

Genotipo y fenotipo. Exploración de la caja negra de los mejoradores...

Phenotype and Genotype.
Exploring the Breeder's Black Box...



Alain Rival, PhD

Coordinador para la Investigación
en Palma de Aceite, Cirad (Francia)
alain.rival@cirad.fr

**Tristan Durand-
Gasselín, PhD**

Director de Ciencias PalmElit SAS
(Francia)
tristan.durand-gasselín@palmelit.com

Palabras CLAVE

Genotipo, fenotipo, medio ambiente,
material genético, Mejoramiento
Asistido por Marcadores.

Environment, genetic material,
genotype, Marker Assisted Breeding,
phenotype.

Traducido por Fedepalma

Versión original en inglés
en el Centro de Información
de Fedepalma



Resumen

La herencia de los organismos vivos se puede establecer con la distinción entre el genotipo y el fenotipo, por ello descifrar esto es esencial para el mejoramiento: la búsqueda de ideotipos (o fenotipos perfectamente adaptados) y en esta regla entra el análisis de la palma de aceite. Tanto el clima como las actividades humanas interactúan con la información contenida en el material genético para generar fenotipos. Establecer el contenido genético de las palmas es muy complejo por las diversas variables que se deben tener en cuenta y pese a largos años de investigación poco se sabe con precisión. Sin embargo, gracias a los procesos de investigación y de progreso en el conocimiento de estos fenómenos se han registrado importantes avances, tanto en la estructura del genoma como en el mecanismo de expresión de los genes y han allanado el camino hacia el Mejoramiento Asistido por Marcadores.

Para una mejor comprensión de estos aspectos se deben definir los términos de genotipo, fenotipo y medio ambiente. El genotipo para los organismos, plantas clonales o animales que se reproducen asexualmente, el material heredado es una copia directa del ADN de su progenitor. El fenotipo se determina por la descripción de las características físicas y de comportamiento del organismo, por ejemplo su tamaño, forma, color o sus

actividades metabólicas y el medio ambiente no es solo el mundo exterior, sino también al ambiente celular y subcelular.

Estos tres conceptos interactúan entre sí e inciden, como por ejemplo, un cambio en el medio ambiente puede afectar el fenotipo, de ahí que el mejorador trabaja con los fenotipos y hace inferencias acerca de los genotipos, mediante los datos estadísticos y la bioinformática.

Abstract

Heredity of living organisms can be established with the distinction between genotype and phenotype. Hence, deciphering this is essential for breeding: the search for ideotypes (or perfectly fit phenotypes), and this rule includes the analysis of oil palm. Both climate and human activities interact with information contained in the genetic material to generate phenotypes. Determining the genetic content of oil palms is very complex due to the different variables that should be taken into account, and despite many years of research, little is known with accuracy. However, thanks to the processes of research and progress in the knowledge of these phenomena, important advances in both the structure of the genome and the mechanism of expression of genes have been made, paving the way for Marker Assisted Breeding.

For a better understanding of these aspects, the terms genotype, phenotype and environment should be defined. The genotype for asexually reproducing organisms, clonal plants or animals, the inherited material is a direct copy of the DNA of its parent. The phenotype is determined by the description of the physical and behavioral characteristics of the organism, for example its size, shape, color or metabolic activities; and the environment is not only the outside world, but also the cellular and sub-cellular environment

These three concepts interact and influence each other, for example, a change in the environment can affect the phenotype; hence, the breeder works with phenotypes and makes inferences about genotypes, using statistics and bioinformatics.



Introducción

La distinción entre el genotipo y el fenotipo es fundamental para comprender la herencia y el desarrollo de los organismos vivos. Así pues, está claro que descifrar esta compleja relación es crucial para el mejoramiento genético: la búsqueda de ideotipos (o fenotipos perfectamente adaptados).

La palma de aceite no es una excepción a esta regla, aunque las estrategias de mejoramiento para esta especie tendrán que ocuparse del largo ciclo de selección y el número limitado de genotipos por generación debido al volumen de la planta y su naturaleza perenne.

En un contexto de cambios globales que afectan el medio ambiente de las plantas, no solo el clima sino también las actividades humanas (como las prácticas culturales y los distintos tipos de manejo de los sistemas agroecológicos) están interactuando con la información contenida en el material genético para generar fenotipos.

La mayoría de los caracteres agronómicos que los mejoradores de palma de aceite están tratando de mejorar son muy complejos, ya que combinan los productos de la expresión de los genes procedentes de muchas



familias multigénicas, cuya expresión está modulada por interacciones y redes de genes en su mayor parte desconocidas.

