales objetivos de mejora, dentro de dos de los programas de investigación de la empresa, como son el pimiento y la lechuga.

Dentro del programa de mejora de pimiento de aire libre, hay que distinguir el pimiento de mercado y el pimiento de industria. Dentro del pimiento de mercado, existen los tipos lamuyo, california, dulce italiano, de freír, cónicos, tipo padrón y picantes. Existen programas de mejora sobre todos esos tipos, para que se adapten a las condiciones de cultivo, principalmente de la Península Ibérica al aire libre. Además se están desarrollando variedades de los tipos más estandarizados para su cultivo en otras zonas de la Cuenca Mediterránea o zonas más alejadas incluso. Para el cultivo de pimiento al aire libre, la estructura de la planta es muy importante, su porte y esqueleto y éste es un factor de mejora muy a tener en cuenta. Luego todas las características de los frutos, con sus especificaciones para cada tipo, en cuanto a tamaño, consistencia, grosor de pared, color, vida útil. Además siempre hay que tener en cuenta la productividad. En cuanto a la introducción de resistencias frente a enfermedades, se cuenta con la introducción de genes de resistencia frente a tobamovirus, el bronceado del tomate (TSWV), el virus del mosaico del pepino (CMV) o *Xanthomonas vesicatoria*, entre otros.

En cuanto al pimiento para industria, se están desarrollando variedades para pimiento para pimentón, pimiento tipo piquillo y morrón de conserva, entre otros. Todas estas variedades tienen que estar adaptadas a sus diferentes zonas de cultivo para que los frutos no queden demasiado expuestos, tener buenos cuajados y tender a la maduración agrupada. En el caso de los pimentones, hay que mejorar el valor de los grados ASTA para la coloración de la carne del pimiento y como se conservan los pigmentos a lo largo del tiempo. En cuanto a los destinados a otros tipos de industria, dependiendo de su destino, hay que orientar la mejora si van hacia la industria del envasado, congelado, etc. En general los frutos para industria necesitan un grosor de la carne elevado, o que el pedúnculo, placenta y semillas se arranquen con facilidad. Además de que soporten bien el manejo que van a recibir en fábrica, como por ejemplo, escaldados, lavados, pelados, etc.

Respecto al pimiento para su cultivo en invernadero, la empresa tiene centrado su programa de mejora para cultivo en invernadero en la cuenca mediterránea principalmente. Actualmente los programas están abiertos para los tipos california en sus diferentes colores, lamuyo, italianos y cónicos, sin olvidar las diferentes especialidades de pimiento que están cobrando más auge cada vez, como los tipos snacks, miniaturas. Además se trabaja en pimiento picante de invernadero y patrones. Los requerimientos que los diferentes programas de mejora tienen que ir solventando son muchos entre ellos destacan: la adaptación a los diferentes ciclos de cultivo, que están muy bien establecidos y donde cada vez se están demandando variedades que aguanten un ciclo largo de cultivo y que lleguen al final del cultivo,

produciendo frutos de excelente calidad. El porte de la planta tiene que estar totalmente adaptado a las condiciones de invernadero y a los manejos y ciclos largos. Los frutos obtenidos tienen que ser de una calidad casi excelente, en cuanto a formas y tamaños. Dependiendo de los destinos a los que vayan, existen diferentes especificaciones en cuanto a los calibres, pesos, etc., pero siempre manteniendo un estándar de calidad muy alto. Hay determinadas fisiopatías del pimiento como el plateado, el stip o el microrayado que son objetivos claros de los programas de mejora para conseguir su disminución y a poder ser su eliminación de las variedades. En cuanto a las plagas y enfermedades, la introducción de resistencias frente a tobamovirus, el virus del bronceado del tomate (TSWV), algunos patotipos del virus Y de la patata (PVY) y algunos tipos de *Xanthomonas vesicatoria* son objetivos claros de los programas, dependiendo de las zonas de cultivo donde van destinadas las variedades a obtener. Otras enfermedades como las causadas por nematodos, *Phytophthora capsici* y oidio están cobrando cada vez más interés y ya se están comercializando variedades con resistencias y/o tolerancias frente a ellas.

La empresa Ramiro Arnedo S.A. tiene un extenso e importante programa de mejora para el desarrollo y obtención de variedades de lechuga. Este programa está centrado actualmente en la obtención de los tipos romana, mini, batavias y lechugas especiales (rojas, etc.) y sobre todo para su cultivo en la Península Ibérica. Todas las variedades obtenidas tienen que estar adaptadas a los diferentes ciclos de cultivo, en todas las zonas de cultivo, cuyas exigencias son muy elevadas, por lo que los requerimientos exigidos para las variedades actuales de lechuga son muy altos. En cuanto a la calidad de las variedades de lechuga que salen al mercado, tienen que ser excelentes en formas, tamaños, uniformidad, textura, color, sabor, evitando la subida a flor y cualquier fisiopatía, tipo 'tip burn'. En los programas de mejora de lechuga tiene una relevancia especial la mejora para la introducción de resistencia frente a *Bremia lactucae*. Este hongo tiene la facilidad de generar nuevos aislados con una elevada velocidad y las resistencias introducidas son sobrepasadas rápidamente, en la mayoría de los casos. Por tanto, los programas de mejora están continuamente a la búsqueda, estudio e introducción de nuevas fuentes y genes de resistencia. En este caso, existe un organismo, el IBEB (International Bremia Evaluation Board), donde la colaboración público-privada es muy estrecha. El IBEB es el organismo encargado de identificar nuevas razas de *Bremia* y promover que las empresas de mejora de lechuga y los organismos públicos de investigación empleen una única nomenclatura, aprobada entre todos, así como testar los nuevos aislados encontrados y en su caso las razas, con los materiales de mejora disponibles. La información sobre la evolución del patógeno y su respuesta en las variedades resistentes de lechuga es puesta en común frecuentemente, lo que permite que la introducción de nuevos genes de resistencia en las variedades se produzca con bastante agilidad, en este caso. En el desarrollo de variedades de lechuga es frecuente piramidar diferentes genes de resistencia, para que estas variedades no se vean sobrepasadas por los aislados más virulentos con tanta rapidez.

En los programas de mejora de lechuga también tienen importancia la introducción de resistencias frente a la plaga del áfido *Nasonovia*, o el 'corky root' causado por la bacteria *Sphingomonas suberifaciens*.

7.3.4. Desarrollo de los programas de mejora

A continuación se van a detallar y explicar algunos de los aspectos y metodologías tradicionales y también los más novedosos, en los apartados siguientes, que han sido y están ya introduciéndose en los programas de mejora para la obtención de variedades de hortalizas.

Los aspectos tradicionales de la mejora de especies hortícolas (diferentes métodos de mejora y selección) y los pasos habituales que se llevan para la obtención de variedades y sobre todo híbridos de hortalizas (obtención de líneas de mejora, evaluación de las líneas, realización de cruzamientos, cribas, ensayos, introducción comercial y registro y venta de variedades), no van a ser tratados exhaustivamente, ya que existen multitud de revisiones donde están explicados en profundidad. Por tanto a continuación se van a exponer brevemente qué pasos se siguen para la obtención de variedades de pimiento y lechuga, como ejemplos.

En el caso de los programas de mejora de pimiento, el primer paso es la obtención de las líneas parentales. Los procedimientos para la obtención de parentales, son muy variados, desde los tradicionales, siguiendo diferentes métodos de mejora, los retrocruzamientos, las mutaciones o la obtención de líneas doblehaploides, que es un método estandarizado en el caso del pimiento.

Una vez obtenidas las líneas parentales, hay que proceder a su evaluación agronómica. Estas evaluaciones hay que realizarlas en las condiciones óptimas para cada línea para poder evaluar al máximo su potencial, como posible parental. Además de una exhaustiva evaluación fenotípica, también se realizan evaluaciones genotípicas de las líneas, mediante su caracterización con diferentes marcadores moleculares, como se explicará en los apartados siguientes.

Una vez evaluadas las líneas, se escogen las adecuadas para la realización de los cruzamientos experimentales. Todos los cruzamientos serán evaluados en sucesivas fases de cribas, donde se irán eliminando aquellos con las características negativas y no adecuadas, hasta que las seleccionadas lleguen a las fases de ensayos internos y externos. En estas últimas fases, la evaluación de los híbridos es aún más exhaustiva que en las fases anteriores, sobre todo a nivel cuantitativo. Los híbridos que superen estas fases pasarán a introducción comercial y posteriormente serán registrados y puestos a la venta.

Los programas de mejora de lechuga, pasan por fases bastantes similares a las descritas para la obtención de variedades de pimiento, con la diferencia de que las variedades comerciales de lechuga no son híbridas. Inicialmente la mejora de lechuga comienza con obtener variabilidad, por diferentes metodologías (cruzamien-

tos intra e interespecíficos, retrocruzamientos) y posteriores selecciones, donde se evalúan y seleccionan los mejores ejemplares, para continuar su selección. En el caso de la lechuga es muy importante conservar y manejar correctamente el stock de semilla 'madre', que será la base para las producciones comerciales de las variedades de lechuga.

7.3.5. Implicaciones de los laboratorios de cultivo 'in vitro' y biotecnología en los programas de mejora

En general, la mayoría de las empresas que realizan mejora de especies hortícolas ya disponen de sus propios laboratorios de cultivo 'in vitro' y biotecnología, para dar apoyo a sus diferentes programas de mejora y al departamento de calidad de las empresas.

Los laboratorios de cultivo 'in vitro' desempeñan diversas tareas en las empresas. En primer lugar son el lugar donde se obtienen líneas parentales, mediante el desarrollo de líneas doblehaploides. Estas líneas puras pueden obtenerse por diferentes metodologías; cultivo de anteras, microesporogénesis, o ginogénesis. El método empleado, depende de la especie en estudio. En el caso del pimiento o la berenjena las metodologías empleadas están basadas en la obtención de embriones a partir de las células androgénicas. En las cucurbitáceas, se fomenta con la irradiación de polen y la fecundación con él para la formación de embriones haploides. Con todas estas metodologías se consigue una aceleración en los programas de mejora, ya que en meses es posible obtener líneas puras para su posterior evaluación fenotípica y genotípica.

Además en los laboratorios de cultivo 'in vitro' se desempeñan otras tareas también relevantes para los programas de mejora. Una de ellas es el desarrollo de metodologías para llevar a cabo el rescate de embriones. Estas metodologías son necesarias especialmente cuando se quieren llevar a cabo cruzamiento interespecíficos dentro de los programas de mejora para introducir genes de interés de especies cercanas a las de las variedades comerciales. Si no se aplicara el rescate de embriones, los embriones obtenidos no sobrevivirían y no seríamos capaces de obtener las generaciones siguientes. Las metodologías de rescate de embriones son específicas para cada especie, a veces para cada cruzamiento y requieren, en algunos casos, un elevado tiempo de puesta a punto para su posterior implementación en los laboratorios, de un modo más o menos rutinario.

También en los laboratorios de cultivo 'in vitro' se llevan a cabo técnicas de regeneración de tejidos, cultivo in vitro de materiales para acelerar su crecimiento, multiplicación de material vegetal, que son igualmente procedimientos muy útiles y necesarios en los programas de mejoras de especies hortícolas.

En cuanto a los laboratorios de biotecnología dentro de las empresas de mejora, sus tareas son numerosas y van aumentando conforme la investigación básica va avanzando y aplicándose más en los programas de mejora.

Dentro de todas las tecnologías desarrolladas en los últimos tiempos, el desarrollo de marcadores moleculares es la más utilizada por las empresas de mejora de especies hortícolas. Desde los años 80, numerosos tipos de marcadores moleculares se han ido implementando (RFLPs, RAPDs, SCARs, CAPs, SSRs, AFLPs, etc). En la actualidad los marcadores tipo SNPs, son los que están llevando un mayor desarrollo, tanto los marcadores 'dentro de los genes', como los ligados a los genes de interés. Además los SNPs permiten su utilización a gran escala y su automatización, ya que se han desarrollado plataformas de genotipado que pueden ser utilizadas tanto dentro de los laboratorios de las empresas, como para ser externalizadas en servicios externos.

Los marcadores moleculares tienen numerosas aplicaciones en los programas de mejora. En el caso de la mejora asistida por marcadores, cualquiera de los marcadores ligados a un carácter de interés o desarrollado dentro de las secuencias génicas puede servir para acelerar los procesos de mejora. Por ejemplo, cuando se están llevando a cabo retrocruzamientos, sirven para seleccionar los individuos portadores del carácter de interés. También cuando se están obteniendo líneas parentales se pueden utilizar para seleccionar los individuos con el carácter de interés. Por otra parte, los marcadores moleculares pueden utilizarse para seleccionar el genoma del parental recurrente, por ejemplo en retrocruzamientos, y así reducir también el número de retrocruzamientos necesarios, al eliminarse de manera más efectiva las partes del genoma que arrastran características no deseables. También los marcadores moleculares son útiles para saber el grado de fijación de líneas en proceso de fijación y estimar cuantas generaciones son necesarias hasta conseguir una línea parental. Los marcadores moleculares son también útiles para estimar las distancias genéticas entre materiales y por tanto poder estimar y escoger los cruzamientos que puedan ser más satisfactorios.

Aunque no sea propiamente parte de los programas de mejora, los laboratorios de biotecnología también desarrollan marcadores moleculares para la identificación varietal y la determinación de la pureza varietal e híbrida. Esta parte también es esencial para tener un control más adecuado y preciso de las líneas parentales, tanto cuando las líneas están en los programas de mejora o cuando son ya parte de variedades comerciales.

