

MEJORA GENÉTICA DE LA
REMOLACHA AZUCARERA



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la formación que sobre nosotros han realizado un elevado número de especialistas en la Genética y Mejora de la remolacha, entre los que queremos destacar a los Prof. N.O. Bosemark, R.J. Hecker, A. Silván y T. Tsuchiya.

Los trabajos de investigación originales realizados por los autores de esta publicación, se han llevado a cabo en el Departamento de Genética y Producción Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Queremos agradecer la participación en los mismos de los Drs. L. Cistué, A. Galán y P. Gracia, de los Titulados Técnicos B. Medina, C. Pérez-Peña y J.M. Sanz, así como del personal auxiliar.

Edita: AIMCRA
(Asociación de Investigación para la
Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera)

Apartado de Correos, 855
Valladolid
Tel.: (983) 20 47 77

I.S.B.N.: 84-604-2561-4

Depósito Legal: M-14499-1992

Diseño: Gloria García Requeno

INDICE

I EL GENERO <i>BETA</i>	9
II CITOGENETICA DE LA REMOLACHA AZUCARERA.....	13
1 CARIOTIPO BASICO.....	13
2 TRISOMICOS PRIMARIOS.....	24
3 POLIPLOIDIA Y ANEUPLOIDIA.....	29
3.1 Efectos generales.....	29
3.2 Propiedades citogenéticas de las remolachas poliploides....	32
3.3 Herencia en tetraploides.....	34
3.4 Respuesta a la selección en tetraploides.....	34
III DEFINICION VARIETAL	35
1 CARACTERES MORFOLOGICOS.....	35
1.1 Semillas.....	36
1.2 Raíces.....	36
1.3 Coronas.....	36
2 ANATOMICOS.....	36
3 FISIOLÓGICOS.....	37
4 QUÍMICOS.....	38
IV GENETICA DE CARACTERES CUALITATIVOS.....	39
1 HABITO DE CRECIMIENTO.....	40
2 MONOGERMIA.....	41
3 AUTOINCOMPATIBILIDAD POLEN-ESTILO.....	42
4 ANDROESTERILIDAD.....	43
4.1 Androesterilidad mendeliana.....	43
4.2 Androesterilidad citoplásmica.....	44
V GENETICA DE CARACTERES CUANTITATIVOS	47
1 PRODUCCION DE AZUCAR.....	47
2 CALIDAD TECNOLÓGICA.....	49
3 VIGOR DE NASCENCIA.....	52
4 RESISTENCIA A ENFERMEDADES.....	54

4.1 Cercospora.....	54
4.2 Amarillez.....	57
4.3 Rizomanía.....	59
5 RESISTENCIA A NEMATODOS.....	61
6 RESISTENCIA AL ESPIGADO.....	62
VI METODOS DE SELECCION.....	67
1 SELECCION MASAL.....	67
2 SELECCION GENEALOGICA.....	72
2.1 Selección de medios hermanos.....	72
2.2 Selección de hermanos completos.....	74
3 CONSANGUINIDAD.....	75
4 SELECCION RECURRENTE.....	78
VII TIPOS DE VARIEDADES.....	81
1 VARIEDADES SINTETICAS.....	83
1.1 Diploides sintéticos.....	83
1.2 Variedades anisoploides.....	84
2 VARIEDADES HIBRIDAS.....	85
2.1 Desarrollo de mantenedores.....	86
2.2 Evaluación de aptitud combinatoria.....	88
2.3 Tipos de híbridos.....	89
VIII BIOTECNOLOGIA Y MEJORA DE REMOLACHA AZUCARERA.....	97
1 INTRODUCCION.....	97
2 CULTIVOS CELULARES.....	98
2.1 Fundamento.....	98
2.2 Aplicaciones de los cultivos <i>in vitro</i>	98
3 INGENIERIA GENETICA.....	102
3.1 Fundamento.....	102
3.2 Aplicaciones de la Ingeniería Genética.....	105
4 INMUNOENSAYOS Y MARCADORES MOLECULARES.....	109
IX ANALISIS DE LAS PERSPECTIVAS FUTURAS.....	111
REFERENCIAS.....	121

Por mi calidad de Presidente de AIMCRA, se me ha pedido que prologue con unas líneas esta obra, por ser aquella a la que tan merecidamente se le ha concedido el Premio instituido por nuestra Asociación de Investigación con motivo de celebrarse en este año de 1992, su XXV Aniversario. Sólo por esto, me atrevo a ello con la confianza de que el lector sabrá disculpar mi obligada osadía.

La obra de mis amigos y compañeros José Manuel Lasa e Ignacio Romagosa que se presenta en este libro, no debería ser prólogada por quien todo lo tiene por aprender en este campo. El trabajo refleja "el estado del arte" en mejora genética de la remolacha azucarera. Su impresionante puesta al día, con referencias bibliográficas pendientes de publicación en el momento de escribir estas letras, hablan por sí solas de la importancia de la misma.

Recomiendo su lectura no sólo a los profesionales de la mejora, sino a todos los técnicos relacionados de una u otra forma con la remolacha, a los que puede sernos de gran utilidad tanto como libro de consulta, como para introducirnos en el fascinante mundo de las nuevas técnicas de mejora.

Además, la lectura de esta obra pone de manifiesto la enorme importancia que la mejora genética en particular y la investigación aplicada en general, pueden tener en los próximos años, para intentar que nuestra agricultura sea más competitiva, empeño éste que habremos de lograr a toda costa, si queremos triunfar en la lucha contra los que pretenden sacrificar a la Agricultura Europea al becerro de oro del libre mercado, sin tener en cuenta las peculiaridades de nuestro sector.

Volviendo a nuestro libro, después de esta breve referencia a lo que es hoy en día la principal inquietud de los agricultores

Europeos, no me queda sino felicitar públicamente a los autores y manifestar el orgullo y satisfacción tanto de la Junta Directiva, como el mío personal, por poder ver unido el nombre de AIMCRA al de tan brillantes representantes de la Investigación Agraria de España.

Juan Mora-Figueroa Gayán
 Presidente de AIMCRA

I EL GENERO *BETA*

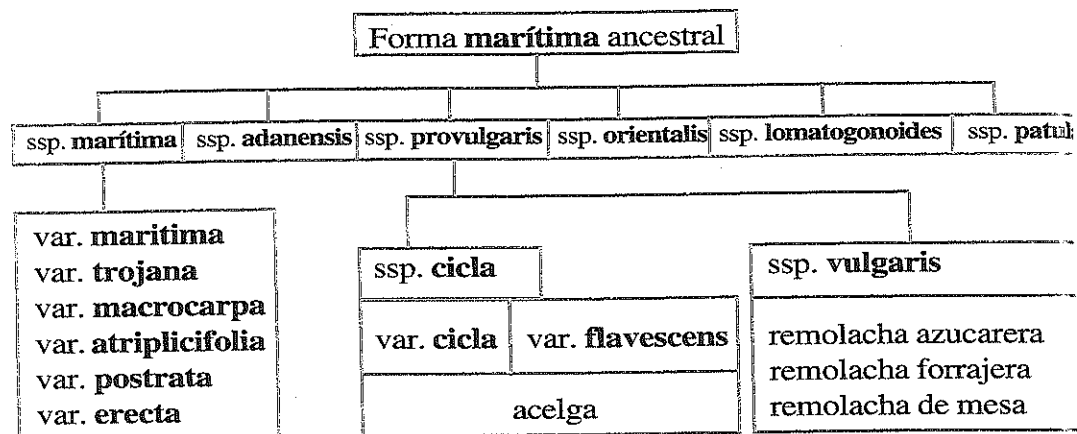
La remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) pertenece a la familia de las Quenopoidaceas, que con la excepción de las remolachas, acelgas y espinacas (*Spinacia oleracea*) tan sólo contiene unas pocas plantas cultivadas de distribución limitada.

La clasificación botánica del género *Beta* ha sido revisada por numerosos autores. De acuerdo a Buttler (1977) y Smith (1987) existen más de 10 especies distintas agrupadas en cuatro secciones:

SECCION	ESPECIES	Número cromosómico
<i>Beta</i>	<i>Beta vulgaris</i> L.	2n = 18, 36
<i>Corollinae</i>	<i>B. corolliflora</i> Zos.	2n = 36
	<i>B. foliosa</i> (sensu Haussk.)	2n = 18
	<i>B. lomatogona</i> Fish. et Meg.	2n = 18, 36
	<i>B. macrorhiza</i> Stey.	2n = 18
	<i>B. trygina</i> Wald. et Kit.	2n = 36, 54
<i>Nanae</i>	<i>B. nana</i> Boiss et Held.	2n = 18
<i>Procumbens</i>	<i>B. procumbens</i> Chr. Sm.	2n = 18
	<i>B. patellares</i> Moq.	2n = 36
	<i>B. webbiana</i> Moq.	2n = 18

La sección *Beta* incluye todas las remolachas cultivadas, así como un número de formas silvestres, perfectamente intercruzables. Por esto se considera a *Beta vulgaris* como especie colectiva incluyendo un número de subespecies y variedades.

De acuerdo a Ford-Lloyd y Williams (1975) (Bosemark 1987), a partir de una forma ancestral próxima al tipo marítima actual se observan las siguientes afinidades evolutivas:



La ssp. *provulgaris* se deriva, por simple selección por parte del hombre, de la forma *marítima* primitiva. Aparentemente, unos 500 años antes de Cristo se domesticaron de la formas *marítima* tipos semejantes a la acelga actual. Posteriormente a partir de éstas se desarrollaron remolachas de mesa y forrajeras. Muy posteriormente se empezaron a cultivar remolachas azucareras.

En las formas silvestres y especies próximas a la remolacha azucarera existen caracteres de interés económico que pueden ser objeto de programas de investigación específicos de transferencia a las formas cultivadas. Así, en la ssp. *marítima* existe resistencia a *Cercospora*; en la sección *Procumbens* resistencias a diversas enfermedades y fundamentalmente al nemátodo de la remolacha (*Heterodera schachtii*); y en la sección *Corollinae* hay fuentes alternativas de monogermia, control del apareamiento homólogo y genes de apomixis.

El origen de la remolacha azucarera es uno de los ejemplos más importantes de los logros de la mejora vegetal premendeliana. De hecho es uno de los pocos cultivos de los que existen registros históricos prácticamente muy recientes.

En 1747 el químico alemán Marggraf descubrió que el jugo presente en las remolachas forrajeras era sacarosa, azúcar que se creía existía sólo en la caña de azúcar. Unos cincuenta años después, Achard, estudiante de Marggraf, empezó a cultivar remolacha y a extraer pequeñas cantidades de azúcar. Con el apoyo de Federico Guillermo III, rey de Prusia, se estableció en Silesia construyendo la primera azucarera en Cunern en 1802. Estas primeras remolachas que se cultivaron para extraer azúcar tenían un 6% de sacarosa, de la que eran capaces de extraer tan sólo la mitad.

Como resultado de los trabajos de Achard, continuados por la familia Von Koppy, en la selección de remolacha por su contenido en azúcar, se obtuvo en los primeros años del siglo XIX, la variedad 'Blanca de Silesia', considerada como el origen de la remolacha azucarera actual, que tenía un contenido de azúcar próximo al 9%.

Paralelamente, en Francia, Delessert había empezado a extraer azúcar. En esa época, Inglaterra estaba en guerra con Francia y, debido al poderío naval inglés, los puertos continentales estaban bloqueados, impidiendo la importación del azúcar de caña. Napoleón dió orden a Delessert de construir más azucareras. En 1813 Francia era líder en el cultivo, mejora y extracción de azúcar de remolacha, existiendo más de 300 pequeñas azucareras que producían en total alrededor de 4.000 toneladas de azúcar. Los niveles de azúcar extraídos eran inferiores al 5%.

El mayor avance en el cultivo se debió a los trabajos de mejora llevados a cabo, también en Francia, por Louis de Vilmorin a partir de la Blanca de Silesia. La contribución más importante de Vilmorin a la Mejora de plantas fue la introducción de las pruebas de descendencia basadas en la evaluación de todos los descendientes de una planta como base de selección. Desde un punto de vista genético, este método constituye el eje de la mejora de plantas al seleccionar, no en base al fenotipo muy influenciado por el ambiente, sino por el

genotipo de la planta madre, juzgado por el valor medio de sus descendientes.

Vilmorin también introdujo el polarímetro en la mejora de la remolacha, hecho fundamental para conseguir los avances genéticos que se obtuvieron a finales del siglo pasado. La posibilidad de seleccionar de un modo rápido, sencillo y económico un número elevado de genotipos permitió, por un lado una mejor estimación del valor real de mejora de los genotipos, y al mismo tiempo, unas mayores intensidades de selección. Todo ello tuvo como consecuencia ganancias genéticas insospechadas. Así en 1854, Knauer en Alemania desarrolló la variedad 'Beta imperialis' con un contenido de azúcar próximo al 12% y que se considera como la primera remolacha auténticamente azucarera.

El origen de la 'Beta imperialis' es desconocido (Bosemark, 1987). Una hipótesis es que se originó por cruzamientos espontáneos entre la Blanca de Silesia y formas silvestres norteamericanas de *Beta maritima*. La segunda hipótesis es que deriva directamente de repetidos ciclos de selección de la Blanca de Silesia.

A principios de este siglo, debido a la mejora continuada de esta especie, el contenido de azúcar en la raíz había superado el 15%. Un cuarto de siglo después el nivel de azúcar alcanzaba el 20%. Sin embargo, la selección continuada para este carácter, debido a las correlaciones genéticas negativas existentes entre caracteres, trajo como consecuencia un descenso en el peso de raíz, traducido en un menor rendimiento de azúcar por unidad de superficie. Desde entonces, la mejora ha tenido como objetivo fundamental la mejora simultánea de los dos componentes primarios del rendimiento, mediante la selección para rendimiento en azúcar.

II CITOGENÉTICA DE LA REMOLACHA AZUCARERA

Pese a la importancia económica de la remolacha (*Beta vulgaris* L.), la información genética y citológica que se dispone de ella es menor que para muchos otros cultivos económicamente menos importantes. Las investigaciones básicas en esta especie se han dirigido más hacia prácticas agronómicas e industriales y hacia su mejora genética, que a la realización de estudios citogenéticos básicos.

I CARIOTIPO BÁSICO

La dificultad en identificar los nueve cromosomas que componen su complemento básico, debido a su uniformidad y pequeño tamaño, ha supuesto un problema importante y un freno a la realización de estudios citogenéticos más detallados. Si bien para llevar a cabo un programa de mejora no es estrictamente necesario identificar inequívocamente los distintos cromosomas, el conocimiento preciso del cariotipo específico es importante para conocer la relación existente entre genes de interés económico, grupo de ligamiento en que se encuentran estos genes y cromosoma al que están asociados.

El procedimiento estándar para poder observar los cromosomas en plantas se lleva a cabo en tejidos meristemáticos en división celular

muy activa. Generalmente se utilizan extremos de raicillas o meristemas de hoja. Estos pequeños segmentos (raicillas de 15-20 mm y meristemas foliares de 2-4 mm) se pretratan con medios físicos (temperatura próximas a 0°C) o químicos (hidroxiquinoleína, alfa-bromonaftaleno, colchicina, etc) para evitar el funcionamiento del huso acromático en las células somáticas en división. De este modo, los cromosomas mitóticos metafásicos aparecen altamente condensados, sin que la separación anafásica de los cromosomas en dos cromatidios llegue a realizarse. Después de mantener las células en el pretratamiento durante un tiempo determinado, los meristemas se fijan utilizando una mezcla de alcohol etílico y ácido acético glacial. A continuación se tiñen empleando, generalmente, orceína o carmín acético que diferencialmente dan color a la eucromatina sin afectar a otras partes de la célula. Finalmente los cromosomas son visibles al microscopio después de ser montados extremos meristemáticos de 0,5-1 mm en un porta.