Intentar conectar el comportamiento en campo y el contenido genético de las palmas es como abrir una caja negra. De hecho, a pesar de décadas de intenso trabajo en todo el mundo y un importante progreso genético del 1% por año en promedio, muy poco se sabe acerca de la base genética de muchos caracteres críticos.

Las biotecnologías y, en particular la genómica, han posibilitado grandes progresos en los últimos años al tiempo que reducen las diferencias entre las especies modelo y las de cultivo. Los avances en el conocimiento, tanto de la estructura del genoma como del mecanismo de expresión de los genes de suma importancia para los caracteres agronómicos, están allanando el camino para el Mejoramiento Asistido por Marcadores.

Definiciones útiles

El *genotipo* se determina por la descripción del material físico real conformado por el ADN que los padres pasan a un organismo. Para los organismos que se reproducen sexualmente, esa materia física consiste en el ADN aportado por dos progenitores al huevo fertilizado. Para los organismos, plantas clonales o animales que se reproducen asexualmente, el material heredado es una copia directa del ADN de su progenitor.

El *fenotipo* se determina por la descripción de las características físicas y de comportamiento del organismo, por ejemplo su tamaño, forma, color o sus actividades metabólicas. Está conformado por todas las características o caracteres exteriores observables de un organismo. Un fenotipo se debe típicamente a la influencia de diversas interacciones entre los genes y el medio ambiente.

El *medio ambiente* no es solo el mundo exterior, sino también al ambiente celular y subcelular, que incluye plazos e interacciones entre hormonas, genes, células, factores de transcripción y otros componentes biológicos.

Fenotipo = genotipo x medio ambiente

Un cambio en el medio ambiente puede afectar el fenotipo. De hecho, aunque con frecuencia se piensa que los flamings son rosados (Figura 1), este color no está codificado en su genotipo. Los alimentos que consumen hacen que su fenotipo sea blanco o rosado.

El mejorador trabaja con los *fenotipos* y hace inferencias acerca de los genotipos, mediante los datos estadísticos y la bioinformática.

Para hacer las cosas aún más complejas, los caracteres agronómicos se rigen por un número variable de factores genéticos: uno, dos o más... La importancia relativa de cada factor para la determinación del fenotipo es variable. El mejorador inteligente también debe tratar con los efectos aditivos o efectos dominantes de los individuos y los distintos patrones de heredabilidad para un carácter determinado, al tiempo que explota los modelos genéticos cuantitativos. También tiene en cuenta las interacciones entre los factores (pleiotropismo, epistasia, ligamiento, asociación) (Figura 2).

Como resultado, lo que usted ve no es lo que usted obtiene. De hecho, el fenotipo es un predictor imperfecto del genotipo: posiblemente no es observable antes que deba realizarse la selección de tiempo. El fenotipo de una planta es siempre la expresión de su genotipo, pero con una influencia relativamente fuerte del medio ambiente. Además, el fenotipo no es eficaz para resolver las asociaciones negativas entre los genes (ligamiento, epistasia).



Figura 1. Flamings rosados: efecto del medio ambiente en el fenotipo. (Foto de la izquierda el flamingo es rosado, foto de la derecha el flamingo es blanco).

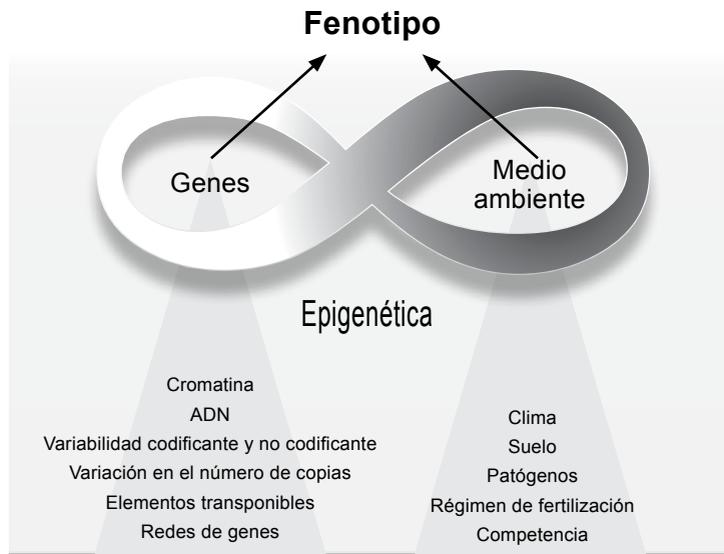


Figura 2. Representación esquemática de las interacciones entre los genes de las plantas y el medio ambiente para generar el fenotipo.