7.3.6. Nuevas tecnologías implicadas en los programas de mejora

Además del desarrollo de tecnologías de marcadores moleculares y la modificación genética, otras tecnologías se están desarrollando, tales como: mutagénesis molecular, RNA-i, 'Reverse breeding', cisgénesis o intragénesis. Todas estas tecnologías llevarán al desarrollo y la obtención de nuevas variedades, con diferentes valores añadidos. Todavía no está totalmente aclarado cuáles de estas tecnologías estarán consideradas en la regulación de 'Organismo genéticamente modificado' y por tanto las regulaciones a las que estarán sujetas las posibles variedades obtenidas.

El desarrollo de las diferentes plataformas de secuenciación masiva (NGS) está permitiendo la secuenciación de genomas de diferentes especies vegetales en un corto periodo de tiempo. NGS producen millones de secuencias cortas de ADN de una manera semi-automática y con una muy alta eficiencia. Estas nuevas tecnologías se han desarrollado por la alta demanda de disponer de un elevado número de secuencias génicas, de una manera rápida y automatizada. Las tecnologías disponibles utilizan diferentes principios químicos, desde los equipos 454 (Roche Applied Science), Solexa (Illumina Inc.), Solid (Applied Biosystems) or Polonator. Una tercera generación de tecnología está surgiendo, implementado nuevas metodologías como el 'HeliScope Single Molecule Sequencer', 'Nanopore Sequencer', o el 'Ion Torrent'. La elección de la tecnología a utilizar, tiene que depender de cada caso, de las aplicaciones posteriores que se vayan a hacer de esas secuencias, de la cantidad y calidad requeridas en las secuencias obtenidas y de la disponibilidad económica y temporal. Por ejemplo, la longitud de las secuencias obtenidas suele ser un factor crítico en muchos casos, especialmente en organismos con muchas secuencias homólogas y donde el ensamblaje es más complicado.

Las diferentes tecnologías de NGS han sido utilizadas para secuenciar 'de novo' un amplio número de especies vegetales y animales y que va aumentando continuamente (Xu et al., 2011; Li et al., 2010). NGS también está siendo empleado para resecuenciar genomas (Ashelford et al., 2011), secuenciación de metilaciones (Cokus et al., 2008) y secuenciación de transcryptomas y de 'small RNA' (Strickler et al., 2012). Paralelamente al desarrollo de las diferentes tecnologías de NGS, se está desarrollando un amplio número de soluciones bioinformáticas, para ser capaces de analizar la masiva producción de secuencias y llevar a cabo su correcto ensamblaje. Sin este desarrollo paralelo entre nuevas tecnologías de secuenciación y la bioinformática sería imposible continuar y discriminar correctamente los datos obtenidos.

Las tecnologías de NGS han contribuido ya a la secuenciación de múltiples especies de hortícolas. La combinación de la secuenciación tradicional con el método Sanger y la tecnología Illumina completó la secuencia del pepino (*Cucumis sativus*) (Huang et al., 2009) y con la tecnología 454 se obtuvo la secuencia del tomate (The tomato genome consortium, 2012). Utilizando Illumina NGS también se han obtenido los genomas de por ejemplo, la sandía (Guo et al., 2012) y el pimiento (Kim et al., 2014).

Las principales aplicaciones de las tecnologías de NGS, que van a ser descritas a continuación, están ya siendo empleadas tanto por las empresas del sector, como por los centros de investigación o en proyectos conjuntos entre ambos.

7.3.6.1. Descubrimiento de SNPs

Antes de la aparición de las tecnologías de NGS, el descubrimiento de SNPs estaba limitado por el alto coste de su descubrimiento, desarrollo y detección. Ante-

riormente se identificaban los SNPs a través de la amplificación por PCR y la secuenciación por Sanger de regiones genómicas de interés, o usando chips de ADN. También eran identificados 'in silico', partiendo de ESTs.

Con el desarrollo de las tecnologías de NGS, la identificación de un elevado número de SNPs es asumible para los diferentes grupos de investigación de los sectores públicos y privados. Un elevado número de marcadores pueden ser identificados a partir de la secuenciación masiva de todo el genoma, del transcriptoma, de secuencias de ADN enriquecidas (Davey et al., 2011; Mammadov et al., 2012). El desarrollo de programas bioinformáticos, como por ejemplo el disponible libremente SGSAutoSNP (Lorenc et al., 2012) permite la rápida y adecuada identificación de los SNPs a partir de los datos obtenidos de NGS de cualquier especie. La identificación de los SNPs puede verse dificultada por el grado de error de NGS, o por la presencia de secuencias repetitivas o altamente homólogas, que causan problemas en el ensamblaje de las secuencias cortas obtenidas en la secuenciación. Por tanto la obtención de secuencias de mayor longitud y la utilización de estrictos controles y parámetros en la secuenciación y en el ensamblaje de las secuencias, puede minimizar la identificación de falsos SNPs. Sin embargo, la primera limitación para la identificación de SNPs es la ausencia de un genoma de referencia para anclar las secuencias obtenidas y ensamblarlas. Cuando sólo se dispone del transcriptoma de la especie, o secuencias del tipo ESTs, la identificación de los SNPs estará limitada a las regiones codificantes del genoma.

Posteriormente a la identificación de los SNPs, se han desarrollado diversas metodologías para la detección de los SNPs. Los dos sistemas más utilizados para una detección masiva de SNPs son los sistemas Affymetrix e Illumina y se han desarrollado para múltiples especies de hortícolas.

También se han desarrollado metodologías como la de 'Genotyping by sequencing' (GBS) (Elshire et al., 2011), que permite la identificación de SNPs, después de hacer una reducción del genoma y construir una librería reducida y no es necesario el fraccionamiento ni el 'bar coding' de las muestras. GBS ya ha sido empleado con éxito en numerosas especies hortícolas (Labate et al., 2014).

Otra tecnología desarrollada para el genotipado y que está utilizándose ya en especies hortícolas es el genotipado mediante la metodología KASP (He et al., 2014). Esta técnica está basada en el empleo de una manera competitiva de alelos específicos, para discernir ambos alelos de un SNP y también inserciones y deleciones en un locus específico.

7.3.6.2. Construcción de mapas y localización de genes

Tradicionalmente los métodos de mapeado de genes y/o QTLs de interés han consistido en localizarlos en mapas genéticos densos de marcadores moleculares, sea cuales sean estos marcadores moleculares. Actualmente las diversas metodologías de NGS, seguidas de la identificación de un elevado número de SNPs y su

localización genética y física en grupos de ligamiento es una metodología que permite un mapeado de alta densidad y que los intervalos de confianza de los QTLs puedan ser más estrechos.

NGS también está siendo empleado combinado con la metodología del 'Bulked Segregant Analysis' para identificar marcadores ligados a genes de interés. Se pueden construir mezclas de ADN de individuos de una población segregante, que difieran al máximo para un carácter de interés y que han sido fenotipadas de una manera escrupulosa. Estas mezclas son secuenciadas con cualquiera de las técnicas de NGS, para la identificación de un elevado número de marcadores polimórficos entre las mezclas y que serán validados como posibles marcadores ligados al carácter en estudio (Hu et al., 2012).

7.3.6.3. Empleo de la biodiversidad existente

Los recursos fitogenéticos son necesarios para encontrar alelos beneficiosos y necesarios en grandes colecciones de germoplasma y poder ser utilizados en programas de mejora con objetivos muy diversos. El empleo de nuevas tecnologías, puestas a disposición de los estudios de germoplasma, está favoreciendo su mayor uso y disponibilidad y el empleo de genes 'exóticos' en variedades comerciales. El empleo de NGS, el ecotilling y las tecnologías de marcadores, por ejemplo está favoreciendo que la selección de materiales que porten esos genes de interés pueda hacerse de una manera más eficaz y rápida.

7.4. Cultivos leñosos

7.4.1. Origen del programa de mejora genética tradicional del grupo ALM

La mejora genética de frutales por empresas privadas no comenzó hasta los años 90 ya que hasta entonces no parecía necesario iniciarlo por diversas razones. No había una demanda comercial exigente en variedades y el mundo varietal funcionaba con las variedades americanas que se iban introduciendo progresivamente en España.

La situación cambió cuando esas variedades americanas, mediante contratos con los obtentores, se comercializaron de forma exclusiva por algunas compañías, dejando al sector frutícola en general con pocas alternativas de elección. Por otro lado, los compradores extranjeros comenzaron a ser más exigentes con la calidad de la fruta. Todo esto, motivó que el grupo ALM iniciara sus trabajos de mejora de variedades frutales en el año 1995.

El programa de trabajo se dividió en dos según la zona climática:

- a) Zona norte. Se dedicó a la obtención de variedades con necesidades medio-altas en frío invernal. Las especies incluidas fueron melocotón/nectarina, albaricoquero y ciruelo.

- b) Zona sur. La obtención de variedades con pocas necesidades en frío invernal. Las especies aquí estudiadas en principio fueron melocotón/nectarina y posteriormente se añadió ciruelo.

7.4.2. Objetivos del programa

Los objetivos principales del programa, se concretaron por las cualidades de la fruta, según especies, que se quería conseguir con las nuevas variedades. Entre las cualidades más destacadas de la fruta comercial están:

El **calibre**, factor importante para la comercialización de frutas, sobre todo en las zonas de producción medio-tardías.

La **firmeza**, carácter primordial para la comercialización de frutas en el exterior y sobre todo, una demanda exigida por los importadores internacionales para transportes largos.

El **color**, factor importante, aunque es más por el aspecto estético que por la misma fruta. Este carácter ha sido fundamental en los últimos años para diversas especies, especialmente para el albaricoquero.

Sabor, carácter muy importante para el establecimiento de nuevos y mejores mercados. La demanda de variedades con buen sabor es bastante reciente, pero cada vez mayor, y el olvido de los mejoradores sobre este factor ha tenido mucho que ver con el descenso de consumo de las variedades tradicionales en casi todos los mercados internacionales.

Época de maduración, ya que la obtención de variedades precoces en la zona sur y tardías en el norte se decidió como línea prioritaria específica.

Los objetivos específicos del proyecto se basaron en la obtención de variedades con buena firmeza, a ser posible de maduración lenta, con buen calibre y color, pero sobre **todo de buen sabor** que es lo que las distinguirá de las variedades comerciales existentes en esa época (1995).

7.4.3. Metodología del proyecto

1. Recopilación e identificación de las variedades comerciales más sobresalientes.
2. Recuperación y evaluación de variedades autóctonas mejorantes.
3. Distribución de las colecciones de variedades según zonas climáticas.
4. Elección de los parentales según los objetivos previstos.
5. Polinización dirigida en campo y recogida de frutos de los cruzamientos.
6. Cruzamientos inter-específicos de ciruelo y albaricoquero.

7. Utilización de sistemas para mejorar la germinación tradicional de los frutos obtenidos.
8. Puesta a punto del laboratorio de cultivo "in vitro" para las variedades precoces o de difícil germinación tradicional.
9. Establecimiento de los campos de evaluación de los cruzamientos, según especie y zona climática.
10. Propagación de las selecciones avanzadas.
11. Cruzamientos entre selecciones avanzadas.
12. Retrocruzamiento de las selecciones avanzadas.
13. Establecimiento de las parcelas de evaluación comercial de dichas selecciones.
14. Registro y patente de las selecciones elegidas.
15. Caracterización molecular de las variedades patentadas y, en su caso, realizar los análisis de compatibilidad entre variedades.

7.4.4. Desarrollo del proyecto

7.4.4.1. *Material vegetal*

Melocotón y nectarina

La recuperación de material frutal autóctono de Aragón fue muy importante en el desarrollo de una parte del proyecto. Estos materiales se utilizaron con la cooperación de los técnicos del CITA (M. Carrera, R. Socias i Company, J.L. Espada). Así mismo, la introducción de diverso material genético internacional (Arkansas - Dr. Clark, Brasil - Dra. María Bassols, México - Dr. S. Pérez) mediante acuerdos de cooperación con los obtentores, permitió aumentar las posibilidades de mejora.

Para la mejora del calibre, se introdujeron genes de variedades sobresalientes en este aspecto. Lógicamente, se buscaron variedades que maduraran en épocas en donde existían huecos comerciales carentes de variedades de buen tamaño. En una primera fase, no fue limitante la época de maduración de los parentales que aportaran calibre, tanto en la zona norte como en la sur, para su elección. Con este sistema de parentales alejados en su maduración, pudimos obtener buenos resultados.

La mejora de la firmeza se llevó a cabo con la introducción de genes de variedades firmes que pudieran mejorar el aspecto y la comercialización de las variedades obtenidas. Los grupos de variedades de carne amarilla y blanca de pulpa no fundente, mejoraron la firmeza y, asimismo, el sabor de la descendencia.

La mejora del color en melocotón se realizó con cruzamientos entre melocotón y nectarina que permitieron en general, mejorar el color de las nuevas variedades.

La mejora del sabor se basó en dos líneas de trabajo:

a) Con las variedades españolas de pulpa no fundente, que mejoraron el sabor de la descendencia. Se pudieron obtener variedades de características similares de firmeza y sabor con carne amarilla y sobre todo, carne blanca, que cubren un extenso período comercial. Esto permite presentar en el mercado un tipo definido de melocotón, blanco y amarillo, con buen sabor, color atractivo característico, de buena firmeza y con tamaño comercial adecuado dentro de un período amplio de maduración.

b) La aparición en el mercado internacional de variedades de nectarina y melocotón de carácter subácido, con una buena respuesta comercial, determinó la creación de otra línea específica de mejora.

La elección de la época de maduración de las variedades que se quiere obtener es muy dependiente de las exigencias comerciales del mercado y de las limitaciones genéticas de las variedades existentes. La recuperación de materiales autóctonos de Aragón (en el programa del norte) y el cruzamiento de variedades separadas al menos 50 días en su época de maduración (en el programa del sur), permitieron obtener diversas poblaciones interesantes en una primera fase.