Identificación del complemento cromosómico: definición de un cariotipo somático básico.

La identificación más común de los cromosomas se lleva a cabo en células en profase tardía o metafase somáticas. En este estado el cromosoma (Figura 1) está constituido por dos cromatidios que no siempre son visibles microscópicamente (Figuras 1 y 2).

Los extremos de los cromosomas se denominan telómeros existiendo una constricción primaria o centrómero que divide al cromosoma en dos brazos cromosómicos. La identificación de los distintos cromosomas puede llevarse a cabo por su longitud total y su forma, determinada por la posición del centrómero. Según la posición del centrómero, es decir según la longitud relativa de los dos brazos cromosómicos (razón o relación de brazos), los cromosomas pueden dividirse en:

Metacéntricos: el centrómero está situado en posición central, dividiendo al cromosoma en dos brazos iguales. Es decir la razón de brazos es próxima a 1.

Submetacéntricos: los dos brazos no presentan la misma longitud. La razón de brazos es superior a 1,5.

Subtelocéntricos: uno de los dos brazos es mucho más corto que el otro.

Telocéntricos: aparentemente el centrómero se encuentra situado al extremo del cromosoma, dando la apariencia de existencia de un sólo brazo.

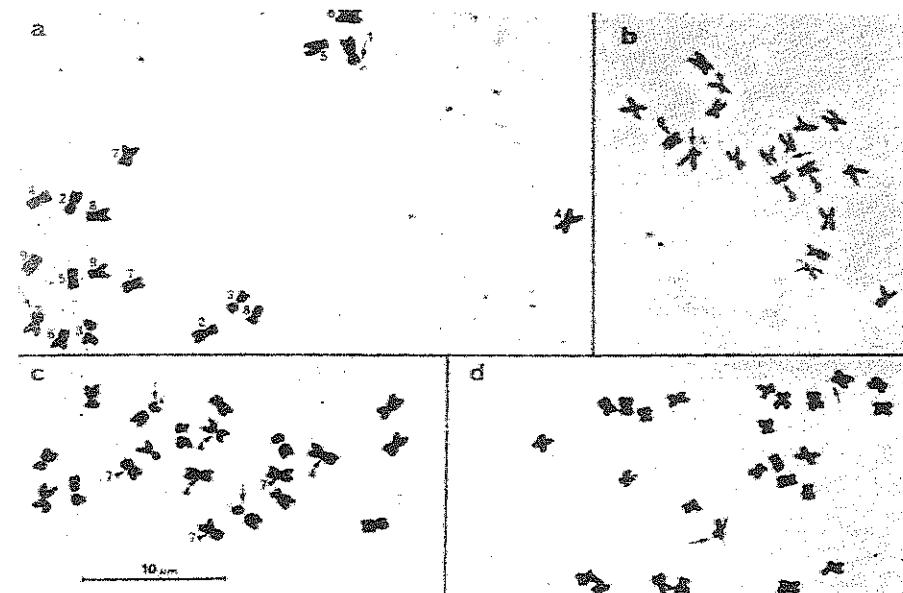


FIGURA 1

Metafases somáticas en remolacha azucarera: (a) Diploide, $2n = 2x = 18$; (b) Trisómico primario para el cromosoma 9. $2n = 2x + 1 = 19$; (c) Doble trisómico para los cromosomas 4 y 7, $2n = 2x + 2 = 20$; (d) Triploide, $2n = 3x = 27$.

Las flechas identifican al cromosoma 1.

En algunos cromosomas, además de la constricción primaria, pueden observarse las denominadas constricciones secundarias. La más importante de éstas identifica al organizador nucleolar, que en ocasiones divide al brazo cromosómico en que se encuentra en un extremo, generalmente libre, que aparece como separado del resto. A este extremo se le denomina satélite (cromosoma 1 en Figuras 1 y 2).

La longitud de los cromosomas en células vegetales es muy variable, pudiendo alcanzar hasta 30 μm en el caso de especies del género *Trillium*. Los cromosomas de especies del género *Allium* pueden oscilar entre 10 y 20 μm . Como comparación puede señalarse que los cromosomas humanos tienen una longitud media igual a 5 μm , y los de remolacha 2.5 μm (Tabla 1).

El número de cromosomas en especies vegetales es también muy variable. La mayor parte de las especies se caracterizan por tener en las células somáticas dos juegos básicos idénticos de cromosomas procedentes de los gametos de sus progenitores. Por ello el número de cromosomas en una célula no gamética viene representado por la expresión $2n$, mientras que en los tejidos somáticos el número básico viene asociado al valor n o **número haploide**. El número haploide varía entre valores de $n = 2$ por ejemplo para *Haplopappus gracilis*, hasta más de 600 para ciertos helechos del género *Ophioglossum* (Lacadena, 1988).

Una etapa importante en el desarrollo citológico de la remolacha fue el desarrollo de la poliploidía en este cultivo (ver sección II.3). En su condición natural, la remolacha es una planta diploide, es decir que presenta como número somático dos juegos básicos de nueve cromosomas, cada uno de ellos procedente de un gameto de cada parental, es decir $2n = 2x = 18$. En esta especie es relativamente sencillo duplicar este complemento por la acción de la colchicina para llegar a obtener individuos tetraploides de 36 cromosomas ($2n = 4x = 36$). Estos trabajos pioneros en la poliploidía, y que probablemente supusieron la mayor aplicación económica de esta técnica en la mejora genética de cualquier especie, exigieron el conteo rutinario de cromosomas para llevar a cabo la comprobación citológica de la poliploidización de individuos tratados con colchicina. Sin embargo, estas primeras observaciones constataron la dificultad de la identificación e incluso de los conteos cromosómicos en esta especie.

En un estudio citológico detallado, Bosemark y Bormotov (1971) señalaron que la longitud media de los nueve cromosomas de esta especie era igual a 2,50 μm . Siete de los nueve cromosomas tenían el centrómero en posición más o menos céntrica, mientras que los

otros dos era submetacéntricos. Aparte de la identificación positiva del cromosoma con satélite, el riesgo de equivocarse en la identificación de los otros ocho era muy alto. Pese a numerar secuencialmente los nueve cromosomas, el cariotipo que desarrollaron nunca ha llegado a emplearse de un modo generalizado. Posteriormente, De Jong y De Bock (1978), empleando plantas haploides y tinción diferencial de Giemsa, tampoco pudieron construir un ideograma cromosómico completo.

La primera identificación completa de los nueve cromosomas de remolacha se llevó a cabo en la Estación de Aula Dei en Zaragoza. Cistué et al. (1985) utilizando un método citológico convencional, como es el estudio de los cromosomas somáticos en metafase con tinción de orceína o de carmín-acético, señalaron que es posible la identificación de cada uno de los nueve cromosomas distintos cuando estos se agrupan en tres grupos de tres cromosomas cada uno (Fig. 2).

La longitud media de los cromosomas encontrada en un número limitado de células haploides fue igual a 2.39 μm , variando entre 1.97 μm para el más corto hasta 2.78 μm para el cromosoma nucleolar. La longitud promedio del satélite para este cromosoma fue igual 0.23 μm . La relación entre la longitud de los dos brazos estuvo comprendida entre 1.04 y 2.08 (Tabla 1).

Un ejemplo de cariotipo metafásico haploide utilizado en este estudio aparece reflejado en la Figura 2. En la parte superior de la figura se observan los nueve cromosomas en una célula haploide somática, mientras que en la parte inferior aparecen ordenados los cromosomas, de un modo mediante el cual la identificación individual de los cromosomas es posible.

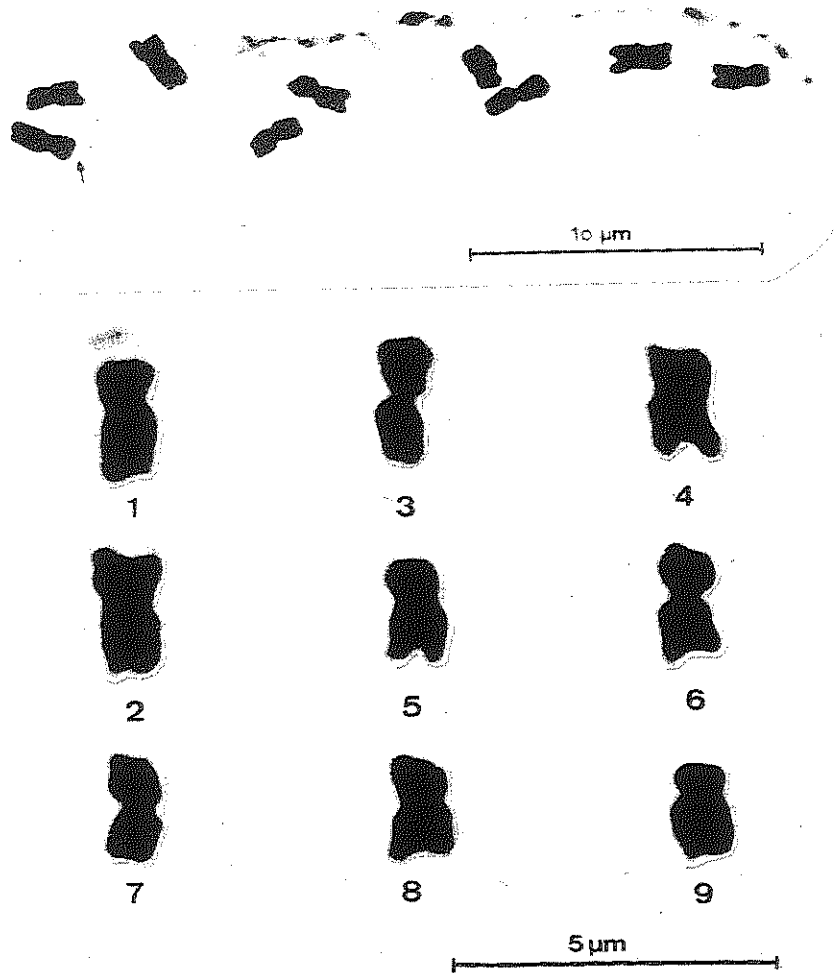


FIGURA 2

Cariotipo somático en remolacha. En la parte superior aparece la célula haploide empleada, en la inferior, aparecen los nueve cromosomas ordenados para su identificación.

Tabla 1. Longitud media y razón de brazos de los nueve cromosomas en metafase somática en células haploides de remolacha

CROMOSOMA	LONGITUD (μm)		RAZÓN DE BRAZOS		
	MEDIA	S.E.	RELATIVA (%)	MEDIA	S.E.
1	2,55	0,050	12,0	1,51	0,060
2	2,65	0,094	12,4	1,32	0,130
3	2,65	0,056	12,4	1,04	0,024
4	2,45	0,050	11,5	1,04	0,043
5	2,34	0,076	11,0	1,67	0,036
6	2,34	0,055	11,0	1,29	0,012
7	2,22	0,050	10,4	1,08	0,042
8	2,12	0,031	10,0	1,46	0,131
9	1,97	0,027	9,3	2,08	0,092

No se incluye la longitud del satélite por su elevada variabilidad de una célula a otra.

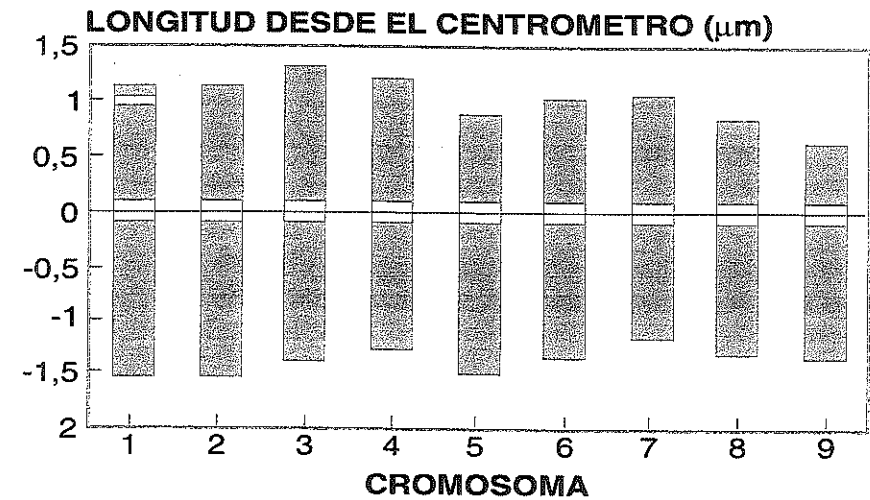


FIGURA 3

Ideograma de los nueve cromosomas de remolacha.

En la Figura 3, en base a las dos variables fundamentales, longitud y razón de brazos, se presenta el ideograma cromosómico de *Beta vulgaris*, que permite clasificar los cromosomas en los tres grupos en que se presentaban en la Figura 2.

(I) Cromosomas 1, 3 y 4.

Este grupo se caracteriza por la presencia del cromosoma nucleolar y de los dos cromosomas metacéntricos de mayor tamaño. El cromosoma 1 es el más fácilmente identificable ya que es el único en el que se detecta un satélite en metafase. Los otros dos cromosomas tienen el centrómero en posición central, es decir son metacéntricos. Tienen una longitud parecida y existe un riesgo elevado de identificarlos erróneamente. Sin embargo el cromosoma 3 es algo más largo que el 4.

(II) Cromosomas 2, 5 y 6.

Estos cromosomas presentan el centrómero en una posición no tan central. Se trata de tres cromosomas relativamente submetacéntricos, sin ser ninguno de los tres de menor tamaño. El cromosoma 2 es el mayor de los tres. De los otros dos, el 5 es el menos metacéntrico aunque de igual longitud que el 6. Este presenta una razón de longitud de los dos brazos cromosómicos análogo al 2, pero es de menor tamaño.

(III) Cromosomas 7, 8 y 9.

Los tres cromosomas más cortos se incluyen en la tercera clase. El cromosoma 7 es claramente metacéntrico, el 8 tiene el centrómero en posición media-submedia, mientras que el 9 es el más submetacéntrico de todos los que componen el complemento básico.

Este cariotipo que se presenta y que apareció publicado en un trabajo de Cistué, Romagosa, Tsuchiya y Lasa en la revista americana Botanical Gazette no está exento de un riesgo de equivocaciones en la identificación de cromosomas individuales. De hecho, la relativa semejanza entre los distintos cromosomas (Figura 4) supone que éstos sólo son fácilmente identificables cuando se manejan células metafásicas de alta calidad, y en ningún caso en trabajos rutinarios de conteos cromosómicos. Cuando estudios detallados se han realizado

cuidadosamente, se ha podido identificar cromosomas extranumerarios presentes en individuos aneuploides (Romagosa et al., 1985; Romagosa et al., 1987).

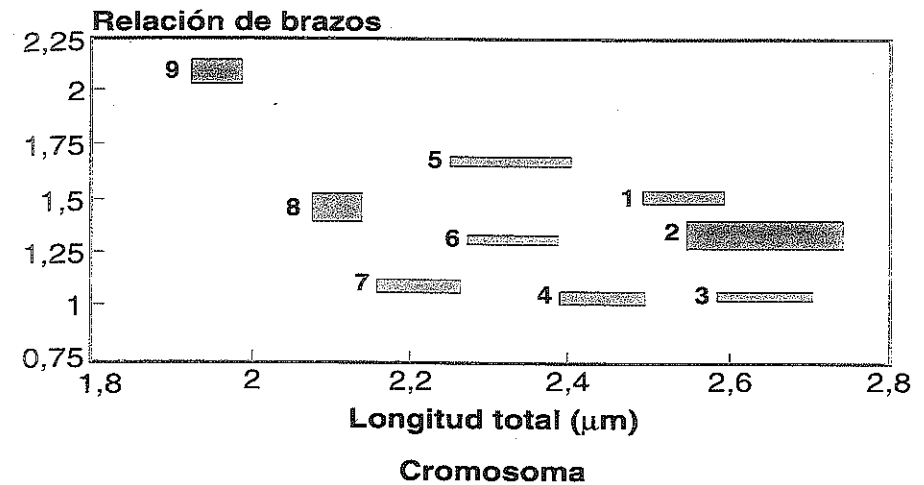


FIGURA 4
Cariograma estándar de remolacha azucarera. Las dimensiones de los recuadros hacen referencia a los errores típicos de la longitud y relación de brazos.