Definición de ideotipos: mejoradores frente a vaqueros

Un ideotipo es un modelo biológico que se espera funcione o se comporte de una manera prevista dentro de un medio ambiente definido.

Grabado en la lápida de la tumba de Russell J. Larsen en Logan, Utah (Estados Unidos), se puede leer la siguiente inscripción:

"Pasé toda mi vida siguiendo cinco reglas:

1. Escoge una mujer que cocine, limpie y tenga un buen empleo.
2. Escoge una mujer que te haga reír.
3. Escoge una mujer en la que puedas confiar y que no te mienta.
4. Escoge una mujer que le guste estar contigo en muchos lugares diferentes y...
5. Estas cuatro mujeres no se conocen entre sí, de lo contrario... ¡podrías terminar muerto como yo!"

Intentar combinar varios caracteres favorables en un solo individuo o población puede ser muy peligroso para un vaquero (¡y tal vez incluso para un hombre moderno!).

Por fortuna, los mejoradores no son vaqueros. Ellos se pasan la vida buscando ideotipos, intentando así construir una pirámide de genes

de interés en un solo genotipo para un medio ambiente determinado.

La definición de ideotipos es una ayuda para la selección de caracteres múltiples de palmas superiores para el desarrollo de cultivares. Para el mejoramiento de la palma de aceite, este es un trabajo complejo y de largo plazo, que necesita unir esfuerzos de los distintos campos de la ciencia: no solo la genética, sino también la agronomía, la tecnología y las ciencias sociales. ¿Cómo puede la planta ideal parecer igual para las agroindustrias, los pequeños propietarios, los procesadores, los comerciantes o los industriales?

El mejoramiento de la palma de aceite se basa en caracteres cuantitativos complejos

Los cuatro grandes caracteres prioritarios para los mejoradores de palma de aceite son: alto rendimiento de aceite, estatura enana, resistencia a enfermedades y aceite alto oleico (Soh *et al.*, 2010). De hecho, los criterios de selección de la palma de aceite se basan en caracteres (muy) complejos.

Por ejemplo, el rendimiento de aceite resulta de la combinación de cinco componentes diferentes: (peso del racimo) x (número de



racimos) x (% frutos/racimo) x (% pulpa/fruto) x (% aceite/pulpa). Cada uno de estos factores tiene su propia heredabilidad y puede interactuar o ser independiente.

Con un poco de ayuda de mis amigos (biotecnólogos)

Un marcador molecular es una secuencia de ADN que puede detectarse fácilmente y cuya herencia puede monitorearse. Por ejemplo, para el mejoramiento en relación con la resistencia a patógenos, un buen marcador evita pruebas complejas de detección de infección para la selección de plantas resistentes, siempre y cuando tal resistencia esté sustentada por esta secuencia solamente.

Los marcadores de ADN permiten al mejorador introducir en sus plantas cultivadas solamente el gen o los genes de interés de una especie relacionada. De hecho, los métodos convencionales de mejoramiento se basan en la transferencia del genoma completo: como consecuencia, junto con el gen o los genes de interés, también se coheredan caracteres no deseables y estos tienen que eliminarse a través del retrocruzamiento seguido de la selección. Los marcadores de ADN permiten eliminar en pocas generaciones estas regiones “no deseadas” del genoma.

Una vez hecho esto, se debe comenzar una vez más la detección de nuevos marcadores. Los marcadores moleculares llevan al Mejoramiento Asistido por Marcadores.

Los marcadores moleculares ya están en funcionamiento en la ejecución de los programas de mejoramiento de palma de aceite. De hecho, las tecnologías de ADN (marcadores microsatelitales) se utilizan rutinariamente para la certificación de origen y la trazabilidad de los materiales de siembra (Billotte *et al.*, 2001; Cochard *et al.*, 2009). También se utilizan para el manejo optimizado de los recursos genéticos y la constitución de colecciones núcleo (Arias Moreno *et al.*, 2013). La certificación de los pedigris en los ensayos genéticos y jardines semilleros es de suma importancia para el control de calidad en la producción comercial de semillas: tales ope-

raciones se realizan actualmente con la ayuda de marcadores moleculares. Asimismo, la certificación del carácter Ténera en semillas se basa actualmente en un marcador de ADN estrechamente ligado al gen responsable del grosor del cuesco.