El avance del proyecto se aceleró cuando se comenzaron a estudiar las poblaciones F_1 procedentes de los primeros cruces. En algunos casos nos permitió conocer algunos caracteres genéticos de los parentales de dichas F_1 .

Así, las F_1 procedentes de la autopolinización de ciertos parentales en particular, nos permitió conocer directamente su potencial genético para ciertos caracteres (androesterilidad o heterogeneidad de ciertos caracteres como color de la pulpa, melocotón/nectarina, pulpa fundente/no fundente, ya que se conoce la heredabilidad de los mismos). Esto nos proporcionó una base de información genética que nos ayudó mucho para planificar algunos cruces futuros, utilizando esos parentales antes citados.

Simultáneamente, comenzamos a usar las poblaciones de selecciones propias F_1 , procedentes de parentales distintos, cruzándolas entre ellas en dos formas distintas:

a) Retrocruzándolas, para observar la segregación de los parentales. La F_2 resultante de la autopolinización de unos cruces determinados (F_1), nos ha dado mejores resultados que la F_1 , más genérica, al proporcionarnos segregaciones de una gran riqueza genética.

b) Cruzando líneas hermanas de F_1 , procedentes del mismo cruzamiento, nos proporcionó mejoras cuantitativas de ciertos caracteres deseados.

Albaricoquero

El éxito en el mercado internacional de variedades de color rojizo, en mayor o menor porcentaje, influyó en el desarrollo de esta línea de trabajo de mejora. Las

variedades americanas con esta configuración se cruzaron con algunas variedades españolas de buen sabor lo que facilita la obtención de variedades de buen aspecto, buen sabor y firmeza.

El retrocruzamiento de las F_1 , tal como se ha detallado antes, nos dio unas poblaciones de una gran variabilidad, pero se eligió la selección de variedades firmes y de buen sabor.

Ciruelo

El grupo ALM-Frutaria ha sido uno de los pioneros en España en la plantación de ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.), tanto en el norte como, principalmente, en el sur y Extremadura.

El objetivo, con esta especie fue desarrollar variedades tempranas y por otro lado, de época tardía y de buena firmeza, con el fin de ampliar la gama varietal. Así mismo, desarrollar la obtención de híbridos inter-específicos que aportara nuevas frutas al mercado, con diferente tipología y un abanico de colores, sabores y durezas. Después de un período de selección de los cruces, se pasaron al sur para su evaluación comercial como selecciones avanzadas.

El desarrollo de las selecciones (F_1), de la misma forma antes citada antes para obtener F_2 , resultó en una gama amplia de selecciones muy variadas, dada la heterogeneidad, en general, de esta especie. Sin embargo, también se encontraron nuevas dificultades con la aparición de individuos estériles.

7.4.4.2. Laboratorio de cultivo "in vitro"

Para la realización del proyecto se dispuso de un laboratorio de cultivo "in vitro" en el término de Caspe (Zaragoza) para el cultivo de embriones de las especies descritas en el proyecto. La utilidad principal del laboratorio es el cultivo de los embriones procedentes de los cruces realizados. Las variedades precoces o semiprecoces, no llegan a completar el desarrollo del embrión por lo que frecuentemente, los embriones son inmaduros y poco viables por lo se necesita cultivarlos "in vitro".

Una vez recogidos los frutos, se procede a una primera desinfección. Después de esto se procede a la operación de apertura del hueso, dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas. Después de roto el hueso se extrae la semilla, flameándola y a continuación se coloca el embrión en el tubo de ensayo o placa de Petri, con el medio nutritivo adecuado para cada caso. El medio de cultivo más utilizado es WPM.

Una vez sembrados los embriones en el medio, se envuelven las placas en papel de aluminio y se someten a un período de estratificación en frío en una cámara a 4°C para pasar las horas frío necesarias para germinar. Los períodos de estratificación son normalmente de 30-45 días a 4°C. Una vez pasado el período de estratificación, las placas con los embriones se llevan a la cámara de cultivo, donde permanecen

durante 10-15 días en oscuridad, para permitir el desarrollo de las raíces y después se pasan a un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se quita el papel de aluminio y se dejan en las estanterías durante 10-15 días. La temperatura se mantiene constante a 20°-25°C. Se mantiene la iluminación artificial en valores comprendidos entre 1000 y 2000 lumen y la humedad entre 50-70%.

El repicado se realiza en tubos de ensayo con 10 ml aproximadamente de medio de enraizamiento y se mantienen en la cámara de cultivo hasta que enraicen. Aquellas plantas cuyo sistema radicular y longitud sean buenos se pasan directamente al invernadero, así como las que vayan enraizando. Este paso se realiza en bandejas, con jiffi-potts o tiestos pequeños, con una mezcla de turba y perlita. Se lavan los brotes enraizados con agua destilada para eliminar los restos de agar. Una vez trasplantadas, se tratan con un fungicida para evitar la presencia de hongos. Posteriormente, se cubre la bandeja con un plástico transparente, formando así un túnel que debe permanecer totalmente cerrado durante unos días. Luego se abre durante 15-20 minutos, incrementando cada día en algunos minutos el tiempo de apertura del túnel hasta llegar a 60 min. Cada día se va abriendo más tiempo hasta el momento en que el túnel esté abierto por 2 horas y ya se puede abrir de forma definitiva. Tras la apertura del túnel se realiza un tratamiento con un abono foliar. Posteriormente se abonan periódicamente con abonos de solubilidad lenta y asimismo, realizaremos tratamientos de fungicidas e insecticidas.

Cuando la planta tiene un tamaño considerable se pasan a tiestos mayores para favorecer el sistema radicular. Para evitar la aparición de podredumbre de cuello se debe tratar con fosfito potásico.

En este laboratorio, también se realiza la detección del virus de la sharka del material vegetal mediante el método ELISA.

7.4.4.3. Parcelas experimentales. Estructura

De todo este amplio programa, fueron seleccionándose a través de los años, los individuos más sobresalientes en cada caso y en cada región climática. La evaluación de esas selecciones se mantuvo por tres campañas, mínimo para asegurar que cualquier irregularidad climática no afectara los resultados.

Para el desarrollo del proyecto, en el norte y en el sur, se eligieron varias parcelas para la ubicación de los cruces, selecciones avanzadas y variedades registradas, manteniéndose cada parcela separada. Se realizó esta separación en todas las especies tratadas.

a) Campo de evaluación de cruces o plantitas procedentes de la germinación de los cruces. En él se agrupan las plantas por especie: albaricoqueros, melocotoneros y ciruelos y además, por año de cruce. Es decir, existen parcelas, separadas por mallas cortavientos, que diferencian los cruces por año de cruzamiento. Para ello, se dispuso una zona de reserva de I + D para ir plantando cada año los cruces resultantes en parcelas separadas.

Las plantas procedentes de los cruzamientos crecerán por un período variable, dependiendo de la especie considerada, hasta alcanzar su madurez fisiológica y entrada en producción. En general, los cruzamientos de melocotonero, ciruelo y albaricoquero tienen un período juvenil de 2-3 años.

La formación de los árboles se hará en eje vertical y con marco de plantación estrecho para el aprovechamiento del terreno; generalmente, de $3,5 \times 1$ m.

La identificación de los árboles es fundamental para el seguimiento de los mismos cuando entren en producción. Por consiguiente, el marcado en el campo de las filas, árboles, parcelas y sectores, se deberá hacer con sumo cuidado y además, anotar en un diario específico cada zona de plantación según la especie, el año de plantación, el código del cruce, etc.

Durante el primer año, se efectúa una poda mínima para incentivar el desarrollo de las plantitas, el abonado se realiza a través del goteo y se coloca plástico negro al suelo para evitar la aparición de malas hierbas y reducir las pérdidas de humedad.

El comienzo de la fructificación de las plantas marca el inicio real del programa de mejora ya que es precisamente la fruta el objetivo del mismo. Se iniciará, entonces, la toma formal de datos, tanto en la parte vegetativa del árbol como productiva (flores y frutos). El registro de estos parámetros se anotará en las hojas configuradas para normalizar dichos datos en la base de datos.

Al ir pasando los datos tomados en campo al ordenador, utilizamos una base de datos. De la ordenación y clasificación de las fichas registradas para cada individuo, haremos la selección anual de los cruces más sobresalientes para cada especie y de ese grupo, si es muy grande, haremos una segunda selección más restringida en número, que será la definitiva para cada campaña. Las selecciones del Norte se denominarán C_1, C_2, \dots y las del Sur: S_1, S_2, \dots . La numeración, en los dos casos, será correlativa y acumulativa a través de los años, para no repetir los números.

- La selección definitiva de los cruces se realizará cuando se observen 3 cosechas evaluadas positivamente para un determinado cruce.
- Sin embargo, para acortar el proceso descrito, se comenzarán a injertar las selecciones muy destacadas a partir de su primera o segunda cosecha, para su evaluación comercial, en parcelas separadas de las de los cruces. En estas parcelas, se utilizarán las mismas técnicas agronómicas utilizadas en la finca correspondiente.

b) Campo de evaluación agronómica de las selecciones avanzadas. En parcelas anexas a las anteriores y subdivididas en bloques separados se van plantando las selecciones avanzadas injertadas en patrones comerciales conocidos: GF-677 y 'Garnem' para los melocotoneros, y Mariana 26-24 y 'Adesoto' para los albaricqueros y ciruelos. Allí se evalúan agronómicamente y se cultivan similarmente a una plantación comercial. Observaremos las cosechas por 3 campañas para su selección definitiva.

c) Campos de evaluación de las variedades comerciales. Aquí, se plantan las variedades patentadas como paso intermedio a su plantación en más superficies y como fuente de material de propagación.

d) Colecciones de variedades comerciales. Existen varias parcelas específicas dedicadas a las colecciones varietales de melocotonero, albaricoque y ciruelo. Aquí se evalúan y comparan las variedades comerciales más sobresalientes con las selecciones avanzadas procedentes de nuestro programa de mejora. Así mismo, estas colecciones se utilizan para la obtención de polen y/o cruzamientos dirigidos dentro de nuestro programa.

A partir de una elección favorable de cualquier selección avanzada, se pasa a la fase comercial de la variedad mediante la plantación en diversas fincas comerciales del grupo, con diferentes condiciones agroclimáticas (valle del Ebro, Andalucía y Extremadura) que nos permita una evaluación más completa de la misma.

7.4.5. Fase de registro

Las selecciones evaluadas favorablemente en los estudios agronómicos en fincas, pueden ser los candidatos potenciales para comenzar su proceso de registro y/o patente. Para ello, se deberán de cumplimentar unos formularios específicos, tanto a nivel nacional como comunitario y proceder a su entrega a los organismos correspondientes de protección vegetal.

Lógicamente, el objetivo final de todo este proceso es la patente de las variedades más sobresalientes obtenidas a lo largo del mismo pero antes de ello, se estudia la caracterización molecular de las variedades candidatas a registro en laboratorios de centros de investigación oficiales (como el CITA de Zaragoza).

Finalmente, se pasan a registro de protección de variedades los candidatos elegidos.

7.4.6. Resultados obtenidos

El resumen de los logros de este proyecto iniciado en 1995 y que sigue vigente en estas fechas se resume en una serie de variedades patentadas (Fig. 7.1).

- 3 variedades de albaricoquero, el más destacado Almabar.
- 3 variedades de plumcot: Rainbow-1 (P-6), Rainbow-2 (P-7) y Rainbow-3 (P-10) (Fig. 7.2).
- 12 variedades de melocotonero de las que destacan los melocotoneros blancos de carne dura, Almamedí y Almenar (Fig. 7.4).
- 14 variedades de nectarina de las cuales Almanebo y Tarderina son las más conocidas (Fig. 7.3).

La superficie plantada dentro del grupo ALM-Frutaria con variedades propias, está cerca de las 500 hectáreas (Cuadro 7.1). Se debe comentar también que 8 de las variedades patentadas por Frutaria-Grupo ALM se encuentran a disposición del público a través del vivero autorizado por la empresa, Viveros Ebro.

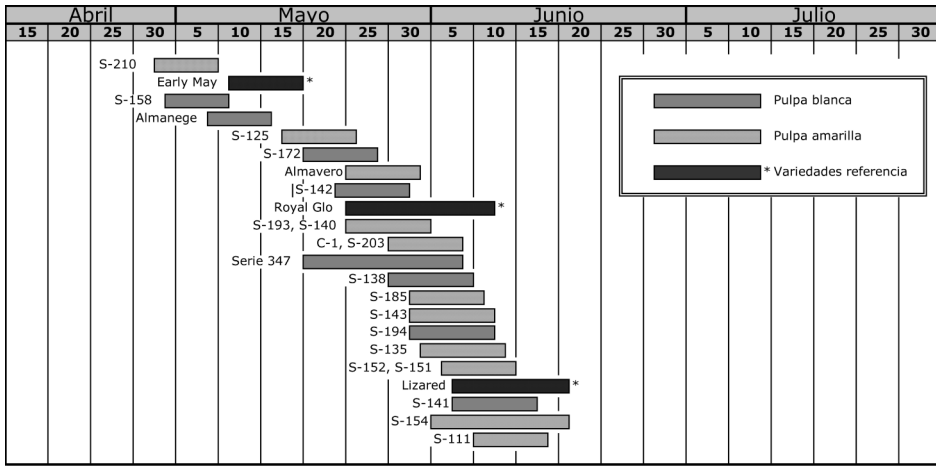


Figura 7.1.—Calendario de maduración de las variedades patentadas por Frutaria-Grupo ALM.



Figura 7.2.—Distintivo de los "plumcot" Rainbow.