Los cromosomas de remolacha también son susceptibles de ser identificados en otros estados. Así, se han intentado identificar los distintos cromosomas en las profases mitóticas y meióticas. Nakamura y Tsuchiya (1982) empleando bivalentes paquiténicos durante la meiosis, en base a patrones de eucromatina (se tiñen con las tinciones convencionales) y heterocromatina (normalmente aparecen no teñidas como si se tratasen de constricciones secundarias) semejantes a los mostrados en profase somática, intentaron con limitado éxito la identificación de los nueve cromosomas. La dificultad de esta técnica ha impedido un mayor desarrollo de su uso.

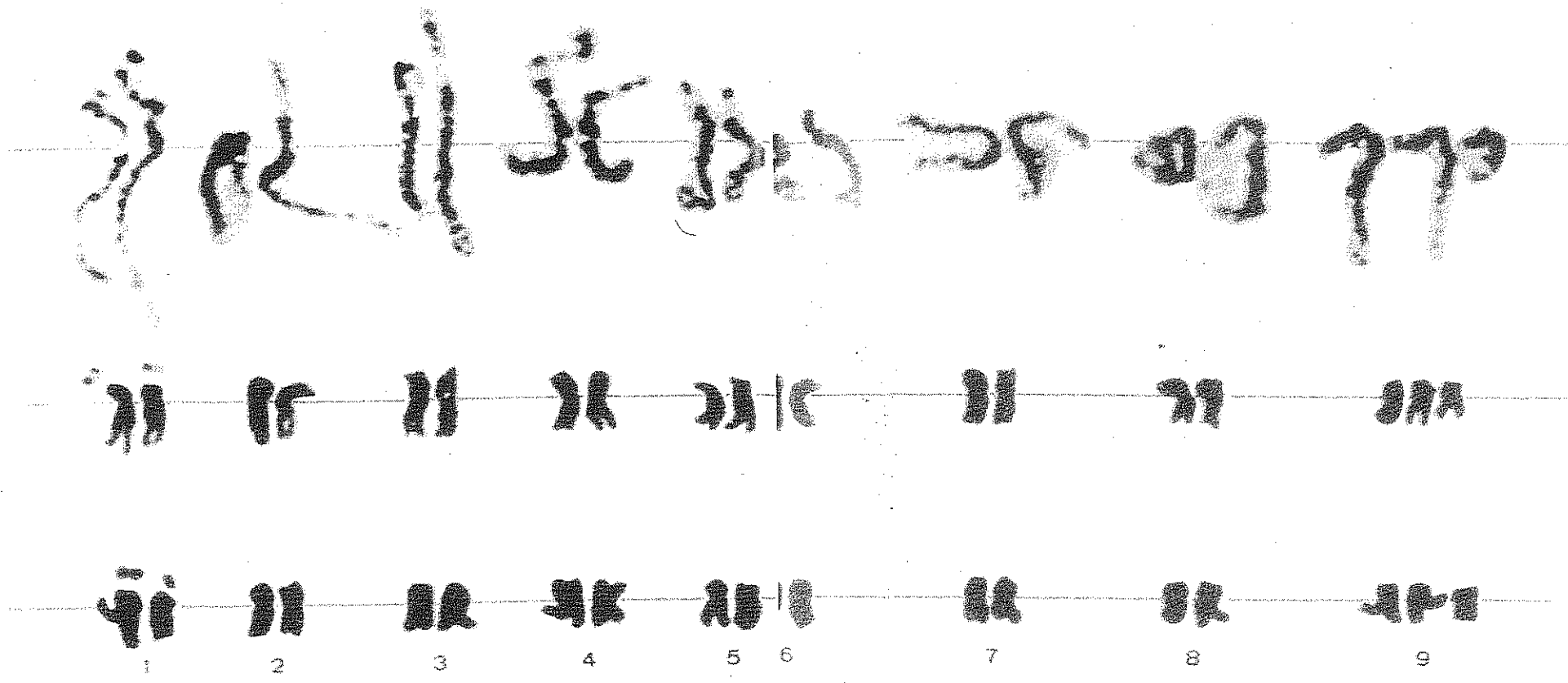


FIGURA 5

Cariotipos en profase mitótica, metafase temprana y metafase tardía, de un acrotisómico 9S^u de remolacha azucarera.

Además de la identificación en metafase mitótica, Cistué et al. (1983) fueron capaces de identificar los nueve cromosomas en profase tardía somática. En este estado los cromosomas no están completamente condensados, presentando una mayor longitud y un patrón caracterizable de zonas eucromatínicas y heterocromatínicas.. Un ejemplo de la utilización de este estado mitótico en relación a la metafase convencional para la identificación cromosómica aparece

en la Figura 5. En ella pueden compararse cromosomas en profase tardía y metafase somática. Según el patrón de bandas existentes en profase, es posible conocer la naturaleza cromosómica de una planta de remolacha con 19 cromosomas, en la que además del juego diploide de cromosomas existe una fracción del cromosoma 9 (Romagosa et al., 1986).

2 TRISÓMICOS PRIMARIOS

Los individuos trisómicos se caracterizan por ser organismos diploides que además del complemento ordinario de cromosomas, presentan un cromosoma de más. Es decir, los trisómicos en remolacha presentan $2n = 2x+1 = 19$ cromosomas.

Los trisómicos primarios, aquellos que como cromosoma extra tienen un cromosoma integro de los nueve del complemento, permiten conocer en que cromosomas se encuentran los distintos genes y establecer las relaciones de ligamiento entre genes (Tsuchiya, 1983). Al existir tres cromosomas homólogos en lugar de los dos propios de especies diploides, las segregaciones genéticas para genes localizados en el cromosoma extra, después del cruzamiento entre un gen mendeliano a localizar y el genotipo homocigótico normal, diferirán de la 3:1 esperada en la F_2 o de la 1:1 propia del cruzamiento de prueba.

El procedimiento básico de localización cromosómica de genes mediante el empleo de series de trisómicos primarios es el siguiente. Supongamos que queremos localizar un gen mutante recesivo 'a' de herencia mendeliana sencilla, para ello cruzaríamos todos los componentes de la serie trisómica con el mutante aa. Los trisómicos serán lógicamente AA, ya que suponemos que se trata de un nuevo gen no común a localizar excepto para el tipo cuyo cromosoma extra sea portador de este gen. En este caso el genotipo de este trisómico será AAA. En la F_2 del cruzamiento entre el mutante y todos los x-1 trisómicos que no son portadores del gen A/a la proporción fenotípica observada será muy próxima a la esperada segregación disómica 3A-:1 aa. Por el contrario en el caso de la F_2 correspondiente al trisómico portador de este gen, cuya F_1 será AAa, se aproximará más a la segregación trisómica o crítica 17 A-: 1 aa. La discriminación entre una y otra segregación esperada, plantea problemas estadísticos fundamentales en lo referente al tamaño muestral mínimo para un nivel dado de confianza. Estos problemas están tratados detenidamente en Romagosa (1982).

En un número elevado de cultivos importantes, como el maíz, cebada, guisante, tomate, etc. el aislamiento, identificación y empleo de trisómicos ha permitido avances importantes en su genética.

Distintos intentos se realizaron para el aislamiento de los componentes de la serie de trisómicos primarios en esta especie (Levan, 1942; Butterfass, 1964; Kaltsikes y Evans, 1967; Ishimura, 1972; Bormotov et al., 1973). En ningún caso se pudo identificar todos los componentes en materiales genéticamente útiles. Empleando materiales genéticamente uniformes u homocigóticos tan sólo se pudo conseguir aislar unos pocos de los nueve componentes de la serie trisómica. En otros casos, el empleo de materiales muy heterogéneos impidió la identificación y uso de los materiales aislados.

La primera serie de trisómicos completa de esta especie se obtuvo en el marco de un proyecto conjunto entre la Estación Experimental de Aula Dei y el Crops Research Laboratory (USDA) de Colorado, utilizando una línea pura homocigótica, procedente de la duplicación de un haploide (Romagosa, 1983; Romagosa et al., 1986). Muy recientemente se han registrado oficialmente los componentes disponibles (Romagosa et al., 1991).

En base a su morfología (Figura 6) y al complemento cromosómico (Figura 7) (Romagosa et al., 1987), se identificaron los nueve componentes que se nombraron de acuerdo al cromosoma extra presente. Ocho de los nueve tipos primarios eran morfológicamente distintos de las plantas diploides parentales y entre sí. Triplo 9 (trisómico para el cromosoma más pequeño) presentaba una morfología muy similar a la del diploide original. Además de la morfología general, centrándose en un análisis morfométrico de las hojas, es perfectamente posible discriminar estadísticamente hojas de uno u otro tipo de trisómico y del diploide (Romagosa et al., 1986).

Los nueve trisómicos de remolacha, de acuerdo a su vigor pueden dividirse en cuatro grupos: Triplo 2 y 3 presentan un vigor muy bueno; los trisómicos para el cromosoma 1, 4, 5 y 9 presentan un vigor un poco inferior al diploide; Triplo 8 tiene baja vitalidad; y finalmente Triplo 6 y Triplo 7 son muy poco viables. Teniendo presente que los números crecientes hacen referencia a una menor longitud total del cromosoma extra, no se puede aceptar en esta especie una relación entre presencia de un cromosoma extra corto y menor grado de alteración fenotípica.

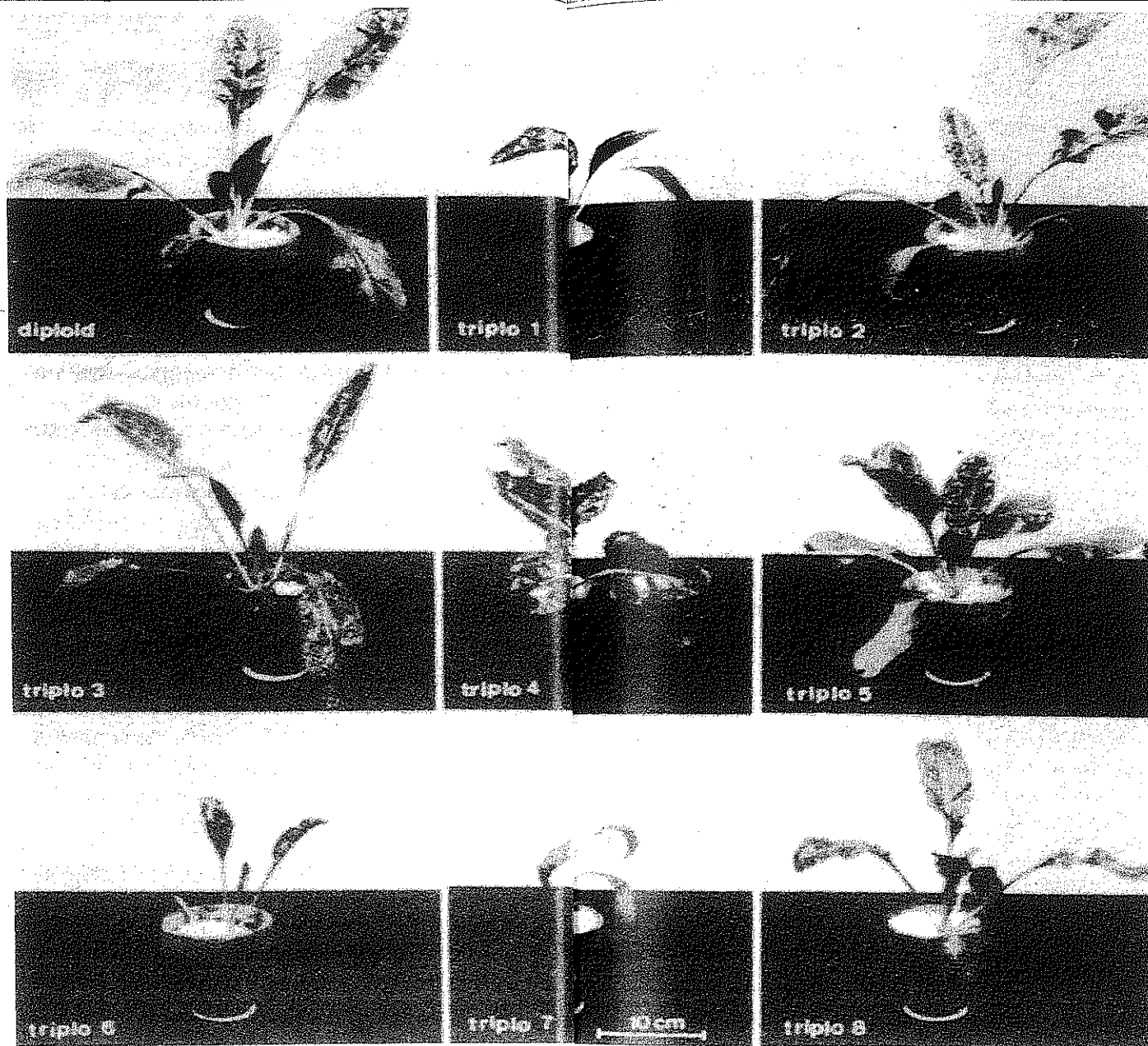


FIGURA 6

Ocho trisómicos primarios de remolacha y el diploide original. El Triplo 9, que no aparece representado, muestra una morfología muy semejante al diploide original.

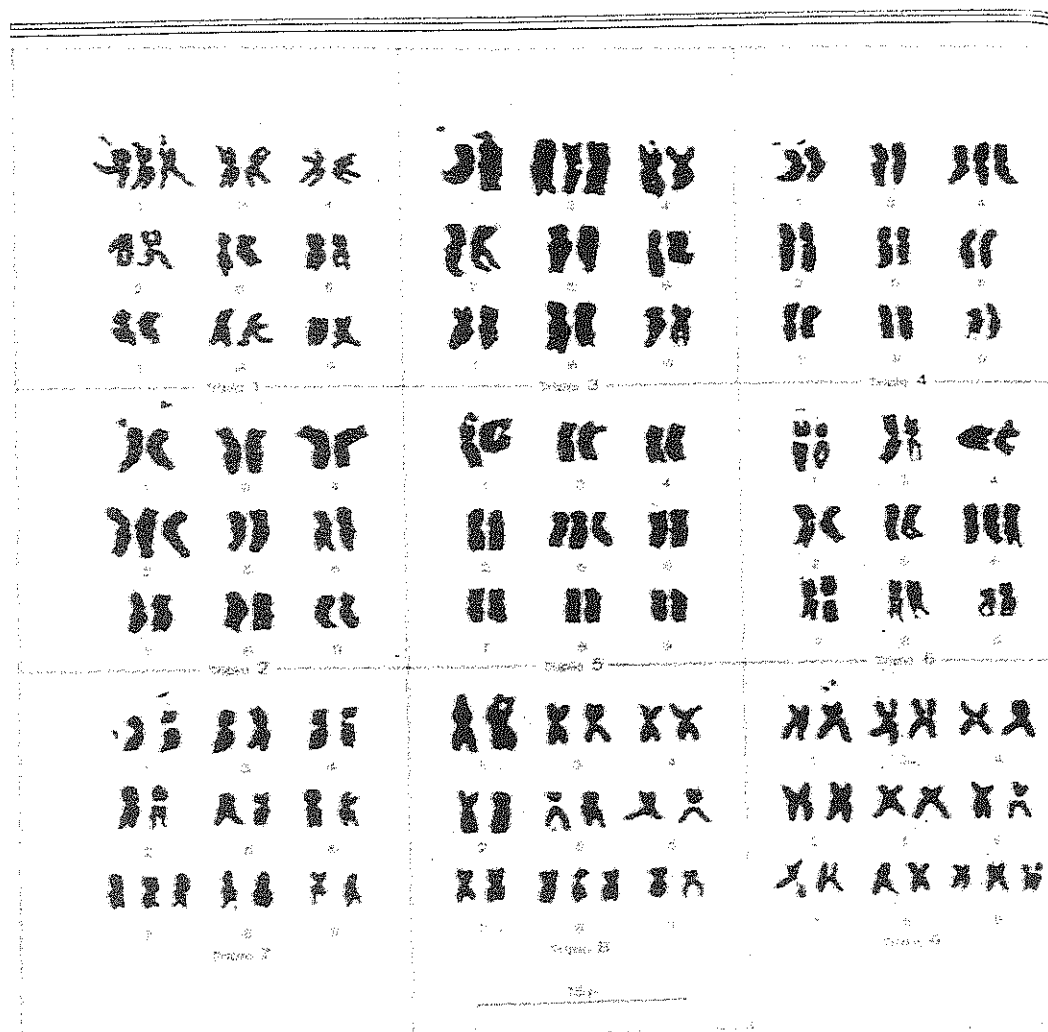


FIGURA 7

Cariotipos de los nueve componentes de la serie de trisómicos primarios de remolacha azucarera (Romagosa et al... 1987)

El comportamiento meiótico de los trisómicos primarios en esta especie es bastante regular. El cromosoma extra tiende a estar asociado a los otros dos en meiosis. De hecho, el número de trivalentes observado por meiocito fue próximo al 80%. La transmisión media

del cromosoma extra en condiciones de cultivo óptimo a través del gameto femenino fue próximo al 30% (Romagosa, 1983). Sin embargo, el mantenimiento de toda la serie homocigótica es problemático debido a la baja viabilidad de alguno de los tipos existentes, particularmente su baja supervivencia a la inducción fototérmica necesaria para su floración. Por ello se ha hecho necesario el mantenimiento y multiplicación *in vitro* de los trisómicos por medio de cultivo de meristemas auxiliares (Casas et al., 1986).