En las etapas iniciales de la producción de semillas, los mejoradores actualmente están mejorando la eficiencia en la selección de *E. guineensis* a través de la selección asistida por marcadores (SAM). En este esquema, la selección de los genitores es afinada y los fuera de tipo se pueden descartar en las primeras etapas, y así se evita la producción de semillas ilegítimas fuera de tipo desde el principio del proceso.

La mayoría de los caracteres de interés para el mejoramiento de palma de aceite son cuantitativos. Múltiples genes afectan la expresión del carácter y su expresión en la población es una curva “en forma de campana”: hay muchos genotipos y no hay diferencias fenotípicas claras entre ellos. Si se quieren encontrar marcadores de ADN que puedan ayudar a predecir este fenotipo, se están buscando varios loci genéticos simultáneamente. El análisis de loci de caracteres cuantitativos (QTL, por su sigla en inglés) es uno de los enfoques experimentales estándar para esto. En la palma de aceite, se están identificando QTL para algunos caracteres de interés agronómico, como las resistencias a patógenos (Marchitez vascular causada por *Fusarium*).

La revolución de la Secuenciación de Nueva Generación está afectando la manera en que la genómica y la tecnología del ADN se integran en los programas de mejoramiento. De hecho, la capacidad de secuenciación del ADN está creciendo exponencialmente en la medida en que los costos se dividen por dos cada año; por consiguiente, las diferencias entre las plantas modelo (*Arabidopsis*, tabaco) y las plantas de cultivos se están reduciendo muy rápidamente, con grandes beneficios que se esperan para los mejoradores de palma de aceite.

Nuevos actores con enormes capacidades de secuenciación están entrando en el juego para buscar recursos genéticos valiosos con el fin de aplicar las tecnologías de secuenciación.

Tabla 1. Efecto de la revolución de la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) en el mejoramiento de la palma de aceite.

Secuencia del genoma completo disponible	ahora
Transcriptómica y descubrimiento de genes	ahora
Selección genómica	en curso
Epigenómica	en curso

Al mismo tiempo, se requieren nuevas competencias en el punto de intersección entre las ciencias de la computación y las biotecnologías: la *bioinformática* es necesaria para ordenar, comparar y clasificar gran cantidad de datos generados por los programas de secuenciación.

Están surgiendo nuevos retos en términos de propiedad intelectual, ya que los datos genómicos que se generan principalmente en asociaciones público-privado y consorcios deben ponerse a libre disposición de todos los científicos (Tabla 1).

Epigenética

Lo escrito con tinta no se puede cambiar.

Eso es el ADN.

Pero las cosas escritas con lápiz sí. Eso es la epigenética.

Danielle Reed, Genetista

La información genética es codificada no solo por la secuencia lineal de ADN, sino también por las modificaciones epigenéticas de la estructura de la cromatina, que incluyen la metilación del ADN y las modificaciones covalentes de las proteínas que se unen al ADN. Estas marcas epigenéticas alteran la estructura de la cromatina para influir en la expresión génica. La metilación se produce naturalmente en las bases citosinas en secuencias CpG e interviene en el control de la expresión correcta de los genes. La metilación del ADN por lo general se asocia con el desencadenamiento de la desacetilación de histonas, la condensación de la cromatina y el silenciamiento de genes. Las citosinas diferencialmente metiladas dan lugar a patrones diferenciados específicos para cada tipo de tejido o etapa de desarrollo.

La variación fenotípica proporciona la materia prima para la selección, tanto en los entornos naturales como en los programas de mejoramiento artificial. Los alelos epigenéticos o epialelos presentan una diferente distribución de las marcas epigenéticas en su secuencia y pueden exhibir distintos fenotipos.

Existen muchos ejemplos bien descritos de cómo la variación epialélica puede contribuir a la regulación específica por gen y del genoma completo de desarrollo e interacción con el medio ambiente. El futuro del *epimejoramiento* reside en la manipulación del fenotipo del cultivo de una manera predecible al intervenir en el estado epialélico del material de mejoramiento, en particular en el nivel de las marcas de metilación del ADN.

La búsqueda de epialelos que se producen naturalmente y el entendimiento de los mecanismos que llevan a su aparición y mantenimiento, particularmente en respuesta a las señales ambientales, son un gran reto para el futuro. Se requiere más trabajo para lograr una mayor comprensión de los mecanismos para inducir y estabilizar las variaciones epigenéticas en los cultivos (Rival y Jaligot, 2011).