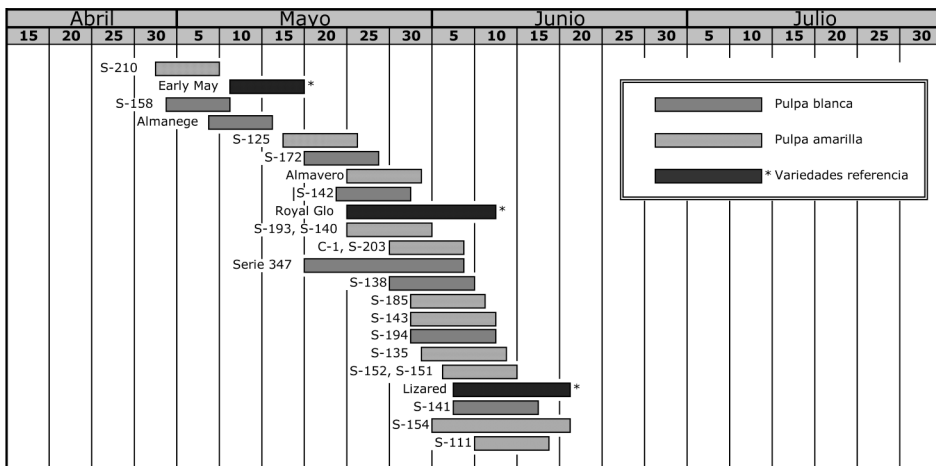


Figura 7.3.—Calendario de maduración de las variedades de nectarina de Frutaria-Grupo ALM.

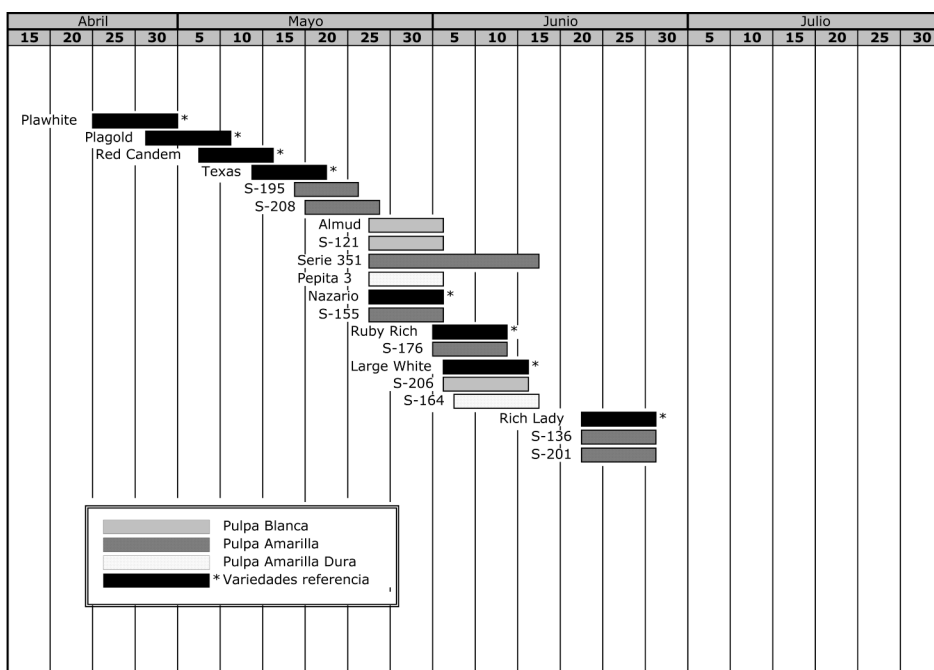


Figura 7.4.–Calendario de maduración de las variedades de melocotonero de Frutaria-Grupo ALM.

Cuadro 7.1.–Superficie plantada (ha) con las variedades obtenidas por Frutaria-Grupo ALM.

Especie	Zona norte	Zona sur	Extremadura
Albaricoquero	48	-	-
Melocotonero	69	30	16
Nectarina	124	74	78
Plumcot	-	56	-

7.4.7. Agradecimientos

Nos gustaría expresar nuestro agradecimiento a las siguientes personas:

Equipo de colaboradores de las zonas norte y sur, tanto de laboratorio como de campo especialmente a Julio Millán, administrador de la finca Santa Bárbara (Caspé), por su ayuda inestimable a lo largo de todo el proyecto, en la zona norte y a José Fernando Naranjo, Agrasur, por su trabajo en la zona sur.

Cuerpo técnico del grupo ALM de las zonas de actuación del proyecto, por su aportación desde el inicio hasta el desarrollo comercial de las variedades patentadas.

Departamento de marketing del grupo, por creer en este proyecto y abrir nuevas líneas de desarrollo comercial de las variedades patentadas.

Los centros de investigación siguientes: CITA (Zaragoza), IVIA (Valencia), CSIC (Málaga) y CNB (Madrid) por su importante ayuda a lo largo del proyecto.

CDTI por su valiosa contribución a la ejecución de este programa de mejora genética.

7.5. Referencias

- Alemany M, Bernabeu-Mestre J. 2010. Bioética y Nutrición. Agua Clara, Alicante, España.
- Ashelford K et al. 2011. Full genome re-sequencing reveals a novel circadian clock mutation in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 12: R28.
- Cokus SJ et al. 2008. Shotgun bisulphate sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452: 215-219.
- Cubero Salmerón JI. 2013. Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi Prensa, Madrid, España.
- Davey JW et al. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Rev. Genet.* 12: 499-510.
- Elshire R et al. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos ONE* 6: e19379.
- FAO. De la Revolución Verde a la Revolución Genética. Depósitos de documentos de la FAO.
- Foro de Empresas Innovadoras (FEI). 2009. Derechos de propiedad industrial e intelectual en proyectos tecnológicos de cooperación público-privada. Colaboración con: CDTI, Oficina Española de Patentes y Marcas, Comunidad de Madrid.
- Guo S et al. 2012. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genet.* 45: 51-58.
- He C et al. 2014. SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol. Biol.* 1145: 75-86.
- Hu Z et al. 2012. Discovery of pod shatter-resistant associated SNPs by deep sequencing of a representative library followed by bulk segregant analysis in rapeseed. *Plos ONE* 7: e34253.
- Huang S et al. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genet.* 41: 1275-1281.
- Kim S et al. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genet.* DOI:10.1038/ng.2877.
- Konzak CF. 2002. Patente WO2002098209A2: Cytoplasmic male sterility-based system for hybrid wheat plant and seed production.
- Labate JA et al. 2014. Genetic structure of the four wild tomato species in the *Solanum peruvianum*s.l. species complex. *Genome* 57: 169-180.
- Li R et al. 2010. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. *Nature* 463: 311-317.
- Lorenz M et al. 2012. Role of bioinformatics as a tool for oilseed *Brassica* species. En: Genetics genomics and breeding of oilseed *Brassic*as. Science Publ. Inc., New Hampshire, EE UU. pp 194-205.
- Mammadov J et al. 2012. SNP markers and their impact on plant breeding. *Int. J. Plant Genomics* 2012: 728-745.
- Martín A. 2010. Patente WO 2010058048 A1: Sistema de androesterilidad génico-citoplásmica en trigo.

Nadal Moyano S, Moreno Yangüela MT, Cubero Salmerón JI. 2004. Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Mundi Prensa, Madrid, España.

Paulsen M. 2013. Informe del Parlamento Europeo: "Mejora Vegetal: opciones para aumentar la calidad y la producción".

Solleiro JL. 2008. Biotecnología y trigo. SAGARPA.

Strickler SR et al. 2012. Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species. *Amer. J. Bot.* 99: 257-266.

The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-645.

Xu X et al. 2011. Genome sequence analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475: 189-195.

http://www.public.iastate.edu/~usda-gem/GEM_Project/GEM_Project.htm

<http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s16.htm>

http://www7.international.inra.fr/es/colaboraciones/enfoque_internacional_de_la_mejora_del_trigo

<http://www.fao.org/docrep/003/v4730s/v4730s04.htm>

<http://www.fao.org/docrep/006/y5160s/y5160s08.htm>

http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/nbt/journal/v18/n10/full/nbt1000_1101.html

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Disenan-el-primer-dispositivo-de-analisis-genomico-para-la-mejora-genetica-del-girasol>

8 Registros de variedades y protección de obtenciones vegetales en la Unión Europea

José M^a Elena

Ingeniero Agrónomo

8.1. Antecedentes

8.2. Los registros de variedades en la Unión Europea

8.2.1. Los catálogos comunes de variedades para especies agrícolas y hortícolas

8.2.2. Directivas de la Unión Europea que organizan, regulan y armonizan los registros nacionales de variedades de frutales, vid, ornamentales y forestales

8.2.3. Posible evolución en la gestión de los catálogos comunes de la UE

8.3. Registros de Variedades Comerciales en España

8.4. La protección de los derechos del obtentor en la Unión Europea

8.4.1. Características del sistema de protección comunitaria de obtenciones vegetales

8.4.2. La experiencia del sistema comunitario de protección de variedades vegetales

8.4.3. Enlaces y sitios web

8.1. Antecedentes

El resultado del valioso trabajo de mejora vegetal, acumulado en la variedad acabada, debe conservarse sin deterioro en todo el proceso que va desde el obtentor hasta el utilizador final de la variedad. El material vegetal ha de pasar por procesos críticos y muy delicados que incluyen: el mantenimiento varietal, la multiplicación inicial de la variedad, la producción de semilla o material de multiplicación, la certificación/control de la producción y la comercialización. Para asegurar que no se deteriore el material de la variedad se han desarrollado las normas y trabajos de **registro de variedades**.

Con los sistemas de registro, al final, las variedades quedan definidas, caracterizadas y descritas, comprobándose que son distintas, homogéneas y estables. La descripción de la variedad queda disponible para realizar los importantes e imprescindibles trabajos de: control del mantenimiento varietal, control de la producción comercial (semilla o material vegetal), controles en comercio, y en su caso aplicar el sistema de protección de los derechos del obtentor.

Para que el esfuerzo de obtención pueda ser reconocido y remunerado se crean los sistemas jurídicos de **protección de obtenciones vegetales**. En la Unión Europea, tal como se detallará más adelante, se creó en 1994 un sistema regional comunitario para proteger los derechos del obtentor.

Con el fin de explicar el funcionamiento de los registros de variedades y la protección de los derechos del obtentor en la Unión Europea, en este capítulo se van a tratar los **registros de variedades** en la Unión Europea (UE) y el **sistema comunitario de protección de los derechos del obtentor**. Si hace falta aclarar y distinguir estos dos sistemas, resulta muy útil relacionarlos con los correspondientes que hay en la legislación española. El sistema de registro de variedades de la UE está desarrollado en España con el Registro de Variedades Comerciales (Ley 30/2006 de Semillas y Plantas de Vivero y Recursos Fitogenéticos; Reglamento general del Registro de Variedades Vegetales). Para desarrollar la protección de los derechos del obtentor, está en vigor en España la ley de Protección de Variedades Vegetales (Ley 3/2000 de Régimen jurídico de la Protección de las obtenciones Vegetales).

8.2. Los registros de variedades en la Unión Europea

Desde el principio de su actividad en el sector de la agricultura, la Comunidad Económica Europea (CEE) reconoció la importancia de la semilla y materiales de multiplicación de plantas en la producción agrícola. Uno de los objetivos iniciales de la CEE era lograr y facilitar la libre circulación de mercancías en todo su territorio. Para conseguir este objetivo en las semillas y materiales de multiplicación, fue necesario desarrollar unas normas que lo hicieran aceptable y factible.

Dentro del sistema jurídico de la CEE (actualmente UE), se han utilizado las directivas para establecer las normas de catálogos registros y registros de variedades.

Se trata de **directivas de armonización** que, adoptadas por el Consejo de la CEE o por la Comisión, han de ser luego traspuestas o trasladadas a la legislación interna de todos los Estados Miembros. Por esta vía se logra la imprescindible armonización de los sistemas de registros de variedades en todos los estados que integran la CEE, ahora UE.

Más adelante, al tratar en este capítulo el sistema comunitario de protección de las obtenciones vegetales, veremos que para su instauración se decidió utilizar un Reglamento de la CEE. Un reglamento CEE tiene una importante diferencia con las directivas: Es directamente aplicable en todos los Estados Miembros de la CEE (ahora UE) sin necesidad de que haya una trasposición a las legislaciones nacionales

8.2.1. Los catálogos comunes de variedades para especies agrícolas y hortícolas

En 1970, en la entonces CEE se prepararon, aprobaron y publicaron las primeras Directivas que organizaron los procedimientos de **registro y los catálogos comunitarios de variedades vegetales** (Directiva 70/457/CEE del Consejo, de 29 de septiembre de 1970, referente al catálogo común de las variedades de las especies de plantas agrícolas y Directiva 70/458/CEE para el catálogo de especies hortícolas.)

Con otra serie de Directivas de armonización en la CEE se fijaron las normas para el control de la producción de las semillas y plantas y su comercialización. Con ellas se organizaba la producción y el comercio de semillas y materiales vegetales de multiplicación de los principales grupos de especies de interés económico (cereales, hortalizas, forrajeras, remolacha, oleaginosas, textiles, vid, frutales, forestales, ornamentales).

Las Directivas de armonización sobre registro, que debían ser traspuestas/trasladadas a la legislación nacional de todos los Estados Miembros de la CEE, fijaron los principios y desarrollaron un sistema de registros de variedades armonizados y con las mismas reglas, definiciones y exigencias para toda la CEE. Las variedades vegetales para poder registrarse habían de ser distintas, homogéneas y estables. Antes de inscribir una variedad en un **registro nacional**, o lista nacional, era necesario comprobar mediante un examen técnico **DHE** (Distinción. Homogeneidad, Estabilidad) que se cumplieran las exigencias. La inscripción de una variedad en un registro nacional suponía la autorización para producir y comercializar en ese Estado.