3 POLIPLOIDIA Y ANEUPLOIDIA

3.1 EFECTOS GENERALES

Al final de los años 30 algunos mejoradores de remolacha ya comenzaron a producir remolachas tetraploides ($2n=4x=36$) (Schwanitz, 1938; Frandsen, 1939; Rasmusson y Levan, 1939), e inicialmente levantaron grandes expectativas sobre los posibles incrementos de producción que se derivarían de estos hechos. En lugar de esto, el peso de raíz y la producción de azúcar de los tetraploides resultó, casi invariablemente, significativamente más baja que la de sus equivalentes diploides.

Sin embargo pronto se descubrió que los diploides y tetraploides cruzaban fácilmente, y que los triploides resultantes ($2n=3x=27$) frecuentemente superaban en producción no solo al parental tetraploide sino también al diploide (Peto y Boyes, 1940). Este descubrimiento se tradujo en el desarrollo de las variedades anisoploides ($2x+3x+4x$), y supuso la base del posterior desarrollo de las variedades híbridas triploides, que fueron posibles tras la introducción de la androesterilidad citoplásmica.

Como en la mayor parte de los autotetraploides inducidos, las remolachas poliploides presentan un menor número de hojas que el correspondiente diploide, más gruesas, con láminas más anchas y peciolo más cortos, y con un peso de hojas/planta superior.

	Plantas	Producción (g)
2x	26.5	100.0
3x	25.3	120.2
4x	22.8	129.8

También tanto las flores como los glomérulos resultantes son de mayor tamaño, resultando todas estas diferencias a partir de un incremento en el tamaño celular, fácilmente observable en las células guardas de los estomas y en los granos de polen.

Junto a estos cambios de tipo morfológico, se presentan también variaciones fisiológicas, que generalmente se manifiestan en base a un desarrollo más lento. De esta forma, los tetraploides en promedio, tienden a necesitar un período vegetativo más largo que los diploides, para alcanzar su potencial de producción. Quizás esta ha podido ser la causa del mejor comportamiento de los tetraploides en relación con los diploides, en los cultivos del Sur de Europa, cuando se compara con los resultados de los cultivos de Centro Europa con períodos vegetativos más cortos.

Otros cambios relacionados con la capacidad de adaptación de los distintos niveles ploídicos, fueron analizados por Beysel (1957 a,b), encontrando que cuando las condiciones hídricas del cultivo eran óptimas, tanto la razón de asimilación como la de respiración, eran más altas en los tetraploides que en los diploides o triploides. Sin embargo, durante o posterior, a un período de estrés hídrico, los triploides mostraban valores más elevados. Aunque es difícil conocer como afectan estos cambios a los diversos procesos fisiológicos, es interesante apuntar que los triploides tienden a ser más estables que los diploides o los tetraploides.

Para explicar la superioridad de los triploides Knapp (1957, 1966), sugirió que las diferencias entre 2x, 3x y 4x eran debidas a los efectos combinados, negativos en el sentido fisiológico con el incremento del número genómico, y positivos a través de una mejor utilización de la heterocigosidad y el alelismo múltiple, debidos a la poliploidía (Figura 8).

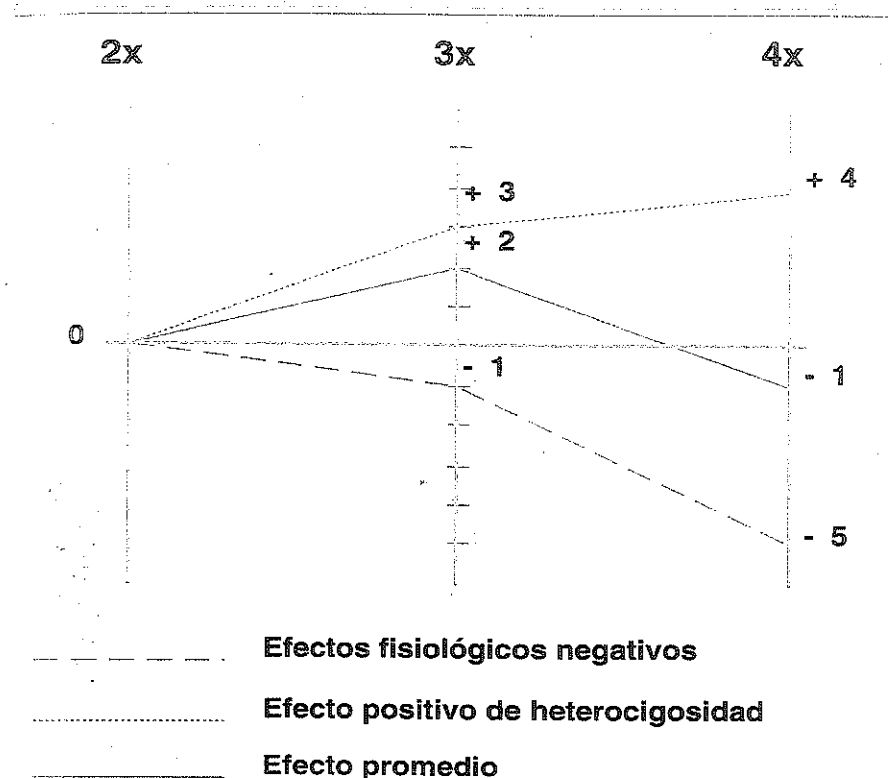


FIGURA 8

Combinación de efectos heteróticos positivos y fisiológicos negativos de la poliploidía.

Sin embargo, en su modelo Knapp no consideró los efectos negativos de la aneuploidía (Bosemark, 1971a), de la que posteriormente hablaremos, y por tanto sobreestimó los efectos negativos fisiológicos. En cuanto a su interpretación de los efectos positivos, basada en el mayor potencial de las interacciones alélicas, resultado del incremento en el número de genes cuantitativamente diferentes y que se traduce en una mejor utilización de la heterosis y unos genotipos más equilibrados, ha sido confirmada en otras especies.

3.2 PROPIEDADES CITOGENÉTICAS DE LAS REMOLACHAS POLIPLOIDES

La presencia de cuatro genomas completamente homólogos en los tetraploides, se traduce en la formación, durante la meiosis, de un número variable de cuadrivalentes, trivalentes, bivalentes y univalentes, tanto en el lado masculino como en el femenino. La situación varía de meiocito a meiocito, dependiendo del grado de apareamiento y del número y distribución de los quiasmas. El resultado es una segregación cromosómica desigual, y la formación de gametos con números cromosómicos irregulares. En consecuencia, se ha comprobado que entre el 30 y el 60 % de los gametos, producidos por una planta euploide de 36 cromosomas, resultan desequilibrados.

Aun en el caso de que muchos de estos gametos desequilibrados no sean viables o participen en la formación de cigotos que posteriormente aborten, se ha detectado que el porcentaje de aneuploides en la mayoría de las poblaciones tetraploides de remolacha, es del orden del 30-40 % (Rommel, 1965; Bosemark, 1966). Dado que en los triploides únicamente uno de los parentales contribuye con gametos desequilibrados, la frecuencia de aneuploides es menor, y claramente dependiente de que el parental tetraploide actúe como hembra (20-25 %) o como macho (12-17 %) (Bosemark, 1966).

Si los cuantificamos en el campo, donde las plantas euploides y aneuploides se distribuyen al azar en las líneas, y compiten entre ellas, la producción de raíz de los aneuploides tetraploides es únicamente el 65-70 % de la del euploide tetraploide, mientras que en el caso de los triploides, la reducción debida a aneuploidía llega a alcanzar el 50% de la producción. Los fenómenos de competencia entre plantas euploides y aneuploides en el campo, suponen que estas mermas se vean aminoradas, y las estimas reales de pérdida de producción se calculaban entre 4 y 6 % para tetraploides, y 2 y 3 % para triploides (Bosemark, 1967; Lichter, 1967).

Aunque no se habla mucho de ello, el efecto negativo de la aneuploidía es hoy en día más importante que hace 20 años. Esto es debido a la combinación de una mejor calidad de la semilla, con las técnicas de siembra definitiva. De esta forma, cuando las condiciones

de producción de semilla son muy buenas, y se obtiene una semilla de alta germinación y vigor de nascencia, sobrevive un mayor porcentaje de cigotos aneuploides, que si se encuentran con favorables condiciones en la siembra definitiva, se traduce en un alto porcentaje de plantas aneuploides en el campo. Este fenómeno se ha presentado de forma muy clara en las siembras de 1988, en las que junto a una semilla de alta calidad, la producida en 1987, se presentaron unas condiciones de nascencia óptimas en la mayor parte de la Europa Occidental. Los agricultores que emplearon la siembra definitiva encontraron que, junto a densidades de planta excelentes, se apreciaba la aparición de un porcentaje elevado de raíces pequeñas. El estudio de diferentes lotes de semilla mostró una incidencia de aneuploides muy elevada, entre el 15.7 y el 23.3 %, lo que justificaría en campo pérdidas de alrededor del 4 % en producción (Bosemark, comunicación personal).

Los diferentes intentos que se han realizado para obtener una disminución permanente en los porcentajes de aneuploidía, no han tenido éxito hasta el momento, lo que hace pensar que mientras se continúe con poliploidía en remolacha, tendremos que convivir con el fenómeno de la aneuploidía. Este hecho se ha confirmado también en otras especies, como en sorgo (Doggett y Majisu, 1972), en el que a pesar de aplicarse ciclos recurrentes de selección sobre una población tetraploide, que mejoraron claramente las características de producción y calidad de la semilla, la frecuencia de cuadrivalentes y por tanto la de aneuploides permaneció inalterada.

Este fenómeno de la aneuploidía podría explicar, que a pesar de las grandes expectativas teóricas de las poblaciones tetraploides (Lichter, 1975), los avances en producción no se han alcanzado.

Otro fenómeno relacionado con la poliploidía en remolacha, es la gran facilidad que presentan las poblaciones tetraploides para degradarse rápidamente en su nivel ploídico ante contaminaciones externas. Derivado de la baja competitividad que tiene el polen diploide en relación con el haploide, se ha podido comprobar que contaminaciones aparentemente inapreciables con polen haploide, degradan una población tetraploide a diploide en un número muy bajo de genera-

ciones (Lasa et al., 1979), lo que obliga a un control citológico muy estricto durante las multiplicaciones de este material tetraploide.

3.3 HERENCIA EN TETRAPLOIDES

Aunque los principios mendelianos de la herencia son tan aplicables en tetraploides como en diploides, en el caso de los tetraploides la herencia se complica ya que en el núcleo somático cada locus está representado cuatro veces en lugar de dos. Así mientras en un diploide existen tres posibles genotipos para cada par de factores (AA, Aa y aa), en un tetraploide hay cinco genotipos posibles (AAAA, AAAa, AAaa, Aaaa y aaaa). Al igual que en los diploides, puede existir herencia dominante completa o intermedia, y en este último caso, todos o únicamente alguno de los heterocigotos podrá distinguirse de los demás.

Las irregularidades en la meiosis de los tetraploides contribuyen a modificar las segregaciones teóricas, lo que unido a los comentarios anteriores, permite afirmar que la herencia mendeliana en los tetraploides es mucho más complicada que en los diploides.

3.4 RESPUESTA A LA SELECCIÓN EN TETRAPLOIDES

Si comparamos la selección contra un carácter simple recesivo en dos poblaciones, diploide y tetraploide, se puede observar claramente de los esquemas de segregación, que la frecuencia del gen recesivo se ve mucho más reducida en la diploide que en la tetraploide. Se puede generalizar afirmando que la eficacia de selección es cinco veces más elevada en el diploide que en el tetraploide.

Estos hechos se traducen en dos principios básicos de la mejora de remolacha poliploide. El primero se refiere a la intensidad de selección, que en el caso de los tetraploides debe ser más elevada, y con ciclos repetidos de selección. El segundo, basado en la pobre respuesta de los tetraploides a la selección, aconseja como regla general, aplicar la selección, siempre que sea posible, sobre materiales diploides a los que posteriormente se duplicará los cromosomas.

III DEFINICION VARIETAL

La reconversión del sector remolachero español, tiene que lograr que nuestro cultivo sea competitivo con los del resto de los países comunitarios, y dado que con anterioridad a 1995 los precios de la remolacha han de disminuir un 12%, nuestras únicas posibilidades estriban en una clara disminución de costos, y un incremento en nuestras producciones unitarias, que podría estimarse en un 20 % (El País, 3/11/91).

Para lograr estos objetivos, junto a otras mejoras del cultivo, se hace necesario el empleo al 100 % de variedades monogérmenes y con características óptimas para nuestras condiciones.

En este apartado queremos centrarnos en aquellas características ideales que deberían reunir las variedades a cultivar en España, para que el cultivo fuera rentable y competitivo.

1 CARACTERES MORFOLÓGICOS

Afectan a siembra, cosecha, almacenamiento y fabricación, y pueden concretarse en:

1.1 SEMILLAS

Han de ser monogérmenes genéticas, para siembra definitiva, por lo que deben ofrecer una alta capacidad de germinación y nascencia. Afortunadamente los monogérmenes genéticos han mostrado una mejor capacidad de nascencia que la esperada, y junto a esto presentan buenas posibilidades en cuanto a selección para buenas características de semilla, habiéndose obtenido buenos resultados en cuanto a producción de semilla, capacidad de nascencia, y tamaño y forma de semilla.

1.2 RAÍCES

Grandes, pero no muy largas, y sin patas para evitar pérdidas tanto en recolección como en conservación. Rellenas gradualmente, con canales sacaríferos anchos y piel suave, para un menor descuento. Altura uniforme sobre el suelo para obtener un más correcto descoronado.

1.3 CORONAS

El tamaño y forma de la corona incide en las pérdidas en el campo y la calidad del cosechado. De esta forma, coronas grandes y anchas requieren un descoronado más profundo, que se traduce en mayores pérdidas en peso de raíz; si se descorona más someramente, tanto la calidad industrial como el almacenamiento se ven seriamente afectados.