Variación somaclonal

La epigenética es el estudio de los cambios hereditarios en la función genética que se producen sin modificaciones en la secuencia de ADN. En los últimos años, esta área ha atraído mucha atención en la medida en que se han descubierto más controles epigenéticos de las actividades génicas. Estos controles implican una compleja interacción de la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y las vías mediadas por ácido ribonucleico (ARN) a partir de ARN no codificante. Aunque los procesos epigenéticos son esenciales para el desarrollo y la diferenciación, estos pueden desviarse como consecuencia de los cambios ambientales.

En las plantas, los fenómenos epigenéticos tienen importancia económica en el caso de la variación somaclonal: una variación genética y fenotípica entre plantas propagadas clonalmente a partir de un único genotipo donante.

En la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq), aproximadamente el 5% de las palmas



Figura 3. Fenotipo de palma de aceite alterado (*mantled*): izquierda, fruto severamente alterado; centro, fruto parcialmente alterado; derecha, fruto normal.

derivadas de embriones somáticos presentan anomalías en su desarrollo floral debido a la feminización de las partes masculinas en flores de ambos sexos. El desarrollo comercial del material clonal de palma de aceite se ve obstaculizado por la generación de variantes somaclonales que afectan la arquitectura floral: esto se denomina el genotipo alterado (*mantled*) (Figura 3).

La observación de campo de las siembras clonales en el largo plazo y los resultados del análisis de marcadores de ADN son coherentes con un origen epigenético para la variación somaclonal. El fenotipo alterado se correlaciona con una hipometilación global del ADN genómico que fue revelado a través de un enfoque de genoma completo y el uso de marcadores

de ADN sensibles a la metilación. El fenotipo variante alterado provee un modelo original ya que la variación somaclonal cambia la expresión de los genes que codifican –directa o indirectamente– la estructura de la flor, y la hipometilación del ADN ya ha sido claramente demostrada en las variantes somaclonales.

Los proyectos de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) recientemente iniciados están aportando nuevos conocimientos sobre el genoma y el transcriptoma de la palma de aceite para la identificación y caracterización de genes putativos objetivo con expresión alterada ligada a la variación somaclonal.

Lecciones aprendidas

La relación entre el genotipo (*lo que tus padres te dieron*) y el fenotipo (*cómo eres físicamente*) es compleja y controlada por el medio ambiente.

Tanto los mejoradores como los biólogos moleculares deben ocuparse de esta caja negra para generar ideotipos.

La investigación está progresando rápidamente (la genómica es un poderoso motor impulsor) y hay luz en la caja negra.

Mientras tanto, la cuidadosa observación en campo de los individuos simultáneamente con la identificación precisa del pedigrí genético sigue siendo la mejor manera de hacerlo.



Bibliografía

- Arias Moreno, D. M.; González González, M. Y.; Prada Chaparro, F.; Restrepo Salazar, E.; Romero, H. M. 2013. Morpho-agronomic and molecular characterization of natural oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) populations from Angola. *Tree Genetics & Genomes*, in press.
- Billotte, N.; Risterucci, A. M.; Barcelos, E.; Noyer, J. L.; Amblard, P.; Baurens, F. C. 2001. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome*, 44(3): 413-425.
- Cochard, B.; Adon, B.; Rekima, S.; Billotte, N.; Desmier de Chenon, R.; Koutou, A.; Nouy, B.; Omoré, A.; Purba, A. R.; Glazsmann, J. C.; Noyer, J. L. 2009. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 5(3), 493-504.
- Jaligot, E.; Adler, S.; Debladis, E.; Beulé, T.; Richaud, F.; Ilbert, P.; Finnegan, E. J.; Rival, A. 2011. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of oil palm. *Annals of Botany*, 108: 1453-1462.
- Rival, A.; Jaligot, E. 2010. Oil palm biotechnologies are definitely out of infancy. *Oleagineux, Corps gras, Lipides*, 17(6): 368-374.
- Rival, A.; Jaligot, E. 2011. Epigenetics and Plant Breeding. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6, (048).
- Soh, A. C.; Wong, C. K.; Ho, Y. W.; Choong, C. W. 2010. Oil palm. In: J. Vollmann, I. Rajcan (eds.), *Oil Crops, Handbook of Plant Breeding* 4, (Springer DOI 10.1007/978-0-387-77594-4_11).