Al haber pasado todas las variedades incluidas en todos los catálogos nacionales los mismos controles y procedimientos se aceptaba y autorizaba la comercialización de semilla o material de multiplicación en el territorio de todos los Estados Miembros de la CEE. Esta fue, y es la situación para variedades de especies agrícolas (gran cultivo o cultivos extensivos) y para especies hortícolas. Para estos dos importantes grupos de especies la Unión Europea publica un **catálogo común** (lista de variedades comunitaria) que incluye las variedades que pueden comercializarse libremente en el territorio de todos los Estados Miembros de la actual UE.

El catálogo común es una lista de variedades, la compilación de todas las variedades inscritas en todos los registros nacionales. Los catálogos comunes son unas listas limitativas, es decir, no se puede producir y/o comercializar semilla o material de multiplicación de variedades no inscritas. Hay previstas posibilidades de excepciones o derogaciones para poder comercializar o producir: pequeñas cantidades, hacer ensayos o experimentación. Las Directivas de los catálogos comunes no se aplican para variedades cuyo destino probado sea a la exportación a terceros países (fuera de la UE).

A su vez hay algunas posibilidades de obtener una derogación, o excepciones al principio de libre circulación de material de variedades incluidas en los catálogos comunes en la UE. Estas excepciones pueden autorizarse a un Estado, tras petición motivada y tras considerar su debida motivación y justificación. Excepciones que pueden motivarse por: riesgos o perjuicios fitosanitarios causados por el cultivo de la variedad; ausencia de valor agronómico en todo el Estado; tratarse de una variedad modificada genéticamente con posibilidad de prohibir o limitar su cultivo o someterlo a condiciones especiales o condicionar la utilización de los productos resultantes de su cultivo; posible riesgo para el medio ambiente o la salud humana. En la práctica son muy contadas las excepciones aceptadas.

Las Directivas comunitarias sobre catálogos comunes de variedades y las legislaciones nacionales exigen que las variedades para poder ser inscritas han de ser **distintas**, suficientemente **homogéneas** y **estables**. Estas condiciones se han de comprobar sometiendo previamente a material de la variedad a un examen técnico (ensayo DHE).

Al objeto de lograr un buen nivel de armonización de los trabajos nacionales de registro de variedades, y así facilitar su aceptación por todos los Estados Miembros, desde 1972, las Directivas de la CEE detallan los procedimientos que han de seguirse para comprobar, antes de ser inscritas, que las variedades son suficientemente **distintas**, **homogéneas** y **estables**. Los ensayos **DHE** han de realizarse por los Estados Miembros de acuerdo con los criterios técnicos fijados en las Directivas. Se describen, para cada especie, los detalles a los que han de ajustarse los ensayos DHE: diseño del ensayo; condiciones del ensayo; material a examinar facilitado (por el obtentor o solicitante de la inscripción); número mínimo de plantas a estudiar; duración del ensayo; mínimo de características a observar; colección de referencia a utilizar; criterios para juzgar la distinción, homogeneidad y estabilidad.

Como más adelante se describirá, la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV), que gestiona y administra el sistema comunitario de protección de las obtenciones vegetales, preparó y adoptó unos protocolos para realizar los ensayos DHE necesarios en el proceso de otorgar el título comunitario de protección a variedades vegetales. Para desarrollar esos protocolos, la OCVV basó sus trabajos en las Directrices de examen DHE que había desarrollado la Unión Internacional

para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). La OCW ya ha desarrollado y adoptado para sus trabajos protocolos técnicos para más de 280 especies. Teniendo en cuenta la calidad de estos protocolos, la UE decidió ya en 2003 (Directivas 2003/90/CE y 2003/91/CE de la Comisión, 06.10.2003) que también debían seguirse para realizar los ensayos DHE con vistas a la inscripción de variedades de especies agrícolas y hortícolas en los registros nacionales de los Estados Miembros, que luego pasarían a integrar el catálogo común.

En el caso de las variedades de especies de cultivos agrícolas (extensivos: patata, remolachas, forrajeras, cereales, oleaginosas y textiles), además de los requisitos de DHE, se exige que la variedad tenga un **valor agronómico o de utilización** suficiente. Ha de hacerse una evaluación de los siguientes componentes: rendimiento/producción; resistencia a los organismos nocivos; comportamiento con respecto a factores del entorno físico; características cualitativas. Para cada especie se definen en las directivas, y en las legislaciones nacionales, los parámetros de evaluación de ese valor agronómico exigido.

Es necesario también que cada variedad tenga una denominación que cumpla las normas establecidas al respecto.

Las variedades inscritas han de ser mantenidas estables, sin variación, mediante una adecuada y eficiente selección conservadora.

La inscripción de una variedad en un registro o lista nacional tendrá una duración de 10 años. Es posible renovar la inscripción si la variedad sigue siendo DHE al final de los diez años.

Las Directivas comunitarias establecen la obligación de prestarse asistencia y cooperación, entre los Estados Miembros, para facilitar el cumplimiento de las normas que regulan los catálogos comunitarios y los registros nacionales de variedades en la UE. Esta exigencia, en la práctica es una realidad que facilita mucho la operación de las autoridades nacionales responsables de los registros de variedades y el mantenimiento del eficiente sistema de catálogos comunitarios.

Está previsto también que los Estados Miembros puedan prever o decidir que la admisión de una variedad en el catálogo común o en el catálogo de otro Estado Miembro sea equivalente a la admisión en su catálogo nacional. En este caso y para esas variedades o especies, el Estado Miembro estará dispensado de las obligaciones de hacer exámenes DHE, tener expedientes de las variedades, comunicar cambios en su registro, etc.

Hay una derogación general que se aplica a todas las obligaciones de mantener listas de variedades nacionales impuestas por las Directivas a los Estados Miembros de la UE. Aquellos Estados en que no se cultive la especie, ni se produzca, ni se comercialice semilla o material vegetal de multiplicación están eximidos de la obligación de mantener listas de variedades para esa especie.

A lo largo de los más de cuarenta años transcurridos desde finales de los 60, en la hoy Unión Europea, se han desarrollado las directivas que organizan los registros de variedades y las normas de comercialización de la semilla y materiales de multiplicación para las especies vegetales de interés económico. Todas las Directivas de armonización, para registros y para comercialización, se han ido revisando para adaptarlas a la evolución de las técnicas de control, de la creación varietal, de la identificación varietal, etc.

Las limitaciones de espacio de este capítulo no permiten detallar la normativa para todas las especies de interés económico. Sin embargo se facilitaran aquí los principios generales y donde pueden obtenerse detalles. Ver los sitios web en el apartado 8.4.3 al final de este capítulo.

Desde 1970 hasta hoy, todos los Estados que se han adherido a la UE, antes de hacerlo, han trasladado a su legislación nacional el contenido de las directivas comunitarias de catálogos que organizaban los registros de variedades a nivel nacional. Así la legislación nacional de todos los Estados Miembros estaba armonizada y permitía y facilitaba los intercambios entre todos los miembros de la UE.

Los Estados Miembros organizan y mantienen sus registros de variedades nacionales. Publican y comunican a la Comisión Europea (CE) y a los otros Estados Miembros las modificaciones en los mismos (inclusiones y exclusiones de variedades). La CE supervisa, compila y publica los catálogos comunes.

En 2014 sólo hay operativos catálogos comunes para variedades de especies agrícolas (cultivos extensivos) y hortícolas. En el grupo de especies agrícolas se incluyen: remolachas azucarera y forrajera; plantas forrajeras; textiles y oleaginosas; cereales y patata.

8.2.2. Directivas de la Unión Europea que organizan, regulan y armonizan los registros nacionales de variedades de frutales, vid, ornamentales y forestales

Para especies **frutales, ornamentales y forestales** no hay unas directivas de la UE que organicen un catálogo común tan detallado como en los casos antes descritos para especies agrícolas y hortícolas. Sí hay en vigor directivas que armonizan las normas y requisitos de comercialización del material vegetal de multiplicación de estas especies. En estas directivas sí se especifican los aspectos y requisitos que han de cumplir las variedades para poder ser comercializadas. Las listas nacionales de variedades se mencionan, pero no hay unos catálogos comunitarios operativos.

Seguidamente se destacan los aspectos relacionados con listas de variedades que aparecen en las directivas de comercialización de la UE para especies frutales, ornamentales y forestales.

En el caso de las especies **frutales** (Directiva 92/34/CEE del Consejo de 28.04.1992, Diario Oficial L 157 del 10.06.1992) se establece que en los Estados

Miembros de la UE los materiales de multiplicación y los plantones de frutales se han de comercializar, como es lógico, con una referencia a la variedad a la que pertenecen. Se obliga también a que las variedades deberán:

1. Bien ser de conocimiento común y estar protegidas de acuerdo con las disposiciones sobre protección de las obtenciones vegetales o registradas oficialmente de forma voluntaria o de otra forma;
2. O bien estar inscritas en listas elaboradas por los proveedores, con sus descripciones detalladas y las denominaciones correspondientes. Dichas listas estarán a disposición, previa solicitud, del organismo oficial responsable del Estado Miembro de que se trate.

Las variedades podrán registrarse oficialmente cuando se considere que reúnen determinadas condiciones aprobadas oficialmente y posean descripción oficial.

La Directiva obliga a que la inscripción en un registro oficial sea después de que se ha comprobado que la variedad es distinta, homogénea y estable. Las características de los exámenes para comprobar la DHE de las variedades (características mínimas a observar, duración de los ensayos) y la duración de la admisión oficial de una variedad en el registro nacional, son muy parecidas a las establecidas para las especies agrícolas y hortícolas. Claro está que adaptada a las especies frutales.

Al final cada variedad deberá estar descrita y tener, siempre que sea posible, la misma denominación en todos los Estados Miembros.

En la práctica, los Estados Miembros de la UE que han establecido registros o listas nacionales de variedades de especies frutales, siguen los mismos protocolos de examen DHE que los utilizados para la protección de las variedades vegetales en estas especies. En paralelo a lo indicado al tratar los catálogos comunitarios de especies agrícolas y hortícolas, también para las especies frutales, se siguen los protocolos de examen DHE de la OCVW y en su ausencia las Directrices de examen de la UPOV para cada especie concreta.

Para confirmar el objetivo de la libre circulación, la Directiva obliga a los Estados Miembros de la UE a que los materiales de multiplicación y los plantones de frutal que cumplan los requisitos y condiciones de la Directiva no estarán sometidos a restricciones de comercialización distintas de las establecidas en la presente Directiva en lo que se refiere al proveedor, los aspectos fitosanitarios, el medio de cultivo y las condiciones de inspección.

Los Estados Miembros que tienen operativas listas nacionales para variedades de frutales comunican a la Comisión y a los otros Estados Miembros de la UE las modificaciones de las listas (solicitudes de inscripción recibidas, inclusiones, exclusiones, cambios). Estos intercambios de información se suelen hacer mediante publicación periódicas que incluyen la información pertinente.

La citada Directiva de frutales menciona la posibilidad de que se decida establecer y publicar un catálogo común de variedades para especies frutales. Hasta hoy en 2014 no se ha tomado tal decisión y hay listas nacionales de variedades de especies frutales de los Estados Miembros.

Para variedades de **vid** se aprobó la Directiva 68/193/CEE del Consejo de 09.04.1968 (Diario Oficial L 93 del 17.04.1968) y se aplica a la comercialización de los materiales de multiplicación vegetativa de la vid en la UE. Para esta especie la directiva establece que los Estados Miembros de la UE han de mantener y publicar un catálogo (nacional) de variedades de vid admitidas oficialmente para la certificación y para el control de los materiales de producción estándar en sus territorios.

Los Estados Miembros han de aceptar que las variedades admitidas en los catálogos de los demás Estados Miembros, se admitan también para la certificación y para el control de los materiales de multiplicación estándar en su propio territorio, y especifica la Directiva, sin perjuicio de lo dispuesto en el Reglamento (CE) 1493/1999 del Consejo, de 17 de mayo de 1999, por el que se establece la Organización Común del Mercado vitivinícola en lo que respecta a las normas generales referentes a la clasificación de las variedades de vid. Hay que tener en cuenta que este Reglamento (OCM vitivinícola) establece unas normas, limitaciones y autorizaciones para la plantación de variedades en las zonas de producción vitivinícola.

Si es el caso, los Estados Miembros han de tener también una lista de clones admitidos para certificación y control en su territorio. Como en el caso de las variedades de vid, los Estados Miembros han de aceptar, para la certificación en su territorio, los clones que estén admitidos para certificación y control en los otros Estados Miembros.

En aplicación de los principios generales que establecen las directivas de registro de variedades en la UE, las variedades de vid, para incluirse en los registros nacionales han de ser distintas, suficientemente homogéneas y estables. Se fijan los detalles de los exámenes DHE: diseño, duración del ensayo, caracteres a observar, etc. Los detalles de los protocolos de examen se revisarán a la vista de los conocimientos científicos y técnicos. Como para otras especies se utiliza el protocolo técnico para examinar la DHE preparado por la OCVV para la vid.

Las variedades o clones inscritos en los registros nacionales han de mantenerse estables mediante procesos de selección conservadora.

La Directiva establece también que se realizarán dentro de la UE pruebas y exámenes comparativos comunitarios para el control *a posteriori* de muestras de materiales de multiplicación de la vid comercializada, tomadas por muestreo. Estos ensayos o exámenes comparativos se utilizarán para armonizar los métodos técnicos de certificación y para verificar el cumplimiento de las condiciones que han de satisfacer los materiales de multiplicación. De hecho también se utilizan para comprobar el mantenimiento de las muestras que se han incluido en los mismos.