El tamaño y otras características del aparato foliar, como número, forma y posición de las hojas, pueden traducirse en diferencias en cuanto a eficiencia fotosintética y reacción ante la competencia inter plantas.

2 ANATÓMICOS

Al igual que con los caracteres morfológicos, las características anatómicas de la raíz cuando esta llega a la fábrica, están muy influenciadas por la variedad, el tipo de suelo, el clima y las prácticas culturales.

Las principales diferencias anatómicas consisten en variaciones en el tamaño celular, espesor de la pared celular, y número de anillos vasculares. Estos caracteres tienen un claro efecto posterior en el proceso de difusión y se traducen en diferencias en la extracción de azúcar.

La resistencia al corte, que depende fundamentalmente de la fibrosidad, se cuantifica fácilmente, seleccionándose en su contra.

3 FISIOLÓGICOS

Las máximas producciones se obtienen cuando hacemos uso del máximo período de crecimiento posible, y cuando este crecimiento no se ve afectado por factores externos.

El sistema más efectivo de incrementar el período de crecimiento, se basa en siembras tempranas, lo que hace necesaria una selección para germinación a bajas temperaturas, acompañada de un rápido crecimiento inicial.

De los muchos factores que afectan el normal desarrollo de la remolacha, los principales desde el punto de vista del aporte varietal, se centran en la resistencia a las diversas enfermedades y plagas que inciden sobre el cultivo. Hay claras razones para afirmar que la mejora para estas resistencias será uno de los caminos más importantes para obtener incrementos de producción y disminuciones de aportes en el cultivo, lo que inmediatamente se traduce en mejoras de la rentabilidad del mismo.

Junto a estas resistencias, no hay que olvidar las relativas a condiciones adversas, centradas principalmente en nuestro país en el tema del espigado, con niveles altos de tolerancia en el caso del cultivo otoñal, pero también con cierto grado de tolerancia para siembras tempranas de primavera.

También pertenece a las características fisiológicas, la capacidad de almacenamiento de la remolacha cosechada. Es un carácter complejo y fuertemente influenciado por la forma de la raíz, su manejo durante la cosecha y el transporte, y la resistencia a enfermedades, así

como por otros parámetros de tipo fisiológico, como la tasa de respiración.

4 QUÍMICOS

Mientras que los caracteres morfológicos, anatómicos y fisiológicos, ya comentados, afectan a la siembra, el establecimiento, las labores de cultivo, el crecimiento, la producción final, el almacenamiento, el lavado y cortado en fábrica y la difusión; los caracteres químicos afectan principalmente a los procesos encaminados a la cristalización del azúcar.

Tras muchos años de discusión, en la actualidad parece que los tecnólogos del azúcar han llegado al acuerdo de que las principales características que constituyen una alta calidad de la remolacha, son el alto contenido en sacarosa, y los bajos contenidos en no azúcares de sodio, potasio, alfa-amino nitrógeno y betaína. Esto no excluye que bajo ciertas condiciones ambientales, otros constituyentes de la remolacha, como la rafinosa o los invertidos, puedan causar problemas en fábrica.

A continuación analizaremos los conocimientos genéticos y de evaluación existentes, para los diversos caracteres en estudio, que permiten el diseño de los métodos más adecuados para su mejora.

IV GENÉTICA DE CARACTERES CUALITATIVOS

En remolacha azucarera se conocen más de 40 marcadores fenotípicos de herencia muy sencilla (para una enumeración de caracteres, símbolos y grupos de ligamiento ver Smith, 1987). Sin embargo, de los nueve posibles grupos de ligamiento existentes en esta especie, uno por cromosoma, tan sólo se ha determinado la presencia de genes asociados a cinco. No se ha establecido la pertenencia a un grupo de ligamiento de más de la mitad de los caracteres descritos. Tampoco se ha publicado todavía la correspondencia entre grupos de ligamiento y cromosomas, posible mediante el empleo de la serie de trisómicos primarios descritos anteriormente.

La mayor parte de los caracteres estudiados no presentan ningún interés económico directo más allá de su interés científico y de su empleo como posibles marcadores de cruzamientos. Así, muchos de ellos hacen referencia al ciclo de cultivo, al color del hipocotilo, de los cotiledones, etc. Otros por el contrario tienen implicaciones muy importantes en la mejora de esta especie y que por ello vamos a pasar a describir.

1. HÁBITO DE CRECIMIENTO

Las remolachas cultivadas son todas ellas bianuales necesitando un período más o menos largo de bajas temperaturas (inducción térmica) para pasar del estado vegetativo al reproductor. La duración del día también es importante para la inducción floral de la remolacha. Por ello se suele hablar del fenómeno de inducción fototérmica.

Existen diferencias genéticas en la duración e intensidad de la inducción fototérmica. Su control genético es cuantitativo (poligénico) y de herencia compleja. Las implicaciones económicas de este carácter aparecen desarrolladas con más profundidad en el apartado V.6.

La mayoría de las remolachas silvestres Mediterráneas (*marítima*, *macrocarpa*, *patula*) son anuales, aunque también existen tipos que precisan inducción fototérmica para florecer. Existe un gen simple de herencia sencilla o mendeliana que comporta un hábito de crecimiento anual. A este gen dominante se le denomina 'B' y se ha asociado al primer grupo de ligamiento (I) (Smith, 1980). Genotipos portadores de este gen, principalmente en presencia de días largos y temperaturas razonablemente elevadas, finalizan su ciclo en cortos períodos de tiempo (incluso inferiores a 3 meses). Por ello se ha postulado su empleo en programas de mejora para:

- (1) acelerar procesos de retrocruzamiento
- (2) identificar mantenedores de esterilidad empleando genotipos androestériles anuales en el proceso de indexado (ver sección VII.2).
- (3) reducir el tiempo intergeneracional en estudios genéticos básicos.

Bajo este punto de vista el gen de anualidad, puede ser muy útil como herramienta de trabajo en programas de mejora. El problema grave puede ocurrir si involuntariamente se introduce en materiales de mejora.

2. MONOGERMIA

La monogermia, que permite una reducción muy significativa en los costes de producción al limitar los gastos de aclareo y facilitar el espaciado óptimo, revolucionó el cultivo de remolacha. La semilla monogermen domina la mayor parte de la superficie de cultivo de remolacha.

Ya en 1915 Townsed en USA comenzó trabajos de selección dentro de materiales multigérmes, en busca de monogermia, con resultados consistentes en la obtención de líneas con un 75 % de sus semillas monogérmes, pero aquel trabajo no fue continuado.

Posteriormente en la URSS se comenzaron fuertes trabajos de búsqueda en los campos de producción de semilla, con el objetivo de identificar teóricos mutantes que sólo llevaran un germen por semilla. Así se asegura que en 1934 fueron inspeccionados alrededor de 22 millones de plantas, de las que se escogieron 109 que tenían diferentes porcentajes de frutos monogérmes, pero en ningún caso monogermia total (Bordonos, 1939, 1940, 1941; Orlovskii, 1957).

Fue en 1948 cuando Savitsky, recién emigrado de la URSS, realizó una búsqueda en USA, dentro de la variedad Michigan Hybrid-18, encontrando cinco plantas, de las que tres resultaron ser auténticos monogérmes, y a partir de una de ellas, SLC101, la monogermia fue distribuida por el mundo (Savitsky, 1950).

El carácter monogermen se debe a un único gen recesivo 'm', de modo que los genotipos *mm* presentan flores aisladas en sus tallos reproductores. En estos genotipos, en cada yema axilar del tallo principal aparece una flor aislada o una rama lateral, pero en ningún caso ambos o más de una sola flor.

En el locus *M/m* que está situado en el segundo grupo de ligamiento (II) (Smith 1980), se conocen cuatro alelos con distintos niveles de dominancia sobre *m* y denominados *M*, *M^{Br}*, *M¹*, *M²*. Además de este locus, parecen existir otros factores modificadores de una naturaleza más compleja que afectan a la expresión fenotípica de genotipos *mm*, de modo que ocasionalmente éstos pueden tener

frutos con dos gérmenes fundamentalmente en la parte más basal del tallo floral principal, y que según nuestra experiencia, hace que la segregación útil en F_2 sea del tipo 1:9, en lugar del esperado 1:3.

Sin haberse confirmado completamente mediante análisis genéticos detallados, parecen existir otras fuentes de monogermia independientes del locus M/m , que se han empleado en el desarrollo de materiales en el Este de Europa (Bosemark, 1987)

3. AUTOINCOMPATIBILIDAD POLEN-ESTILO

En remolacha existe un sistema gametofítico de incompatibilidad polen-estilo que tiene como consecuencia que la mayor parte de los genotipos sean autoincompatibles, es decir que no se puedan autofecundar.

En los sistemas gametofíticos, el genotipo del grano de polen determina la reacción de compatibilidad, es decir un grano de polen no puede autofecundar a un estilo portador de los mismos alelos de autoincompatibilidad.

El sistema en remolacha parece estar condicionado, por lo menos, por cuatro loci distintos: S_a , S_b , S_c y S_d , con dos alelos cada uno: 1 y 2; 3 y 4; 5 y 6; 7 y 8 (Larsen 1978). Cada alelo S en cada uno de los cuatro loci debe coincidir con un alelo idéntico en el pistilo para que se produzca una reacción de auto-incompatibilidad. La existencia de estos cuatro loci impide la autofecundación, pero permite los cruzamientos entre individuos genéticamente muy próximos y que difieran en tan sólo uno de estos alelos. Sin embargo, de acuerdo a Larsen (1982, citado por Bosemark, 1987) la posibilidad de cruzamiento entre individuos muy relacionados por parentesco, lo que conllevaría un incremento significativo en el coeficiente de consanguinidad de una población, se ve compensada por el hecho de que parece existir una fertilización preferencial entre granos de polen y pistilos genéticamente (en base a los alelos S que llevan) muy distantes.

Este sistema de autoincompatibilidad que tiene una influencia capital en el desarrollo de líneas puras empleadas en la obtención de

híbridos (ver apartado VI.3) no es perfecto. Se denomina **pseudo-compatibilidad** al fenómeno de rotura de los sistemas de incompatibilidad, que es frecuente a temperaturas extremas. Debido a este fenómeno, plantas teóricamente autoincompatibles producen semillas de autofecundación. Por este motivo, en Estados Unidos se han venido situando viveros de autofecundación de plantas teóricamente incompatibles en zonas de montaña para asegurarse la **pseudo-compatibilidad** por el efecto combinado de las temperaturas y la altitud.

Como alternativa al empleo de la **pseudo-compatibilidad** en el desarrollo de líneas puras se ha incorporado en algunas poblaciones de remolacha un alelo dominante de autofertilidad (S^F). Plantas de remolacha portadoras de este alelo producen un 90-95% de semillas de autofecundación, incluso si se encuentran rodeadas de otras plantas intercompatibles. Este ha sido el procedimiento más usual para facilitar el desarrollo de líneas puras en Europa.

4. ANDROESTERILIDAD

La remolacha es una especie particularmente versátil desde un punto de vista de su sistema de reproducción. Si bien se trata de una especie naturalmente alógama, debido a la existencia de un sistema gametofítico de autoincompatibilidad, cuando se incorpora el alelo dominante de autofertilidad se convierte en autógama funcional. Paralelamente, los sistemas de androesterilidad permiten modificar aún más su comportamiento reproductivo.

4.1 ANDROESTERILIDAD MENDELIANA

Este tipo de androesterilidad depende de un único gen recesivo (a_1) descubierto por Owen en 1952. Este gen parece encontrarse en el tercer grupo de ligamiento de esta especie (III) (Smith, 1987).

Las plantas homocigóticas recesivas a_1a_1 no presentan polen viable. El uso fundamental de este gen se encuentra en la denominada selección recurrente facilitada por androesterilidad (**male sterile facilitated recurrent selection, MSFRS**, ver sección VI.4) que tiene

como objetivo facilitar el cruzamiento y recombinación de poblaciones autocompatibles, es decir portadoras del alelo de autofertilidad (S^F). Como ya se ha mencionado, la presencia de este alelo prácticamente impide la polinización cruzada.

4.2 ANDROESTERILIDAD CITOPLASMICA

La androesterilidad citoplásmica (CMS) fue descrita en esta especie por Owen en 1942. Su uso a gran escala permite en la actualidad la producción masiva de plantas emasculadas que actúan como parental femenino de híbridos comerciales.

La androesterilidad citoplásmica, o más precisamente nucleocitoplásmica, se basa en la interacción entre genes presentes en las mitocondrias del citoplasma, y dos loci nucleares. Las diferencias en el ADN mitocondrial (Powling, 1982) son las que permiten definir los citoplasmas denominados S (estéril) o N (normal), que interaccionan con dos loci en el núcleo celular denominados Z/z y X/x.

El citoplasma estéril se encontró en una población de remolacha, por lo que este tipo de androesterilidad se denomina autoplasmia, en oposición a la aloplasmia o androesterilidad derivada de cruzamientos intraespecíficos, como en el caso del girasol.

Las plantas de remolacha de genotipo (S)xxzz son completamente estériles; los genotipos (S)Xxzz y (S)xxZz son parcialmente estériles; por el contrario, los individuos (S)XXZZ así como cualquier otro portador del citoplasma normal independientemente de los genes nucleares, tal como el (N)xxzz, son perfectamente fértiles.

Como terminología particular de esta especie a los mantenedores de esterilidad, es decir genotipos fértiles [(N)xxzz] que presentan descendencia estéril cuando se utilizan como polinizadores en cruzamientos con plantas androestériles [(S)xxzz], se les denomina tipos-O.

A diferencia del caso del maíz, otra especie en la que la androesterilidad CMS fue extensamente utilizada, los genotipos mantenedores aparecen en las poblaciones de remolacha con muy baja frecuencia (generalmente menor del 5%), siendo su identificación posible tan sólo después de una

tediosa labor de indexado a partir de la observación de la esterilidad de los descendientes en cruzamientos con líneas femeninas (ver apartado VI.2.1).

A partir de sucesivas autofecundaciones de los genotipos mantenedores encontrados (sólo posibles en zonas elevadas si son autoincompatibles o mediante la incorporación del alelo S^F para convertirlos en autocompatibles) y retrocruzamientos simultáneos con una línea CMS, es posible obtener líneas puras androestériles y sus equivalentes mantenedoras.

V GENÉTICA DE CARACTERES CUANTITATIVOS

Del conjunto de caracteres de la remolacha que presentan una herencia de tipo cuantitativo, a continuación pasamos a analizar, aquellos de mayor importancia, ya sea por su incidencia directa sobre el cultivo en general, o por su especial interés para el cultivo remolachero español.

I PRODUCCION DE AZUCAR

Definida en cuanto al azúcar teórico/ha, es decir, el producto del peso de raíz por el contenido en sacarosa que, como es ampliamente conocido, están correlacionados negativamente.

Los valores de heredabilidad obtenidos han sido:

	Peso	Azúcar %	Azúcar/ha
h^2 (amplia)	0.36-0.59	0.52-0.55	0.59
h^2 (estricta)	0.02-0.16	0.24-0.32	0.09

(Hecker, 1967; MacLachlan, 1972)

Junto a estos datos, los estudios de Smith et al. (1973), mostraron claramente que estos factores de producción, interrelacionados, y de naturaleza cuantitativa, mostraban fundamentalmente varianza genética no-aditiva para la producción de raíz, y la final de azúcar, mientras que en el caso del contenido en sacarosa, la varianza era predominantemente de tipo aditivo.

La depresión por consanguinidad no afecta prácticamente el contenido en azúcar, mientras que en peso, los valores obtenidos son:

$$\frac{S_1}{P} = 86.7 \% \text{ (Hecker, 1972)}$$

y los efectos heteróticos, en los materiales empleados por Helmerick et al. (1963) fueron:

$$\frac{F_1}{P} = 117.7 \% \text{ (raíz); } 103.2 \% \text{ (azúcar \%)}$$

Se desprende de estos resultados que el incremento en producción total debe esperarse más a través del incremento en peso de raíz que del de azúcar %. Sin embargo hay que tener en cuenta las interacciones entre estos factores, ya que generalmente los incrementos en peso van acompañados de disminución en azúcar %, mientras que los incrementos en azúcar % se traducen, en general, en disminución de peso de raíz.

Nuestros trabajos a este respecto, publicados en el Journal of Sugar Beet Research, (Lasa et al., 1989), para determinar la partición de la varianza en base al estudio de 56 híbridos diploides y 64 híbridos triploides incluyendo materiales norteamericanos y europeos, en seis localidades, nos permitieron las estimas que se presentan en la Tabla 2, y de las que se desprende, la importancia fundamental del componente de aptitud combinatoria específica (SCA), así como la interacción significativa entre híbridos y localidades, lo que obliga a tipos de análisis de resultados, capaces de hacer uso de las citadas interacciones, como los propuestos por Romagosa y Fox (1992).

Tabla 2. Partición de la varianza en base al estudio de 56 híbridos diploides y 64 triploides.

Varianza	Peso raíz		Azúcar %		Azúcar/ha	
	2x	3x	2x	3x	2x	3x
Híbridos	4.76**	17.13**	0.16**	0.19**	0.06*	0.27**
Hembras	4.69**	0.00	0.04	0.00	0.09**	0.00
Polinizadores	0.54	8.09**	0.06**	0.12**	0.02	0.10*
SCA	0.33	16.54**	0.08**	0.15**	0.00	0.28**
Híbridos x Local	7.27**	8.37**	0.09**	0.11**	0.30**	0.11**
Hembras x Local	7.96**	1.89	0.02	0.00	0.25**	0.12*
Polin. x Local	1.40*	0.32	0.02*	0.04**	0.05*	0.03
SCA x Localidad	0.00	5.70*	0.06*	0.09**	0.06	0.00
Error	50.60	64.30	0.42	0.49	1.32	1.63

*, ** Probabilidad de error de Tipo I menor que 0.05 y 0.01 respect.

A la vista de la herencia de este carácter, es claro que los procesos de mejora para el mismo deben incluir un fuerte esfuerzo en incrementar la aptitud combinatoria general (GCA) de los materiales, tanto a través de la mejora poblacional, como de buenos sistemas de estimación de la misma.

Se ha comprobado que la mejora para caracteres de producción puede verse facilitada con bajos abonados nitrogenados, ya que de esta forma se incrementa el porcentaje de varianza aditiva sobre el total de genética (Smith et al., 1973).

2 CALIDAD TECNOLÓGICA

Ya se han mencionado en el apartado III algunos factores morfológicos, anatómicos o fisiológicos, que directa o indirectamente afectan al valor

tecnológico de la remolacha, y que deben ser mejorados en las variedades.

Sin embargo, todos aquellos factores son subsidiarios de los principales factores químicos de calidad tecnológica. Como ya hemos comentado las principales características que definen una alta calidad de la remolacha son, el alto contenido en azúcar, y los bajos contenidos de sodio, potasio, alfa-amino nitrógeno y betaína, relativos al porcentaje de azúcar. Para la estabilidad de los jugos en fábrica, es también importante que el contenido de alfa-amino nitrógeno sea bajo en relación al sodio y potasio. Una revisión muy importante, y concienzuda, de esta problemática fue publicada por Oltman, Burba y Bolz en 1984.

Para los caracteres mencionados anteriormente existe variabilidad genética suficiente en la mayor parte de las poblaciones de mejora, sin embargo también se presenta un fuerte componente de varianza ambiental para sodio y alfa-amino nitrógeno. Más aún, todos estos componentes de calidad presentan correlaciones, mas o menos fuertes, entre ellos, y con el peso de raíz, como se aprecia en la Tabla 3.

Tabla 3. Correlaciones entre caracteres de producción y calidad.

	Az. %	Az/ha	K+	Na+	amino N
Peso raíz	-0.68	0.86	0.48	0.52	0.48
Azúcar %		-0.025	-0.64	-0.50	-0.06
Azúcar/ha			0.20	0.33	0.30
Potasio				0.46	0.47
Sodio					0.29

$r \geq 0.48$ (signif. 0.05)

A pesar de la mencionada varianza ambiental, varios estudios han demostrado que para todos los caracteres de calidad la heredabilidad es suficientemente alta, como para que procesos de selección masal rigurosa pudieran ser efectivos. Así Smith et al. (1973), pudieron comprobar que la varianza genética aditiva es predominante para todos los caracteres de calidad, incluyendo el contenido en azúcar. Y esto era

aplicable, tanto en trabajos a baja como a alta fertilización nitrogenada (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de varianza aditiva y no-aditiva en parámetros de calidad (Smith et al., 1973).

	Bajo Nitrógeno		Alto Nitrógeno	
	Caracter Aditivo	No-aditivo	Aditivo	No-aditivo
Sodio	92**	8	88**	12**
Potasio	88**	12**	91**	9
N - Total	57*	43*	88**	12**
N - Nítrico	100**	0	80**	20**
Betaina	86**	14**	97**	3
Amino N	61**	39**	88**	12**
Pureza %	54	46	72**	28**
Azúcar blanco	33	67**	17	83**

*, ** Significativo al nivel del 0.05 y 0.01 respectivamente

Estudios posteriores del mismo autor (Smith y Martin, 1989), han demostrado la eficacia de los sistemas de selección masal recurrente, para incrementar la calidad. A partir de una población heterogénea aplicaron dos ciclos de selección para alto, y bajo, Na, K, y amino N. Cuando compararon las poblaciones resultantes con la original observaron que en la selección por bajo K, este había disminuido en un 26 %, al igual que los otros componentes, menos el Na que aumentó en un 3%. En la población seleccionada por bajo Na, se incrementó significativamente la pureza de jugos y el azúcar extractable, reduciéndose los Cl en un 45 %. En todas las selecciones a la baja, menos en la de K, todos los contenidos de no azúcares disminuyeron. A partir de los resultados de la selección bidireccional, estimaron los valores de heredabilidad en 0.23, 0.66 y 0.81, para Na⁺, K⁺ y amino N, respectivamente.

Estos resultados sugieren fuertemente la aplicación de programas de mejora que hagan uso de los altos componentes de varianza aditiva presentes, y que se traducirían en notables incrementos de la calidad tecnológica.

Volviendo a la interrelaciones entre caracteres (Tabla 3), hemos podido ver que las existentes entre parámetros de calidad son todas favorables, mientras que la correlación con el peso de raíz limita severamente las posibilidades de combinar altas producciones con altos contenidos en azúcar.

Sin embargo, y a pesar de que no sea posible incrementar simultáneamente el peso y la riqueza, a través de selección, los métodos de mejora híbrida ofrecen considerables posibilidades para incrementar la producción de azúcar maximizando el uso de la heterosis para producción de raíz. Esto, unido a bajos niveles de impurezas, debería resultar en incrementos significativos de la producción de azúcar blanco.

La principal razón de la lentitud en la mejora tecnológica, que se ha dado hasta el momento, puede deberse a (1) la baja presión de selección que puede aplicarse a cada carácter cuando se selecciona para varios a la vez, (2) la correlación negativa entre peso de raíz y caracteres de calidad, y (3) la poca adecuación entre los métodos de selección clásicamente utilizados, y la compleja herencia de los caracteres cuantitativos.

Para mejorar esta situación, será necesario incrementar las frecuencias de genes y combinaciones génicas, favorables a la calidad, en las poblaciones diploides monogérmes, así como en las multigérmes. Esta mejora poblacional puede realizarse de forma efectiva por sistemas de selección recurrente, del tipo de los que se presentarán en el apartado VI.4. De esta forma se podrán emplear poblaciones monogérmes mejoradas para estos caracteres, como fuente de líneas de tipo O y sus equivalentes androestériles; y de forma similar a partir de poblaciones multigérmes mejoradas, se podrían desarrollar los polinizadores necesarios.

3 VIGOR DE NASCENCIA

La necesidad de obtener una correcta distribución de plantas en el campo para lograr un cultivo competitivo, está aceptada por la totalidad de los agronomistas de remolacha. La utilización de semilla

monogermen, máxime si se aplica con técnicas de siembra definitiva, hace necesario el disponer de semillas con un alto vigor de nascencia que disminuyan al máximo, los porcentajes de faltas.

La emergencia en campo está controlada por diferentes factores, que pueden ser de tipo:

Físico: Propiedades del lecho de siembra, con especial referencia al tamaño y número de los agregados del suelo, y las disponibilidades de agua (Sperlingsson, 1981)

Ambiental: Tanto por las condiciones durante la nascencia, como por aquellas presentes en la producción de la semilla (McFarlane, 1975)

Genético: Que condicionan las características propias de la semilla (Willey, 1970a,b)

Centrándonos en este último factor de tipo genético, se ha observado, por gran cantidad de autores, la existencia de diferencias varietales, estimándose inicialmente la gran influencia del genotipo materno, así como la existencia de variabilidad que permitiría la mejora de este carácter a través de procesos de selección (Battle y Whittington, 1971). Así mismo se pudo comprobar la influencia del nivel ploídico sobre la capacidad de germinación, mostrándose el diploide como de mayor vigor que el tetraploide (Silván et al., 1972)

La mayor parte de los trabajos realizados sobre emergencia en remolacha azucarera, han pretendido desarrollar métodos de laboratorio que mostraran una alta correlación con la emergencia en campo, ya que desafortunadamente no hay buena correspondencia entre germinación en laboratorio en condiciones óptimas, y emergencia en campo (Perry, 1973; Lexander, 1981).

Nuestros trabajos iniciales a este respecto, pretendieron la comparación de diferentes sistemas, entonces en uso en Europa, tales como la nascencia a través de capa de grava (Maribó), o la germinación con baja temperatura y un golpe final de calor (PBI); junto a diversas modificaciones en cuanto a temperaturas y fechas de conteo. Todos estos sistemas se comparaban con nascencias en campo en fechas óptimas de siembra.

Nuestros resultados (Lasa y Medina, 1981), mostraron claramente que el método que mejor predecía el comportamiento en campo, era la velocidad de germinación a 15°C, con conteo a los 4 días.

Posteriormente, y ante la necesidad de intentar alargar al máximo el período de crecimiento vegetativo, nos planteamos trabajos, en mucha mayor escala, que permitieran identificar criterios de selección relacionados con la posibilidad de siembras tempranas. Estos trabajos se realizaron a nivel multiespecie y con empleo de 26 métodos indirectos distintos (García y Lasa, 1991), comparados con siembras realizadas quince días antes de la fecha óptima.

Los resultados obtenidos nos han indicado que en este caso la prueba que mejor correlaciona con el campo, es la germinación a 10°C, con conteo a los 10 días. Es lógica esta variación con relación a los resultados de 1981, al haber añadido aquí un nuevo factor, como es el adelantamiento en la fecha de siembra.

Puede concluirse que este tipo de criterio indirecto, en base a germinación a baja temperatura, ha mostrado, no sólo en remolacha, sino también en sorgo y maíz, el mayor valor de predicción.

Se han realizado, asimismo, estudios sobre la varianza genética de este carácter, habiéndose observado un componente principal de tipo materno, lo que recomendaría la aplicación de esquemas de selección recurrente sobre poblaciones de tipo O. Aunque de menor importancia, se han podido apreciar aspectos de tipo heterótico con relación al carácter.

4 RESISTENCIA A ENFERMEDADES

4.1 CERCOSPORA

El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Cercospora beticola*, perteneciente a la familia de los Dematiaceos, originándose la contaminación por medio de esporas que germinan sobre las hojas en condiciones idóneas de calor y humedad. Se encuentra ampliamente distribuida en la geografía del cultivo, con especial incidencia en zonas húmedas y cálidas, mostrándose así particularmente impor-

tante en el Sur de Europa, en el Norte y Este de América, y en Japón.

Los síntomas y daños se manifiestan por la aparición sobre el limbo de las hojas de numerosas lesiones circulares de 3-5 mm de Ø, grisáceas, redondeadas y bordeadas de un halo rojo o marrón. A medida que progresa el ataque, las manchas se multiplican y provocan la desecación completa de las hojas infectadas. La planta se recupera entonces emitiendo nuevos brotes foliares, que pueden ser nuevamente destruidos, alargándose la corona, y resultando en importantes pérdidas tanto en peso como en riqueza (Lejealle, 1983).

Estas pérdidas pueden verse muy reducidas mediante la aplicación, repetida y correcta, de fungicidas, que sin embargo, nunca llegan a un control total de la enfermedad. Junto a esto, hay que hacer notar la aparición de nuevas razas del patógeno que han mostrado ser tolerantes a los fungicidas sistémicos normalmente en uso.

En España esta enfermedad puede ser considerada endémica en el Valle del Ebro y en La Mancha, encontrándose algunos ataques en otras zonas de cultivo. Con nuestros sistemas de riego, el problema de la defensa mediante fungicidas se agrava considerablemente en las zonas de aspersión, por el efecto de lavado de la planta.

Se han desarrollado variedades con un diverso grado de tolerancia a la enfermedad, en Europa, Estados Unidos y Japón. En su práctica totalidad provienen de los materiales desarrollados entre 1910 y 1920 en los trabajos del mejorador italiano O. Munerati. A través de cruzamientos entre remolacha azucarera y *Beta maritima*, procedente del estuario del río Po, seguidos de repetidos procesos de selección y recombinación en una zona con fuertes ataques de *Cercospora*, Munerati desarrolló unas poblaciones de remolacha de un buen nivel de tolerancia a la enfermedad (Munerati, 1932).

Este material fue puesto a disposición de los mejoradores italianos, que obtuvieron las primeras variedades con un cierto grado de tolerancia a la *Cercospora*, a partir de las cuales otros mejoradores europeos y americanos accedieron a este tipo de materiales.

A comienzos de la década de los 40, durante su estancia en Alemania, A. Silván accedió a este tipo de materiales, con los que

rápida comenzó un proceso de adaptación a las condiciones españolas, mediante ciclos repetidos de selección recurrente masal, en un área de ataques endémicos de *Cercospora* como el Valle del Ebro. Esto le permitió la obtención de una población diploide, de alta resistencia a la enfermedad, y a partir de la cual, en 1956, obtuvo un equivalente tetraploide mediante duplicación con colchicina.

Esta población tetraploide fue nuevamente sujeta a ciclos de selección recurrente, en este caso incluyendo también genealógicos y de GCA, lo que permitió la obtención de familias tolerantes y con aceptable aptitud combinatoria general. En base a estas familias, combinadas con diploides no resistentes, obtuvo una de las primeras variedades anisoploides de remolacha de reconocida tolerancia a la *Cercospora*, aún en zonas de fuerte ataque del hongo (Silván, 1966).

Estos materiales resistentes presentaban el problema de que en condiciones libres de enfermedad, sus producciones siempre quedaban por debajo de las de los materiales susceptibles (Koch, 1970), hecho que parecía tener su explicación en la dificultad de encontrar genotipos resistentes con aptitud combinatoria realmente buena, y que se achaca principalmente a la base genética tan estrecha de la que todos estos materiales habían comenzado.

Dado que la tolerancia a *Cercospora* es un carácter cuantitativo, con una importancia relativamente alta de los componentes aditivos (Smith y Gaskill, 1970; Smith y Ruppel, 1974), lo que implica una posible utilización del efecto dosis del tetraploide, se planteó en España, un programa de obtención de variedades monogérmes resistentes a *Cercospora*, en base a los materiales tetraploides desarrollados por Silván, y materiales monogérmes susceptibles, de origen americano, en el que se puso un especial hincapié en los problemas de aptitud combinatoria. Resultado del mismo, fue la obtención de cuatro familias polinizadoras de alta aptitud combinatoria general, y que permitieron la obtención del primer híbrido triploide monogermen, y tolerante a *Cercospora* (Lasa et al., 1984), con únicamente un 4-5 % de pérdida de producción en condiciones libres de enfermedad, pero aportando en cambio un incremento, de 1-1.5 puntos, en la calidad industrial del jugo.