Si se detectara en estos ensayos algún problema de falta de estabilidad en alguna muestra, podrá iniciarse un control de la variedad para ver si se mantiene conforme a como fue inicialmente incluida en el registro. Si se confirmara una falta de estabilidad de una variedad, podría tener como consecuencia la exclusión de la variedad del registro en que estuviese inscrita.

Los Estados Miembros que tienen operativas listas nacionales para variedades de vid han de comunicar a la Comisión y a los otros Estados Miembros de la UE las modificaciones de las listas (solicitudes de inscripción recibidas, inclusiones, exclusiones, cambios). Estos intercambios de información se suelen hacer mediante publicación periódicas que incluyen la información pertinente.

Hay una derogación general que se aplica a todas las obligaciones de mantener listas nacionales impuestas por las Directivas a los Estados Miembros de la UE. Aquellos Estados en que no se cultive la vid, ni se produzca, ni comercialice material vegetal de multiplicación están eximidos de la obligación de mantener listas de variedades para esa especie.

En el caso de las especies **ornamentales** existe la Directiva 91/682/CEE del Consejo de 19.12.1991 (Diario Oficial L 376 de 31.12.1991) relativa a la comercialización de los materiales de reproducción de las plantas ornamentales y de plantas ornamentales dentro de la CEE. Esta Directiva, y sus posteriores modificaciones, han tratado sólo muy poco los aspectos de listas de variedades. Se obliga a los Estados Miembros a que se comercialicen los materiales con una referencia a la variedad en unos casos: 1/si se trata de una variedad legalmente protegida; 2/una variedad registrada oficialmente; 3/comúnmente conocida o 4/incluida en una lista conservada por el proveedor que contenga una descripción detallada y su denominación.

En el caso de las especies ornamentales se han desarrollado más los trabajos orientados a la protección de las obtenciones vegetales. Se verá más adelante que en el sistema comunitario de protección más del 58% de solicitudes recibidas corresponde a variedades de especies ornamentales. No hay obligación de mantener listas nacionales de variedades para estas especies.

En el caso de las especies **forestales** existe la Directiva 1999/105/CEE del Consejo de 22.12.1999 (Diario Oficial L 11 de 15.01.2000) sobre la comercialización de materiales forestales de reproducción. En este grupo de especies el tratamiento en las directivas de armonización de los aspectos referidos a listas de variedades es bastante similar a las ornamentales. Hay que evitar la confusión que puede producir el art.10 de la Directiva antes citada para especies forestales. En este artículo se obliga a los Estados Miembros a elaborar un registro nacional, pero se refiere a materiales de base de las diversas especies forestales admitidas en su territorio y no a variedades.

Cumpliendo las obligaciones establecidas en las Directivas de la UE sobre listas de variedades para especies frutales, ornamentales y forestales hay Estados Miem-

bros de la UE que tienen para estas especies registros nacionales de variedades con procedimientos y exigencias muy similares o idénticas a las de los cultivos agrícolas u hortícolas. Es el caso de **España** para los **frutales de hueso y pepita, vid, cítricos, olivo, higuera y fresa**. Son las denominadas Listas de Variedades Comerciales.

8.2.3. Posible evolución en la gestión de los catálogos comunes de la UE

La Comisión Europea, desde los años 70 hasta hoy, en cumplimiento de las directivas, es la autoridad de la UE competente y responsable de las tareas administrativas de preparación y publicación de los catálogos comunes. Realiza también una supervisión del trabajo de los Estados Miembros y revisa el correcto cumplimiento de lo establecido en las directivas de catálogos.

En la actualidad, en la UE, se está considerando y estudiando la posibilidad de encomendar a la OCW, que ya gestiona el sistema comunitario de protección de variedades vegetales, varias de las actuales competencias de la Comisión en los catálogos comunes de variedades.

Como antes se ha indicado, los Protocolos Técnicos para examen de la DHE, que ha preparado la OCW, se han adoptado y se siguen para comprobar la DHE en las variedades antes de inscribirlas en los registros nacionales. También las normas o reglas sobre denominaciones varietales que aplica la OCW se han hecho obligatorias en los procedimientos para los inscribir variedades en los registros nacionales, que luego pasan a los catálogos comunes de la UE.

Parece lógico aprovechar los medios y la experiencia de la OCW en actividades comunitarias muy similares. Con esta orientación se estudia la posibilidad de que la OCW se encargue de la gestión administrativa que ahora realiza la Comisión en la compilación, preparación y publicación de los catálogos comunes.

También se están considerando otras ideas que supondrían cambios más sustanciales en el sistema actual de los catálogos comunitarios. Hoy las únicas puertas de acceso para variedades a los catálogos comunes son los registros o listas nacionales de los, hoy 28, Estados Miembros de la UE.

Se está considerando la posibilidad de crear otra vía de entrada de variedades a los catálogos comunes. La idea es que hubiese la posibilidad, en paralelo y coexistiendo con la vía actual, de que se pudieran presentar solicitudes de inscripción en los catálogos comunes directamente a la OCW. En ese escenario, la OCW examinaría y tramitaría las solicitudes. Tras hacerse el obligatorio ensayo DHE, utilizando la red de Oficinas de examen acreditadas, si se cumplían todas las exigencias (administrativas y técnicas) de las directivas, la OCW decidiría la inscripción directa de las variedades en el catálogo común correspondiente.

Llegar a una situación con los cambios antes descritos exigirá modificaciones en las directivas de catálogo. Aun no es posible hacer una previsión de la evolución y el resultado de estas discusiones y el calendario de los trabajos.

La discusión, aprobación y puesta en marcha del sistema comunitario de protección de las obtenciones vegetales, etapa culminada en 1994, exigió a los Estados Miembros tomar decisiones, que podrían considerarse de mayor trascendencia que las que ahora se discuten para los catálogos comunes. Como más adelante se comentará en detalle, la experiencia de funcionamiento desde 1994 del sistema comunitario de protección de obtenciones vegetales y de la OCVW es francamente positiva.

La ampliación de competencias a la OCVW, que se vislumbra en la línea antes descrita, entra dentro de un lógico desarrollo que en algún momento en el pasado alguien ya imaginó. Se comenta que quien sugirió el nombre para la oficina al inicio de los 90, no propuso oficina comunitaria de protección de variedades, lo que parece que limitaba su competencia a la protección. Se propuso y se aceptó la posibilidad que la OCVW admitiera otros cometidos, como la misma denominación de la oficina ya sugerida: Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales.

8.3. Registros de Variedades Comerciales en España

En el caso de España se han transpuesto y desarrollado las exigencias de las Directivas comunitarias sobre catálogos de variedades en los Reglamentos Técnicos de Inscripción de variedades en los Registros de Variedades Comerciales o listas nacionales en el lenguaje comunitario. Estos Reglamentos Técnicos de Inscripción se aprobaron y figuran como anexos del Reglamento General del Registro de Variedades Comerciales que desarrolló la Ley 30/2006, de 26 de julio, de Semillas y Plantas de Vivero y de Recursos Fitogenéticos en los aspectos del registro de variedades.

Los Reglamentos Técnicos de Inscripción en vigor en España son los siguientes:

- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **cereales**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **remolacha azucarera y forrajera**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **maíz y sorgo**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de especies **forrajeras, prateses, cespitosas y leguminosas de grano**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **oleaginosas y textiles**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **patata**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de especies **hortícolas**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **vid**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de especies **frutales de hueso y pepita**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de especies de **cítricos**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **olivo**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **fresa**.
- Reglamento Técnico de inscripción de variedades de **higuera**.

Cada uno de estos reglamentos técnicos de inscripción detalla minuciosamente, para cada especie o grupo de especies:

- a. Los procedimientos de solicitud de inscripción para las variedades, examen formal y examen de fondo de las solicitudes, tramitación de las solicitudes, publicación de solicitudes.
- b. **Examen técnico DHE** de las variedades candidatos, protocolos de examen (material vegetal preciso para examen, diseño del ensayo, caracteres a observar, duración del ensayo, criterios para estudiar la DHE, informe técnico final).
- c. **Ensayos de valor agronómico** (según especies).
- d. Normas especiales para ensayo de variedades modificadas genéticamente.
- e. **Procedimiento administrativo** aplicable a los expedientes de inscripción en las listas de variedades comerciales.
- f. **Comisiones Nacionales de Evaluación de Variedades**, composición, funciones.
- g. **Inscripción provisional e inscripción definitiva** de variedades en el Registro de Variedades Comerciales (RVC).
- h. Duración de la inscripción y posible renovación de inscripción.
- i. **Cancelación** de la inscripción.
- j. **Denominaciones** varietales: Requisitos, procedimiento, aprobación, registro.
- k. **Tasas**.

En España el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y en concreto la **Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV)** administra y gestiona los Registros de Variedades Comerciales.

El Registro de Variedades Comerciales esta operativo en España para especies pertenecientes a los grupos: cereales, maíz, sorgo, remolacha (azucarera y forrajera), forrajeras, pratenses, cespitosas, leguminosas de grano, oleaginosas y textiles, patata, hortícolas, frutales de hueso y pepita, cítricos, vid, olivo, higuera y fresa.

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente publica el **Boletín del Registro de Variedades Comerciales** en el que facilita información sobre cambios en los Registros y cumple así también la obligación impuesta por las Directivas de la UE sobre catálogos de plantas agrícolas y hortícolas. Como se ha comentado anteriormente los Estados Miembros deben intercambiar información sobre los cambios (solicitudes de inscripción) y las decisiones (inclusiones, exclusiones de variedades, inscripciones provisionales, propuestas de denominaciones, aprobación de denominaciones varietales, etc.).

La publicación de periodicidad bimestral está disponible en la página web del Ministerio (www.magrama.es). Anualmente se compila otra publicación denominada **Catálogo nacional de variedades comerciales**. En esta publicación puede verse que España mantiene operativos 125 Registros de Variedades Comerciales para: Cultivos extensivos (44 especies); Hortícolas (51 especies); Frutales de hueso y pepita (13 especies o géneros y sus híbridos, incluye patrones); Cítricos (12 especies o géneros y sus híbridos, incluye patrones); Otros frutales (5: fresa, higuera, olivo, patrones de vid y vid).

El Ministerio también publica el **Boletín del Registro de Variedades Protegidas** en que facilita información sobre el sistema nacional español de protección de los derechos del obtentor. La relevante información cubre: solicitudes de Título de Obtención Vegetal recibidas, denominaciones (propuestas, aprobadas), retirada de solicitudes, cambios de solicitante, cambios de titularidad, cambios de representante, licencias de explotación concedidas, títulos de protección (otorgados por el sistema español de POV) que están en vigor.

8.4. La protección de los derechos del obtentor en la Unión Europea

¿Por qué se ha llegado a un **sistema de protección comunitaria de variedades vegetales**? Como ya se ha comentado antes, la CEE tuvo, desde su inicio, entre sus objetivos prioritarios, lograr un "mercado único" con libre movimiento de personas y mercancías. En 1985 se analizó, por la Comisión de la CEE, la situación existente en muchos sectores. El sector de las semillas y material vegetal fue incluido en ese detallado examen. Se vio que con los registros de variedades nacionales, armonizados de acuerdo con las directivas en vigor, y los catálogos comunitarios de variedades en operación, se facilitaba suficientemente el comercio en el sector. Las directivas existentes que armonizaban las normas de control de la producción de semillas y plantas en todos los Estados Miembros de la CEE también facilitaban los intercambios de estos materiales esenciales para la agricultura comunitaria. Lógicamente se vio también que era preciso mejorar la situación y actualizarla en algunas especies. Algunas directivas, en esa época en vigor, se habían aprobado en los 60 y 70. En los casos necesarios fueron debidamente revisadas y actualizadas.

Con el análisis también se detectó una situación que dificultaba la libre circulación de semillas y plantas. El problema estaba en la situación existente en la protección de los derechos del obtentor de variedades vegetales. En el escenario entonces existente en la CEE, de no suficiente armonización de los sistemas nacionales de protección de los derechos del obtentor o incluso de ausencia de protección en algunos estados, se producía una fragmentación del mercado y no había una completa y libre circulación de mercancías en este sector.

En los años 80 se vio que, si bien una mayoría de Estados Miembros tenía leyes de protección en vigor, algunos estados no las tenían. Las leyes de protección de los estados que las tenían, eran todas conformes a las normas de la Unión Inter-

nacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), pero no estaban suficientemente armonizadas. El sistema de UPOV fija unos mínimos obligatorios, pero permite cierta libertad que había hecho posibles faltas de armonización. Por ejemplo, había especies cuyas variedades eran protegibles en unos estados y en otros no. La duración de la protección para una especie concreta no estaba totalmente armonizada, variaba según los estados.

La situación de falta de armonización existente hacía posible que se dieran situaciones, como la de una misma variedad que podía estar protegida en unos estados y no en otros. En ese caso, podría transportarse, cruzando fronteras interiores de la CEE, material de esa variedad (semilla o material de multiplicación), producido en un país A en que no estaba protegida esa variedad, a otro B en que sí lo estaba. En esa situación al pasar la frontera, el titular del derecho sobre la variedad protegida en el país B podría, en ejercicio de sus derechos, bloquear la entrada de la mercancía. Esta situación y otras similares no permitían, dificultaban o podían dificultar la libre circulación deseada y necesaria en el "mercado único". Esta situación resultaba inadmisibles en el "mercado interior único" tal como se había previsto para la CEE desde enero de 1993 con la abolición real de las fronteras interiores (Tratado de Ámsterdam-Acuerdo de Schengen) desde 1997.

Identificado el problema y sus causas se buscaron soluciones. Consideradas varias alternativas se concluyó que la más adecuada era establecer un sistema comunitario de protección de los derechos del obtentor aprobado mediante un Reglamento del Consejo de la CEE. Reglamento, que una vez aprobado y en vigor, es de aplicación directa en todo el territorio de los Estados Miembros de la CEE, sin necesidad de trasposición a las legislaciones nacionales.