Con el conjunto de las familias resistentes, y tras dos generaciones de recombinación entre las mismas, se desarrolló una población tetraploide (AD-2), de alta aptitud combinatoria y resistencia a *Cercospora*, que ha sido inscrita en el Registro de *Crop Science* y puesta bajo "release" público (Lasa y Hecker, 1988).

Como hemos comentado, la base genética, derivada de Munerati, con la que se trabaja es muy estrecha, por lo que parecería conveniente la realización de intentos encaminados a identificar otros biotipos de *Beta vulgaris* ssp. *maritima* resistentes a la enfermedad. En este sentido se han venido realizando muy escasos esfuerzos (Bilgen et al., 1969), aunque en la actualidad y por su relación con la Rizomanía, como luego comentaremos, parecen haberse iniciado nuevos trabajos (Usai, 1988; Whitney, 1989).

Se han realizado diversos intentos, fundamentalmente de tipo bioquímico, para lograr sistemas de evaluación de la resistencia, que fueran más fiables que las evaluaciones de campo. En este sentido Hecker et al. (1975) describieron que las líneas resistentes presentaban un contenido más alto que las susceptibles en el aminoácido dihidroxidofenilalanina (DOPAMIN), e intentaron su aplicación para detectar líneas resistentes. Balis y Payne (1971) aislaron una fitotoxina que infiltrada en las hojas de remolacha, causaba lesiones similares a las de la *Cercospora*, y con la que se ha intentado seleccionar a nivel de cultivos celulares.

Puede concluirse que hasta el momento, el problema de la obtención de variedades resistentes a *Cercospora*, y sin merma alguna en la producción en condiciones libres de enfermedad, en relación con las susceptibles, no está resuelto.

4.2 AMARILLEZ

La amarillez en remolacha es el resultado de uno o más de los tres virus de este tipo, transmitidos por áfidos. Estos virus son:

- BYV, *beet yellows virus*, transmitido por *Myzus persicae* y *Aphis fabae*.
- BMYV, *beet mild yellowing virus*, transmitido por *Myzus persicae*.

- BWYV, *beet western yellowing virus*, transmitido por *Myzus persicae*.

En Europa, donde la amarillez está más presente en el Sur y en el Oeste, el BMVYV es el más común, mientras que en California lo es el BWYV; estando presente en ambas áreas el BYV (Russel, 1968).

Las hojas infectadas por el virus desarrollan inicialmente zonas amarillentas en los ápices y bordes, que posteriormente se extienden cubriendo las zonas entre los haces vasculares. Cuando estas hojas se arrugan con la mano, las zonas amarillentas se rompen con un sonido característico.

La amarillez hace disminuir fuertemente la producción de raíz, la riqueza y la pureza de jugos. Si el ataque se produce en estados iniciales del cultivo, el peso de raíz puede disminuir hasta en un 50 %, y el contenido en azúcar en 1-2 puntos. Dado que raramente todas las plantas de un campo están infectadas, la pérdida general es menor, y se ha estimado en cifras que oscilan entre 5 y 25 % (Björling, 1976). También afecta a los cultivos de portagranos, disminuyendo la producción de semilla.

Dentro del género *Beta* no se ha encontrado, hasta el momento, ninguna fuente de inmunidad para los tres virus, habiéndose identificado, sin embargo, diversos tipos de resistencia, tales como:

- Resistencia al vector (áfido)
- Resistencia a la infección
- Tolerancia al virus
- Resistencia a la multiplicación del virus.

La mayor parte del trabajo de mejora se ha centrado en la selección para tolerancia al virus. Los primeros intentos se llevaron a cabo en Holanda (Rietberg, 1959), y en el Reino Unido (Hull, 1960). Se comprobó que en la mayoría de las poblaciones de remolacha había ciertas plantas que resultaban menos dañadas que otras. Estos resultados animaron a mejoradores de diversos países a intentar programas de selección en este sentido. Es de particular importancia el trabajo llevado a cabo en el extinto Plant Breeding Institute (PBI) de Cambridge, en donde Russel (1960, 1966) desarrolló un sistema de selección

recurrente para producción de raíz, en condiciones de infección controlada, y que le permitió seleccionar líneas con las que obtuvo variedades experimentales tolerantes al virus. Una de ellas, multigermen, Maris Vanguard, fue cultivada en zonas del Este de Inglaterra a finales de los 60.

Esta variedad presentaba bajos contenidos de azúcar y mala calidad tecnológica, lo que hizo pensar en un primer momento, en una cierta correlación entre la tolerancia y estas malas características. Trabajos posteriores han demostrado la falsedad de aquella apreciación inicial, y de esta forma se han ido introduciendo en el mercado diversas variedades monogérmenes combinando muy buenas características con niveles de tolerancia similares a los que presentaba la referida Maris Vanguard.

La herencia de la tolerancia al virus no es conocida, pero los niveles intermedios de tolerancia que se obtienen en cruzamientos entre líneas tolerantes y sensibles, sugieren que la tolerancia se hereda de forma poligénica.

La no existencia de ataques extremadamente virulentos en los últimos años, unida a la aparición de la Rizomanía, se ha traducido en una fuerte ralentización de los esfuerzos de mejora contra la amarillez, que se han dedicado fundamentalmente a la Rizomanía.

4.3 RIZOMANIA

Está causada por el BNYVV, *beet necrotic yellow vein virus*, que se transmite en el suelo por el hongo *Polymyxa betae* (Koch, 1982).

La enfermedad se detectó, por primera vez, en Italia en 1955, posteriormente en Japón en 1966, y en 1972 se declara en Francia, Grecia y Alemania. Desde entonces se ha encontrado en muchos otros países. Estimaciones de mediados de la década pasada, evaluaban el área afectada en más de 100.000 ha. (Richard-Molard, 1985; Le Buanec y Perret, 1986), aunque hoy en día se piensa en cifras aún mayores.

Los síntomas de la Rizomanía se desarrollan de forma gradual, y la planta afectada puede parecer bastante normal hasta el mes de Junio, cuando las hojas comienzan a adquirir coloraciones verde

pálido o amarillento. La lámina foliar es a menudo más pequeña, en una posición más erecta de lo normal, y mostrando síntomas de sequía a pesar de que pueda existir abundancia de agua. La amarillez de los haces vasculares de la hoja, y de su tejido cercano, que es el síntoma que dio nombre a la enfermedad, rara vez se hace patente.

Por otro lado, las raíces presentan síntomas muy característicos y dramáticos, con un tamaño menor y formas irregulares, mostrando un excesivo crecimiento de raíces fibrosas, y una zona necrótica o podrida en la punta de la raíz principal. Si las raíces se cortan longitudinalmente, puede apreciarse que los haces vasculares han adquirido una coloración amarillenta o marrón.

Dependiendo de la intensidad del ataque, la producción puede reducirse hasta en un 75 %, acompañada también de una fuerte disminución en la riqueza y en la calidad de los jugos.

En los últimos 15 años se ha dedicado un esfuerzo considerable a estudiar todos los aspectos de la enfermedad, incluyendo sistemas de reducir el daño a través de prácticas culturales o tratamientos químicos, que hasta el momento no han ofrecido buenos resultados (Koch, 1982; Winner, 1987).

Sin embargo, los mejoradores de remolacha han encontrado que, aunque la inmunidad al virus aparentemente no existe en *Beta vulgaris*, hay genotipos que a pesar de la infección del virus y su posterior multiplicación, presentan síntomas más débiles y una relativamente moderada reducción de la producción (Janvier, 1985). Estos genotipos tolerantes se han encontrado predominantemente en materiales multigérmenes tolerantes a *Cercospora*, cuyos orígenes se remontan a los trabajos de Munerati en el valle del Po, lugar donde se descubrió por primera vez la Rizomanía, y en el que obviamente ha estado presente durante muchos años.

Esta fuente de resistencia a partir de *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, ha sido analizada en profundidad por Whitney (1989), que tras estudiar 63 ecotipos de esta subespecie, en 17 (23%) de ellos encontró plantas con alta resistencia a la Rizomanía. Algunos de estos ecotipos presentaban la totalidad de sus plantas libres de virus, mientras que en

otros la resistencia se presentaba en parte de las plantas. En todos los casos, las plantas resistentes mostraron susceptibilidad al hongo transmisor *Polymyxa betae*.

La herencia de esta resistencia resultó ser de tipo dominante, ya que las plantas F_1 , resultantes del cruce entre estos ecotipos y remolacha azucarera, se mostraron todas ellas resistentes o segregando para resistencia. Sus datos sugieren la posibilidad de seleccionar plantas de *Beta vulgaris* ssp. *maritima* resistentes a Rizomanía, a partir de las que se transferiría la resistencia a la remolacha azucarera.

Otro hecho destacable de estos materiales, es que junto a su resistencia original a *Cercospora*, y la actualmente comprobada a Rizomanía, presentan también resistencia a otras enfermedades como *Erwinia carotovora* (Doney y Whitney, 1990).

Otra vía de solución del problema se plantea a través de técnicas de Ingeniería Genética (Le Buanec y Perret, 1986; Buchting, 1989), mediante protección cruzada con genes de proteína de cubierta, y sobre la que incidiremos en el apartado VIII.

5 RESISTENCIA A NEMATODOS

Alrededor del 10 % de la superficie europea de remolacha se encuentra afectada, en mayor o menor grado, por *Heterodera schachtii*. Los tratamientos químicos se estima que controlan un 80 % de los nematodos, por lo que el 20 % restante es capaz de volver a infectar el campo.

Ya desde 1912 Moltz (1917) intentó obtener variedades de remolacha que fueran resistentes a *Heterodera*., por medio de selección masal de individuos con menores síntomas de ataque en los campos infestados. Desde entonces se han realizado múltiples intentos de selección en remolacha, que tristemente no se han traducido en avances prácticos, como bien describe en su revisión Koch (1988).

El descubrimiento de Krüger et al. (1939) de que tres especies de la sección *Procumbens*, *B. patellaris*, *B. procumbens* y *B. webbiana*, presentaban la característica de que aunque la larva penetraba, no era

capaz de formar quistes, abrió una línea de esperanza para la transmisión de esta característica a la remolacha cultivada.

El principal problema para esto, radicó en la dificultad de conseguir plantas F_1 de los cruzamientos entre silvestres y cultivadas, aunque pudo comprobarse que la resistencia se transmitía de forma dominante (Szota y Szota, 1971).

Savitsky (1960, 1978), a partir de cruzamientos con *B. procumbens*, logró obtener plantas trisómicas resistentes. A partir de las mismas (Tsuchiya, 1986; Nakamura y Tsuchiya, 1988), obtuvieron plantas diploides, que presentaban una inversión paracéntrica, y resultaron resistentes, en base a hipersensibilidad, al nematodo. Sin embargo, la transmisión de esta resistencia es problemática y aún no ha podido ser utilizada en la práctica.

Trabajos similares de ingeniería cromosómica, llevados a cabo por Jung (1987), a partir de *B. procumbens* y *B. webbiana*, mostraron que en ambas especies silvestres hay al menos dos cromosomas portando genes de resistencia a nematodos. Obtuvieron, a través de líneas de adición monosómicas, diploides de remolacha que portaban una translocación incluyendo parte de un cromosoma silvestre, y que mostraban resistencia. Sin embargo, el problema de la baja transmisión de la resistencia, se presenta también en este material.

6 RESISTENCIA AL ESPIGADO

Como ya hemos comentado en el apartado IV.1, el hábito de crecimiento de las remolachas cultivadas es bianual, es decir, en el primer año se produce una raíz cargada de reservas, y que tras un período de bajas temperaturas, vernalizadoras, (Shaw, 1917), y ante la presencia de fotoperíodos largos (Munerati, 1924), emite en el segundo año, tallos florales con la consiguiente producción de semilla.

El problema se plantea cuando la remolacha, durante su ciclo vegetativo, se ve sujeta a temperaturas vernalizadoras, suficientes para cubrir sus necesidades de frío, y entonces ante fotoperíodos

largos, sube a flor con el consiguiente perjuicio para el valor industrial de la planta, que puede concretarse en (Nelson y Deming, 1952; Longden et al., 1975):

- Disminución del contenido en azúcar, de entre el 5 y el 14%.
- Pérdidas en peso, que pueden llegar al 30 %.
- Problemas mecánicos de cosecha, al bloquearse las máquinas con los espigones.
- Problemas en el procesado, debido a la fibrosidad de las plantas espigadas.
- Problemas de semillado, originando dificultades en cultivos posteriores.

En el cultivo primaveral, a no ser que se realicen siembras muy tempranas, el problema del espigado es prácticamente irrelevante, ya que los materiales de mejora existentes presentan, en general, necesidades de frío superiores a las que pueden recibir en este tipo de cultivo.

El fuerte desarrollo que alcanzó el cultivo otoñal en el Sur de Europa, planteó rápidamente el problema del espigado, al permanecer la planta durante el invierno en el campo. Valga como ejemplo, que en series de ensayos, realizados por el CSIC entre 1963-64 y 1972-73, se llegaron a obtener espigados de hasta el 55.5 % en alguna variedad comercial, siendo muy frecuentes espigados superiores al 5%, lo que ya supone un auténtico problema en el campo.

El hecho de la gran variación de espigado que se presentaba de unos años a otros, nos indujo a analizar sus causas. Era claro que el fotoperíodo no variaba entre años, por lo que el análisis se centró en problemas de temperatura. De esta forma, y en base al análisis de nueve campañas remolacheras, pudimos concluir que el número de días con temperatura mínima entre 2 y 8°C está íntimamente ligado al porcentaje de espigado, permitiendo de esta forma, una predicción del mismo con prácticamente dos meses de antelación (Lasa, 1977).

Esta posibilidad de predecir el espigado, y los resultados iniciales de algunos reguladores de crecimiento como inhibidores del espigado (Lexander, 1967), nos indujo a analizar en profundidad este

problema. Nuestros resultados con CCC y Ethrel, que mostraban una cierta disminución del espigado, sin depresión en el valor productivo (Lasa y Pérez-Peña, 1976), ofrecieron ciertas esperanzas a esta solución. Sin embargo, como veremos posteriormente, los resultados de la mejora nos hicieron abandonar esta posible solución química.

Coincidente en el tiempo, quisimos analizar las posibilidades genéticas de selección de los materiales de mejora españoles. Con este fin y mediante la técnica de inducción fototérmica controlada (Margará, 1960), procedimos al estudio de los mencionados materiales, pudiendo comprobar la existencia de suficiente variabilidad para iniciar trabajos de mejora (Lasa y Sanz, 1976).

Para obtener materiales resistentes, intentamos tres tipos de selecciones, con los resultados y desarrollos que se especifican a continuación.

(a) *In situ*

En base a selección en cultivo otoñal en Andalucía. Este procedimiento tuvo que ser abandonado rápidamente por dos causas, en primer lugar el diferencial de selección era errático, al variar mucho de año a año según las temperaturas, y escaso para incrementar seriamente la resistencia. Por otro lado se nos presentaron graves problemas de conservación de las raíces seleccionadas.

(b) En zona no remolachera, pero de alto espigado

En base a los estudios de predicción de espigado, ya comentados, y tras un análisis climatológico, se encontró que la zona del Delta del Ebro, presentaba integrales térmicas que aseguraban índices de selección presuntamente interesantes.

Se procedió a dos ciclos de selección masal recurrente, sobre tres poblaciones escogidas, con resultados muy interesantes que permitieron elevar la resistencia al espigado a límites aceptables para el cultivo otoñal, y deducir a su vez que la herencia del carácter era de tipo claramente aditivo, y de buena respuesta a las selecciones masal o genealógica recurrente.