Tras varios años de preparación y discusiones, no exentas de dificultades, debido a lo complejo, delicado y trascendental de la materia que se trataba, se aprobó por el Consejo de la CEE el 27/07/1994 el Reglamento R (CE) 2100/94 que estableció el sistema de protección comunitaria de las obtenciones vegetales (Diario Oficial de las Comunidades Europeas N^o L 227 de 01.09.1994 pag.1 a 30).

8.4.1. Características del sistema de protección comunitaria de obtenciones vegetales

El sistema comunitario otorga una protección de cultivares (modalidad de derecho de propiedad intelectual) con cobertura y efectos uniformes en todo el territorio de todos los Estados Miembros de la CEE, hoy UE. Según establece el Reglamento 2100/94 antes citado, el sistema de protección comunitaria de obtenciones vegetales es la única y exclusiva forma de protección comunitaria de la propiedad industrial para las variedades vegetales.

De acuerdo con las normas de la UE, cuando se produce la adhesión de nuevos Estados a la Unión, los efectos de la protección comunitaria se extienden automáticamente a esos nuevos miembros. En la actualidad, marzo 2014, la UE integra a 28 Estados Miembros, con más de 507 millones de consumidores.

Para administrar y gestionar el sistema de protección comunitario se creó **la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV)**. Es un organismo comunitario especializado, con personalidad jurídica propia y autonomía presupuestaria. Su funcionamiento tutelado por la Comisión, está controlado y fiscalizado por el Tribunal de Cuentas de la UE. La OCVV inició su actividad el 27 de abril de 1995 en Bruselas y desde Agosto de 1997 tiene su **sede en Angers (Francia)**.

El sistema de protección comunitario cumple los requisitos fijados en el marco del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales de 19.03.1991 de la UPOV. La UE, como organización intergubernamental, forma parte de la UPOV desde el 29.07.2005.

Las **características más importantes del sistema comunitario de POV** se pueden resumir como sigue, indicando como referencia el artículo del Reglamento de base (Reglamento (CE) N°2100/94 del Consejo de 27.07.1994) en que se trata el aspecto señalado en cada uno de los párrafos siguientes:

- El sistema de protección comunitaria de obtenciones vegetales es la única y exclusiva forma de protección comunitaria de la propiedad industrial para las variedades vegetales (Art.1)
- Una variedad para poder protegerse ha de cumplir los requisitos de: Novedad, Distinción, Homogeneidad y Estabilidad. Han de tener una Denominación adecuada y se deben haber satisfecho las tasas establecidas (Art.6; 7; 8; 9 y 10)
- La duración de la protección es de 25 años y de 30 para variedades de patata y árboles y vid (Art.19)
- Esta prevista una protección provisional que cubre el periodo que va desde la publicación de la solicitud (Boletín de la OCVV) hasta la fecha de concesión del derecho (Art.95)
- La posibilidad de proteger está abierta a variedades de todos los géneros y especies botánicos (Art.5)
- Derechos del titular de la protección comunitaria (Art.13) La protección comunitaria de las obtenciones vegetales tiene el efecto de reservar al titular el derecho el llevar a cabo respecto de la variedad las operaciones siguientes:
 1. Con componentes de la variedad o material cosechado de la variedad en cuestión: a) producción o reproducción (multiplicación); b) acondicionamiento con vistas a la propagación; c) puesta en venta; d) venta u otro tipo de comercialización; e) exportación de la Comunidad; f) importación a la Comunidad; g) almacenamiento con vista a cualquiera de los objetivos anteriores.
 2. Lo dispuesto en el apartado anterior se aplicará al material cosechado sólo si éste se ha obtenido mediante el empleo no autorizado de componentes de la variedad protegida, y siempre y cuando el titular no haya te-

nido una oportunidad razonable para ejercer sus derechos sobre dichos componentes de la variedad.

- El Reglamento considera la posibilidad de que el Consejo de la UE pueda decidir en casos específicos, aunque hasta el momento no se ha hecho, que los derechos citados en el apartado 1 se apliquen también en relación con productos obtenidos directamente de material de la variedad protegida. Se trataría, por ejemplo de una mermelada de fresa confeccionada con frutos de una variedad protegida de fresa (Art.13-4º).
- Hay que tener en cuenta que no se trata de una extensión de la cobertura de la protección al material de cosecha en todos los casos. El titular del derecho sólo puede ejercer su derecho sobre el material de cosecha siempre y cuando él no haya tenido una oportunidad razonable para ejercer sus derechos sobre los componentes de la variedad.
- En el sistema comunitario de POV se extiende la protección a las variedades esencialmente derivadas de la variedad protegida (Art.13-5º). La noción y concepto de Variedad Esencialmente Derivada (VED) la introdujo el Convenio UPOV 1991. Se puede decir que aún hay poca experiencia y práctica de aplicación de este complejo y difícil concepto. Hay algunas sentencias de tribunales que tratan casos de VED o casos pretendidos. La limitación de espacio de este capítulo no permite desarrollar este concepto, su hasta ahora compleja aplicación y las consecuencias que pueden derivarse.
- Se admite en el sistema comunitario la llamada **excepción del agricultor** (Art.14) también llamada semilla de granja (*farm saved seed* o *semence de ferme*). Se trata de una excepción al derecho del obtentor que permite la utilización como semilla para siembra en la propia explotación del agricultor, de grano cosechado en la propia explotación del agricultor de una variedad protegida. La excepción en el sistema comunitario está sólo permitida para variedades de una lista de especies (forrajeras, cereales, patata, oleaginosas y textiles) que se incluye en el artículo 14. Las condiciones para poder hacer uso de esta excepción se detallan en este artículo y en un Reglamento de desarrollo específico (Reglamento CE N°1768/95 de la Comisión de 24.07.1995). Conviene tener en cuenta que si se abusa de esta excepción del agricultor, se pueden causar daños a la aplicación del sistema. Puede llegarse casi a vaciar de contenido el derecho de protección otorgado a variedades de esas especies en que es legalmente posible hacer uso de la excepción.
- La excepción del agricultor sólo es aplicable a variedades protegidas pertenecientes a las 21 especies de la lista (forrajeras, cereales, patata, oleaginosas y textiles). Por lo tanto no es posible para otras especies: No se admite la excepción del agricultor para otras especies hortícolas (no incluidas en la lista citada), para frutales, para ornamentales, ni para forestales.

- Los titulares de derechos de protección comunitaria podrán explotar la variedad directamente y/o conceder licencias contractuales de explotación (Art.27).
- Licencias obligatorias: La OCVW previa petición puede conceder licencias obligatorias pero sólo cuando lo justifique el interés público. Hasta la fecha no se ha concedido ninguna (Art.29).
- El sistema comunitario define las posibles infracciones al derecho de protección (Art.94) pero para perseguir y lograr condenarlas remite a la aplicación subsidiaria de las leyes nacionales de los Estados Miembros y a los tribunales nacionales (Art.101). Los Estados Miembros han de considerar en sus legislaciones nacionales de POV o códigos penales los títulos de protección comunitarios como los títulos nacionales.
- En la OCVW hay una Sala de Recursos independiente que decide sobre los posibles recursos que se presenten contra decisiones de la OCVW (Art.45). Las decisiones de esta Sala son recurribles ante la Sala de Primera Instancia del Tribunal de Justicia de la UE en Luxemburgo.
- Todo el sistema comunitario de POV se ha de autofinanciar con un sistema de tasas que han de pagar los utilizadores del sistema: los obtentores que quieren recibir la protección comunitaria. La OCVW está sometida al control del Tribunal de Cuentas de la UE.

La Protección Comunitaria **coexiste** con los sistemas nacionales de Protección de las Obtenciones Vegetales de los Estados Miembros de la UE que lo tienen (Art.3).

En el Reglamento Comunitario hay un artículo que prohíbe la acumulación de las dos protecciones (nacional y comunitaria) para la misma variedad. Según el artículo 92: 1). Ninguna variedad que sea objeto de una protección comunitaria de obtención vegetal podrá ser objeto de una protección nacional de obtención vegetal ni de patente alguna para tal variedad. No surtirá efecto alguno ningún derecho que se conceda en contravención de esta disposición. 2). Si antes de la concesión de la protección comunitaria de obtención vegetal, el titular se hubiere beneficiado de otro derecho en el sentido del apartado 1 para la misma variedad, dicho titular no podrá invocar los derechos conferidos por tal protección mientras siga vigente para esa variedad la protección comunitaria de obtención vegetal.

Aclarando los efectos de esta prohibición: si para una variedad se tiene protección nacional, en uno o varios Estados Miembro de la UE; si posteriormente se consigue la protección comunitaria para esa misma variedad, no pueden ejercerse las protecciones nacionales. En estas circunstancias esas protecciones nacionales quedan inactivas o durmientes. Si posteriormente desaparece la protección comunitaria a petición de su titular, una vez caducada, se podrían ejercer los derechos de la/s protecciones nacionales durmientes si estuvieran aun en vigor.

8.4.2. La experiencia del sistema comunitario de protección de variedades vegetales

En la situación actual de marzo de 2014 los 28 miembros de la UE son: Alemania, Austria, Bélgica, Bulgaria, Chipre, Croacia, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Países Bajos, Polonia, Portugal, Reino Unido, Republica Checa, Rumanía y Suecia. Todos los Estados Miembros de la UE excepto 3 (Chipre, Grecia y Luxemburgo) tienen leyes nacionales de Protección de las Obtenciones Vegetales conforme a la UPOV (1978 o 1991).

En esta situación de coexistencia de la protección comunitaria y las nacionales, corresponde al obtentor, o propietario de los derechos sobre una variedad, decidir y elegir si desea tener la protección comunitaria (cobertura en los 28 Estados Miembros de la UE) o una o varias protecciones nacionales. Si necesitara protección en Chipre, Grecia o Luxemburgo, sólo podría conseguirse vía la protección comunitaria.

En la situación de coexistencia de los sistemas nacionales y comunitario de POV, si el obtentor decidiera utilizar los sistemas nacionales, deberá solicitar y tramitar las protecciones nacionales individualmente ante cada autoridad nacional. Solicitudes en el idioma de cada Estado, pago de tasas nacionales, tener un representante, seguir los procedimientos etc. Al final obtendría una/s protección/es nacionales válidas y cubriendo el territorio de cada Estado en el que haya solicitado la protección.

Una clara ventaja del sistema comunitario de Protección de la Obtenciones Vegetales (POV) se ve al poder conseguirse una protección en todo el territorio de la UE, con una única solicitud. La diferencia en el coste es evidente. Al inicio del sistema en 1995 se estudió y se estimó que si se necesitaba protección para una variedad en al menos tres Estados de la UE, ya era más económico utilizar el sistema comunitario.

La entrada en vigor del sistema comunitario de POV en 1995 supuso un voluminoso trasvase de solicitudes nacionales al sistema comunitario. Esa tendencia se ha incrementado con los años de funcionamiento.

El sistema comunitario está abierto para variedades de todos los géneros y especies botánicas. La OCW ha recibido solicitudes correspondientes a variedades de 1.670 taxones botánicos (a 31.12.2012).

Desde 1995 hasta 24.01.2014 la OCW ha recibido 48.250 solicitudes de protección comunitaria. Por grupos se reparten en: Ornamentales 57,78 %; Agrícolas (extensivos) 23,74 %; Hortícolas 12,45 %; Frutales 6,03 %.

Desde que inició su actividad en 1995, la OCW ha otorgado 36.265 títulos de protección comunitaria.

El sistema comunitario de POV está abierto a obtenciones de nacionales de la UE y del Espacio Económico Europeo, también a los obtentores (particulares o empresas) de los Estados Miembros de la UPOV. Pueden también presentar solicitudes de protección comunitaria los nacionales de estados con los que la UE haya establecido un convenio de reciprocidad en materia de POV. También aquellos estados que sean firmantes de algún tratado internacional que establezca la reciprocidad en estas materias. La OCW ha recibido el 78% de solicitudes provenientes de la UE y 22% de terceros países.

Estas cifras demuestran la aceptación que el sistema de protección comunitaria ha tenido en sus 19 años de actividad dentro y fuera de la UE. En la página web de la OCW (www.cpvo.europa.eu) se facilitan estadísticas de la actividad de la Oficina con frecuentes puestas al día.

La OCW y todo el sistema comunitario se autofinancia exclusivamente con las tasas que pagan los usuarios del sistema. Las cuantías de las tasas en marzo 2014 son: Tasa de solicitud: 650 €; Tasa examen DHE: cada ciclo de examen 1160 a 2500 € según especies; o 240€ si se utiliza un informe de examen DHE existente y aceptable para la OCW; Tasa anual de mantenimiento del derecho: 250 €. La OCW no recibe ninguna subvención ni pago del presupuesto de la UE, ni de los Estados Miembros. Hasta ahora ha logrado sin problemas autofinanciarse. Como no le está permitido ningún superávit ha necesitado en varias ocasiones aprobar disminuciones en la cuantía de las tasas.

Al objeto de reducir costes hay una estrategia que siguen muchos obtentores que al final desean conseguir la protección comunitaria. Para ello aprovechan la existencia de una tasa de examen reducida de 240 €, llamada "take-over" para casos en que en vez de realizarse el examen DHE completo por la OCW, se utiliza el informe técnico final de un ensayo DHE realizado por una Oficina de examen aceptada por la OCW, pero realizado por encargo de una oficina nacional de uno de los Estados Miembros de la UE.

En estos casos, el proceso es el siguiente: el obtentor 1.- Inicia el proceso presentando una solicitud de protección nacional o registro para un catálogo nacional de la variedad, en una oficina nacional de uno de los Estados Miembros de la UE que tengan abierta la protección o registro para esa especie. 2.- Sigue el procedimiento nacional en el que se iniciará el preceptivo examen técnico DHE. 3.- Seguidamente presenta la solicitud de protección a la OCW en la que indica que ya hay iniciado un procedimiento de protección o registro para la misma variedad en el Estado Miembro X. En estos casos la OCW solicita a la oficina nacional implicada que al finalizar el examen DHE le facilite copia del informe final. 4.- El obtentor solicitante ha de pagar la tasa de solicitud en la oficina nacional y las tasas de examen DHE nacionales. 5.- En la OCW habrá de pagar la tasa de solicitud y cuando esté finalizado el examen nacional DHE y se haya remitido a la OCW, deberá pagar la tasa especial (*take-over*) de 240 € para utilizar el informe DHE en el procedi-

miento de la OCW. La OCW decidirá conceder la protección o denegarla teniendo en cuenta el resultado del examen DHE nacional y las otras exigencias que indica la reglamentación.

Como las tasas de examen suelen ser más elevadas en el sistema de la OCW que en la mayoría de los sistemas nacionales, al solicitante le suele resultar más económico seguir esta estrategia. La OCW exige que el examen DHE se realice por una oficina debidamente acreditada en su red de oficinas de examen y siguiendo su protocolo de examen para la especie.

Para conseguir la protección comunitaria de una variedad, el **procedimiento** se inicia presentando una solicitud a la OCW, que estudia la solicitud; seguidamente se realiza un único examen técnico (comprobación DHE); finalmente si se cumple todo lo exigido en la legislación, la OCW otorga un **título de protección comunitaria** con efectos uniformes en todo el territorio de los Estados Miembros de la UE.

La **solicitud de protección** comunitaria se presenta en la OCW directamente enviándola por correo. También es posible presentarla en las oficinas nacionales de protección de los Estados Miembros de la UE. La solicitud y todo el procedimiento se puede hacer en cualquiera de las 23 lenguas oficiales de la UE. Todos los formularios que hay que cumplimentar para presentar la solicitud están disponibles y se pueden descargar en la página web de la Oficina: www.cpvo.europa.eu.

También es posible ahora presentar la solicitud de protección utilizando un sistema informático en línea en la página web de la OCW, posibilidad que ya está disponible para variedades de las especies más importantes.

En la documentación de solicitud hay que presentar una propuesta de denominación para la variedad. Hay que abonar la tasa correspondiente a la solicitud.

La Oficina estudia toda la documentación enviada y comprueba que se cumplen los requisitos fijados por el Reglamento. En esta fase del procedimiento son: derecho del solicitante a presentar la solicitud, novedad de la variedad, abono de tasa, etc. Si es preciso subsanar o completar la solicitud se requiere al solicitante para que lo haga. Si todo está conforme la Oficina asigna una fecha a la solicitud y publica los datos de la solicitud en el **Boletín Oficial de la OCW**, publicación bimensual disponible ya sólo en forma electrónica en línea en la página web antes citada. Se publica en las 23 lenguas oficiales de la UE. Este Boletín Oficial incluye:

- Solicitudes válidas recibidas.
- Denominaciones varietales propuestas.
- Solicitudes retiradas.
- Decisiones de la OCW.
- Cambios de solicitante, de titular del derecho, representantes.
- Variedades que han dejado de estar protegidas.
- Licencias obligatorias de explotación (hasta ahora no se publicó ninguna).

- Licencias contractuales de explotación.
- Recursos interpuestos.
- Fe de erratas.
- Información sobre la base de datos de clientes de la Oficina.
- Otras informaciones (pignoraciones, ejecución forzosa, confiscaciones).
- Información general: Tasas, Excepción del agricultor, decisiones del Consejo de Administración de la Oficina, Nuevos Protocolos Técnicos de examen DHE, Oficinas nacionales de examen, etc.

Se publica también el **Boletín S2** con la lista de las fechas límite para presentar solicitudes para las diferentes especies al objeto de que sean incluidas en la próxima campaña de exámenes DHE. Se incluye también para cada especie el material vegetal que ha de facilitar el solicitante para incluir la variedad en los exámenes técnicos DHE y la oficina de examen en la que hay que suministrarlo.

Abonada la tasa de examen y facilitado el material vegetal necesario se incluye la variedad en el examen técnico DHE.

La OCW administra y gestiona directamente todo el sistema comunitario de protección. Para un trabajo muy importante e imprescindible en el proceso de concesión de la protección, como es el examen técnico DHE de las variedades o ensayo de identificación, la OCW utiliza una red de **Oficinas de Examen** situadas, en su mayoría, en los Estados Miembros de la UE.

Los exámenes DHE en el sistema comunitario de la OCW: El Reglamento que creó el sistema comunitario de protección, permitía que se utilizaran para hacer los exámenes DHE instituciones especializadas (oficinas de examen) existentes en los Estados Miembros o bien que la OCW organizara para hacerlos sus propias oficinas de examen integradas en la propia estructura. Desde el principio en 1994-95 se tomó una muy acertada decisión: utilizar los medios ya disponibles en los Estados Miembros.

La experiencia de casi 20 años de funcionamiento del sistema ha confirmado el acierto de aquella decisión inicial. Y podemos destacar algunos aspectos:

a.-La utilización de las instituciones de examen DHE inicialmente existentes, facilitó mucho la aceptación del sistema comunitario por los Estados Miembros, pues vieron que el personal e instalaciones altamente especializado de que disponían entonces, tendría una continuidad de carga de trabajo. Se aseguraba una vía de financiación de esas instituciones nacionales ya que la OCW abonaría a las oficinas de examen los trabajos de comprobación de la DHE. Esta política evitó tener que pasar por difíciles situaciones por posibles dismantelamientos de organismos existentes que habrían quedado sin trabajo al trasvasarse muchas solicitudes de las protecciones nacionales al nuevo sistema comunitario. A la vez se aprovechó la experiencia y medios humanos y materiales especializados existentes e inmediatamente disponibles.

b.–La OCW con la colaboración de los Estados Miembros logró repartir el trabajo de los ensayos DHE entre las oficinas de examen existentes que ofrecieron sus servicios. Se consiguió una especialización de los diferentes centros aprovechando sus medios, experiencia y localización geográfica. Se estableció rápidamente una red de Oficinas de Examen que lograron cubrir suficientemente las necesidades de exámenes DHE para la OCW. Con ocasión del acceso de nuevos Estados a la UE se ha ido ampliando la red de oficinas de examen.

c.–Teniendo en cuenta la trascendencia de los resultados de los exámenes DHE en un sistema de protección, la OCW ha desarrollado una metodología para asegurar lo más posible la excelencia y seguridad de los resultados. Y todo a costes aceptables por el sistema.

Para lograr los objetivos deseados la OCW ha desarrollado las siguientes líneas:

i.–**Protocolos Técnicos** para ejecutar los exámenes DHE en las diferentes especies. En ellos se establece y detalla: el diseño del ensayo, material vegetal a utilizar, lista de caracteres a observar y a describir, modo y método de realizar las observaciones, colecciones de referencia a utilizar, criterios para efectuar la comprobación de la DHE.

ii.–Condiciones que deben reunir las **Oficinas de Examen** para ser admitidas en la red de la OCW. Medios humanos y materiales. Experiencia contrastada. Independencia de su personal.

iii.–Sistema armonizado de **cálculo de costes** de los exámenes DHE. Aspecto muy importante ya que la OCW abona a las Oficinas de examen los gastos de realización de los ensayos. Costes a tener en cuenta en la preparación del Presupuesto anual de la Oficina y en el cálculo de las tasas a pagar por los usuarios del sistema comunitario. Aproximadamente el 50% del presupuesto anual de la OCW se destina a pagar los ensayos DHE a las Oficinas de examen.

iv.–**Sistema de acreditación** para las Oficinas de examen que incluye una auditoría de calidad. La acreditación se inicia con un exhaustivo examen de las oficinas de examen candidatas a ser admitidas en el sistema. Una vez admitidas a trabajar en la red de la OCW han de pasar periódicas **auditorías de calidad** y también en caso de surgir algún problema.

La red de Oficinas de Examen que actualmente colaboran con la OCW cubre las necesidades de exámenes DHE precisos para el funcionamiento el sistema comunitario que recibió en 2013 un total de 3.297 solicitudes de protección. La casi totalidad de las oficinas de examen acreditadas están situadas en el territorio de los Estados Miembros de la UE. Sólo para reducido número de especies se ha recurrido a realizar los exámenes fuera de la UE, pero siguiendo las mismas exigencias de admisión y en oficinas de examen sometidas al mismo control.

Las exigencias y obligaciones que han de cumplir las Oficinas de Examen para trabajar en el sistema de la OCW pueden verse en su página web (www.cpvo.eu) en la parte que facilita detalles del examen DHE. Ver el documento denominado requisitos para acreditación (*Entrustment requirement*). Además se puede consultar la lista de Oficinas de Examen acreditadas para cada especie.

Finalizado el examen DHE, si se ha confirmado que la variedad es distinta, homogénea y estable, se han cumplido todas las otras exigencias del reglamento (denominación adecuada, novedad, pago de tasas), la OCW estudia todo el expediente y decide la concesión del título comunitario. Las decisiones de la OCW son recurribles ante la Sala de Recursos.

Se publica en el Boletín de la OCW la concesión de la protección y concluye el expediente. La variedad sigue protegida sus 25 o 30 años, según especies, salvo que surja algún problema. Transcurrido este plazo la protección finaliza.

Vistos los casi 20 años (1995-2014) de funcionamiento del sistema comunitario de protección de obtenciones vegetales puede concluirse que ha sido aceptado por los diferentes sectores privados con intereses en la agricultura, las autoridades de los Estados Miembros de la UE y las instituciones comunitarias.

El sistema proporciona una protección eficiente, por supuesto mejorable especialmente en el aspecto de aplicación y ejercicio del derecho. La OCW trabaja en todas las lenguas oficiales de la UE lo que facilita mucho el acceso a los ciudadanos de toda la UE. El coste de operación del sistema es asumible para los utilizadores que lo financian mediante las tasas. El sistema es eficiente y orientado a dar servicio a sus clientes.

8.4.3. Enlaces y sitios web (consultados 03.2014)

Ministerio AGRICULTURA ALIMENTACION Y MEDIO AMBIENTE - ESPAÑA

Legislación española:

<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/legislacion/Legislacion-nacional-semillas.aspx>

Legislación Comunitaria:

<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/legislacion/Legislacion-comunitaria-semillas.aspx>

UNION EUROPEA (en inglés)

Comisión Europea:

Plantas: Semillas y material vegetal (Seed & propagation material)

Protección variedades vegetales (Plant property rights):

http://ec.europa.eu/food/plant/index_en.htm

Semillas y material de propagación: Normas de la Unión Europea:

http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/index_en.htm

Catálogos de Variedades de plantas y bases de datos:

http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/index_en.htm

Catálogos comunitarios: Especies de plantas **agrícolas** (gran cultivo):

<http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/database/public/index.cfm?event=SearchForm&cat=A>

Catálogos comunitarios de especies **hortícolas**:

<http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/database/public/index.cfm?event=SearchForm&cat=H>

Oficina Comunitaria Variedades Vegetales (OCVV o CPVO):

<http://www.cpvo.fr/main/es/>

Disponible en 22 idiomas oficiales de la Unión Europea. Hay algunas partes que están solo en inglés.

Legislación Protección Obtenciones Vegetales de la U.E. vigente: En todas las lenguas oficiales.

<http://www.cpvo.fr/main/es/pagina-de-inicio/derechos-de-obtencion/legislacion-vigente>

Formularios para trámites ante la OCVV en línea: En todas las lenguas oficiales.

<http://www.cpvo.fr/main/es/pagina-de-inicio/presentacion-de-solicitud/formularios-en-linea>

Examen técnico DHE. Protocolos de examen:

<http://www.cpvo.fr/main/es/pagina-de-inicio/examenes-tecnicos/protocolos-tecnicos>

Oficinas de Examen acreditadas para hacer examen DHE para la OCVV:

<http://www.cpvo.fr/main/es/pagina-de-inicio/examenes-tecnicos/lista-de-oficinas-de-examen-acreditadas-s3>

Tasas de la OCVV:

<http://www.cpvo.fr/main/es/pagina-de-inicio/pago/tasas-aplicables>

Solicitudes recibidas y Derechos en vigor (bases de datos disponibles en línea):

<http://www.cpvo.fr/main/es/pagina-de-inicio/bases-de-datos/solicitudes-y-derechos-concedidos>

Buscador de variedades (Variety Finder) de la OCVV-acceso libre:

<http://www.cpvo.fr/main/es/pagina-de-inicio/bases-de-datos/cpvo-variety-finder>

Base de datos sobre Jurisprudencia en materias de POV:

<http://cpvoextranet.cpvo.europa.eu/WD170AWP/WD170AWP.exe/CONNECT/PVRCasLaw>

UPOV: UNION INTERNACIONAL PARA LA PROTECCION DE LAS OBTENCIONES VEGETALES

Portal UPOV (Disponible en Español-Ingles-Francés-Alemán).

<http://www.upov.int/portal/index.html.es>

Textos legales: Convenio UPOV:

http://www.upov.int/upovlex/es/upov_convention.html

Legislaciones nacionales de Protección de los Estados Miembros de UPOV:

<http://www.upov.int/upovlex/es/>

Información sobre el sistema UPOV de Examen DHE:

http://www.upov.int/resource/es/dus_guidance.html

Directrices para el examen DHE:

http://www.upov.int/test_guidelines/es/

Lista de las 297 Directrices de examen disponibles (25.03.2014):

http://www.upov.int/test_guidelines/es/list.jsp