Este tipo de herencia, eminentemente aditiva, aunque presentando ciertos efectos heteróticos, fue confirmada posteriormente por Desprez (1980), y ampliada su explicación a través de dominancia de la resistencia sobre la susceptibilidad, por Le Cohec y Soreau (1989)

(c) Inducción fototérmica controlada

A la vista de los resultados que se habían obtenido en los estudios de variabilidad genética por medio de la técnica de Margará (1960) de inducción fototérmica, se quiso profundizar en los diversos aspectos de la inducción, analizando los efectos de la edad de la planta, la eficacia de temperaturas vernalizadoras, la duración del tratamiento frío, el fotoperíodo e intensidad de la luz durante el tratamiento frío, y por fin, fotoperíodo, intensidad luminosa y temperatura, en el período postvernalizador.

Estos resultados fueron publicados por la Fundación Juan March, en el libro titulado "Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera" (Lasa y Silván, 1977), y permitieron el desarrollo de una técnica de selección, mediante inducción fototérmica, que en base a la longitud del período de frío, permite marcar con exactitud, los índices de selección, y que es hoy utilizada en varios Centros de Mejora de remolacha en el mundo, tanto públicos como privados.

La aplicación de esta técnica a nuestros materiales, nos permitió alcanzar niveles de resistencia suficientes para eliminar totalmente el problema de la resistencia al espigado en el cultivo otoñal. Fruto de los mismos, y junto a otras, se encuentra la población AD-3, inscrita en el Registro de *Crop Science* de los Estados Unidos, y en "release" público (Lasa y Hecker, 1988).

Así mismo, los parentales de las variedades Adamono, Adamonorte y Adamonosur (Lasa et al., BOE 2/5/83), obtuvieron su resistencia al espigado en base a este tipo de selección.

Un último problema en relación con el espigado, es el relativo a la multiplicación de las variedades de alta resistencia, ya que la misma, puede traducirse en espigados no completos durante el ciclo reproductor. Con este fin realizamos ensayos de producción en tres

zonas de plantones y ocho zonas de portagranos, acompañados de los oportunos estudios de integral térmica. A partir de estos trabajos se comprobó la existencia en España de zonas perfectamente apropiadas a la producción de semilla de variedades resistentes, así como que el factor limitante se encuentra en la zona de producción de plantones, siendo un buen patrón para su elección, la búsqueda del máximo número de días con temperaturas mínimas entre 3 y 10°C (Lasa y Medina, 1978).

VI METODOS DE SELECCION

1 SELECCION MASAL

Se basa en la selección de los individuos, fenotípicamente más valiosos de una población, y su posterior recombinación, reconstituyéndose así la nueva población. De los factores que determinan la eficacia de la selección masal, la heredabilidad del carácter en selección es el más importante, de lo que se deduce que este tipo de selección es más efectiva para aquellos caracteres controlados por pocos genes, y que puedan ser fácilmente evaluados. Por el contrario, en aquellos caracteres, como la producción, que están regidos por muchos genes, y que no pueden ser debidamente evaluados en base a los resultados de una planta individual, este sistema es muy poco efectivo.

Es por tanto muy necesario cuando se emplea la selección masal, intentar reducir la variabilidad ambiental, por lo que las parcelas de selección deben situarse sobre campos conocidos por su uniformidad, y evitar al máximo la existencia de fallos, o daños irregulares por enfermedades o plagas. Sin embargo, en la práctica siempre se presentan diferencias en el interior de la parcela, por lo que deben adoptarse sistemas encaminados a paliar estas irregularidades, como

los descritos por Gardner (1961), dividiendo el campo en pequeñas subparcelas de las que se selecciona un número igual de raíces por subparcela, o el "honeycomb" (Fassoulas, 1973) en base a valoración de cada planta en relación con las seis que le rodean.

Un hecho de importancia en el caso de la remolacha, y que incrementa la eficacia de este método de selección, es el relativo al momento de la selección. Al poderse realizar con anterioridad a la floración, únicamente las plantas seleccionadas son las que se cruzan para constituir la nueva generación.

Como hemos comentado, la eficacia de la selección depende del modo de herencia del carácter en estudio. Es claro que una selección contra un carácter de herencia simple dominante, como sería por ejemplo para eliminar plantas de hoja roja, la eficacia es 100 % en una única generación. Sin embargo si lo que se quisiera fuera eliminar el alelo recesivo, es decir conseguir una población 100 % de hoja roja, sería muy difícil fijar ese carácter en una especie en la que la heterocigosis se mantiene constantemente a través del carácter alógamo de la especie.

Para caracteres cuantitativos condicionados por muchos genes, cada uno con un pequeño efecto, es en la práctica imposible alcanzar los límites teóricos de selección. Esto ocurre incluso cuando todos los genes involucrados tuvieran efectos aditivos. Sin embargo, en estas circunstancias uno siempre puede esperar una mejora continuada a través de las generaciones.

Si junto a efectos aditivos, aparecen interacciones alélicas de importancia, la selección rápidamente resulta en una población constituida por una mezcla de genotipos que no cambian, alcanzándose una nula eficacia en el sistema. Sin embargo, y a pesar de que esa población seleccionada pueda parecer muy constante, es aún genéticamente heterogénea, por lo que si se inicia bajo otras condiciones ambientales, o con intensidades o direcciones de selección distintas, puede responder de nuevo a la selección.

En remolacha el sistema tradicional de selección masal es el que se presenta en la Figura 9, con parcela en retícula de Gardner, y en la que se seleccionan las raíces, en el campo, por tamaño y características morfológicas, para posteriormente analizar sus caracteres químicos,

a nivel de planta individual, en laboratorio. Las raíces así seleccionadas, y una vez vernalizadas, florecen en conjunto dando lugar a la nueva población.

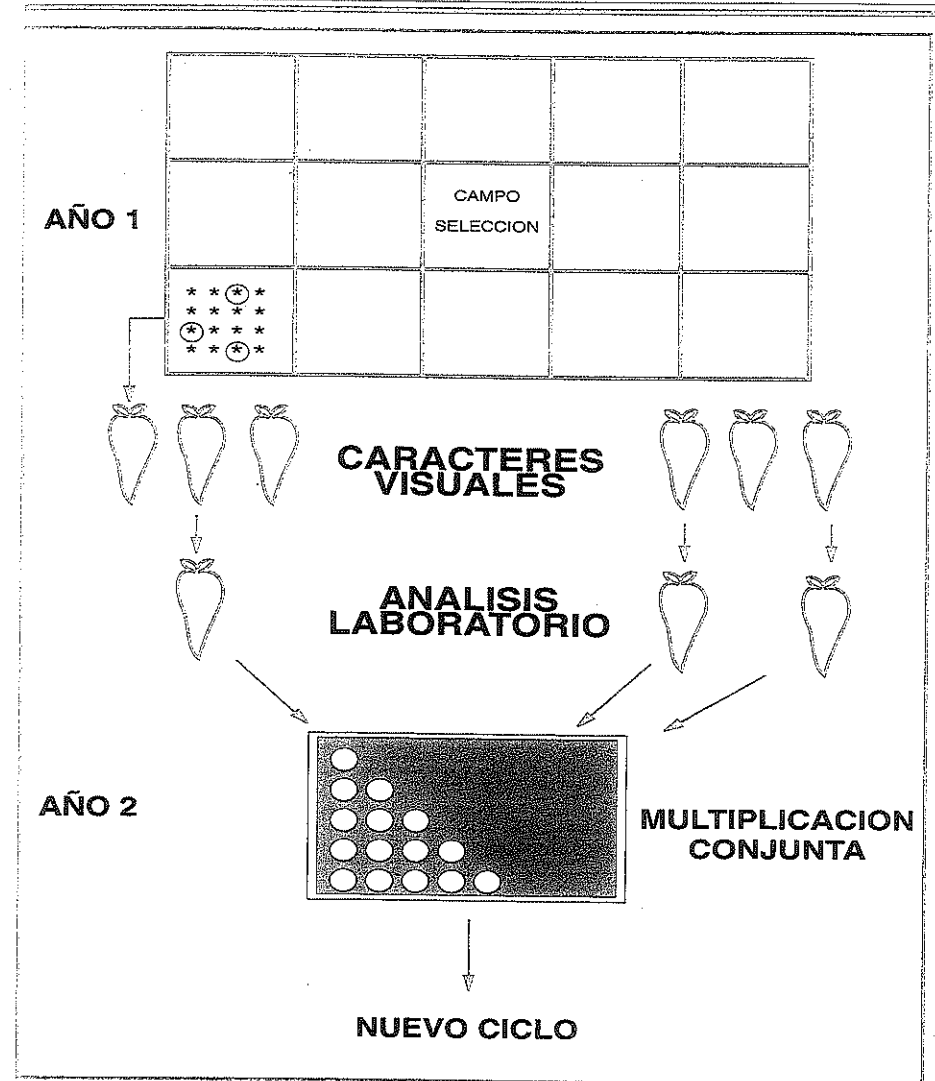


FIGURA 9
Selección masal en remolacha azucarera.

Estos sistemas han sido efectivos para diversos caracteres de remolacha, como la resistencia al espigado (Bell, 1946; Campbell, 1953), forma de raíz y corona (Meskens, 1989), resistencia a ciertas enfermedades (Coons, 1954; Silván, 1966; Lasa et al., 1984), etc.

También ha sido efectiva para incrementar la riqueza y los diferentes caracteres de calidad, que en general son regidos por poligenes de fuerte componente aditivo (Smith et al., 1973) y que presentan un nivel aceptable de heredabilidad (Hecker, 1972; MacLachlan, 1972a, 1972b, 1972c).

Para producción de raíz, que está principalmente regida por genes actuando de forma no aditiva, y presenta una baja heredabilidad, la respuesta a la selección masal sobre poblaciones adaptadas es, en el mejor de los casos, lenta y errática. Junto a la comentada baja heredabilidad del carácter, otro factor de gran importancia para justificar su ineficacia en este carácter, es la variabilidad debida a competencia intergenotípica (Litcher, 1972), que se ha llegado a estimar en más del 50 % del total de la varianza fenotípica presente (Litcher, 1975).

Para el carácter más importante, es decir, la producción de azúcar, la selección masal se define como totalmente inefectiva, al menos a partir de un cierto nivel de producción. Aunque la producción de azúcar es un efecto combinado de la riqueza y la producción de raíz, es este último carácter el que la condiciona fundamentalmente, por lo que lo comentado en el párrafo anterior es de total aplicación a este carácter, que además se ve negativamente influenciado por la correlación existente entre peso de raíz y riqueza.

Se ha comprobado repetidas veces que si se aplica selección masal para contenido en azúcar, el peso de raíz disminuirá de tal forma, que en conjunto la producción final de azúcar se ve también reducida (Figura 10). Por otro lado, si intentamos seleccionar simultáneamente para ambos caracteres, y junto a esto queremos tener en cuenta caracteres de calidad, la intensidad de selección se ve frecuentemente reducida hasta tal punto, que lo que se genera son siempre combinaciones intermedias sin posibilidad de mejora.

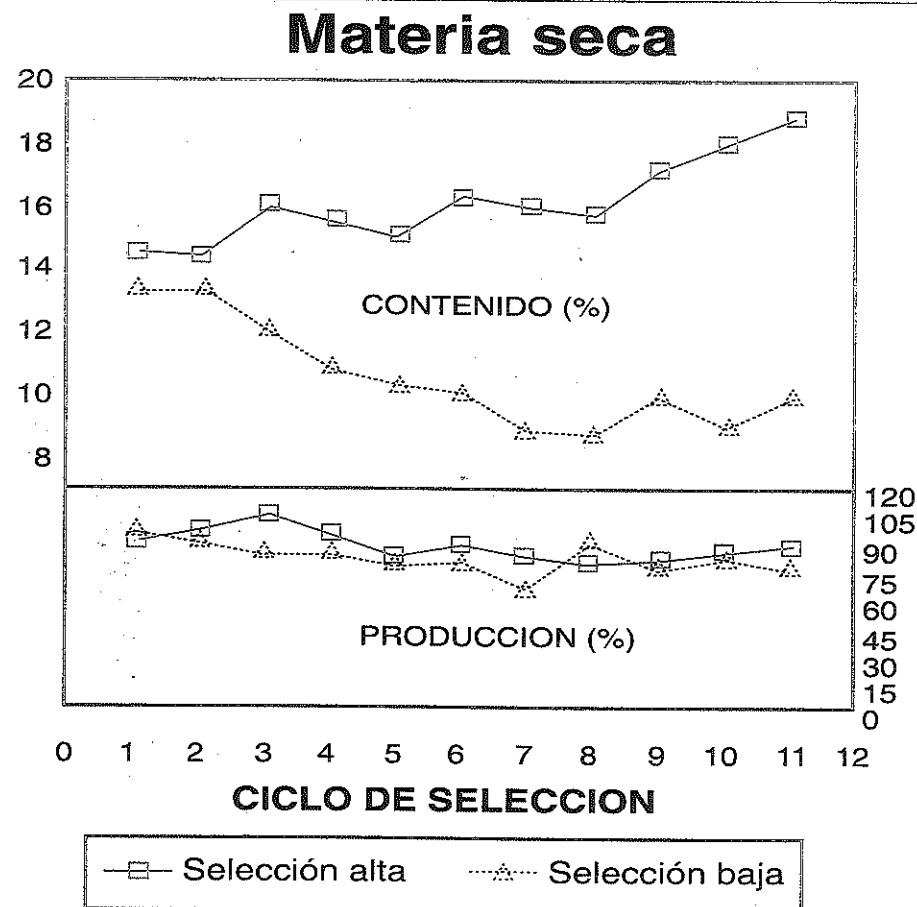


FIGURA 10
Selección divergente para contenido en materia seca en remolacha forrajera y respuesta indirecta sobre la producción total.

A pesar de todo lo que se ha comentado sobre la selección masal para producción de raíz o de azúcar, sería erróneo concluir diciendo que es siempre inefectiva para estos caracteres. Especialmente cuando se quieren adaptar nuevos materiales a nuestras condiciones, la selección masal recurrente durante varios ciclos, constituye un método importante y rentable, que se ve asistido incluso por fenómenos de selección natural.

En resumen y cuando uno se plantea la posibilidad de empleo de selección masal para un cierto carácter, debe de juzgarse a la vista de:

- a.- Si la población ya ha sido seleccionada y está bien adaptada.
- b.- Heterogeneidad de la población.
- c.- Proporción de varianza aditiva en el carácter en estudio.
- d.- Capacidad de controlar la varianza ambiental.
- e.- Importancia de la competencia intergenotípica.
- f.- Posibles correlaciones negativas con otros caracteres de interés.
- g.- Economía y utilidad de otros métodos alternativos.

2. SELECCIÓN GENEALÓGICA

El mejor sistema para distinguir entre plantas que son superiores debido a un ambiente favorable particular, de aquellas que lo son debido a su mejor constitución genética, es el ensayo de descendencias. La selección basada en el valor de las descendencias, es la denominada selección genealógica o de familias.

2.1 SELECCIÓN DE MEDIOS HERMANOS

El proceso inicial de selección en campo, laboratorio, vernalización y plantación para producción de semilla, es similar al de la selección masal. Sin embargo en el momento de la cosecha de semilla, esta se realiza en base a planta individual, con lo que toda la semilla cosechada en una misma planta está constituida por medios-hermanos, ya que proceden de la misma madre, pero han sido polinizadas por el resto de las plantas seleccionadas.

Con esta semilla se realizan, por un lado ensayos de evaluación de estas familias, y por otro producción de plántones. A la vista de los resultados de los ensayos, se seleccionan las familias mejores. Los plántones de estas familias se mezclan antes de su plantación para constituir así la nueva población reconstruida.

La eficacia de este método para mejorar el valor de la población, dependerá de la capacidad de los ensayos para discriminar las familias

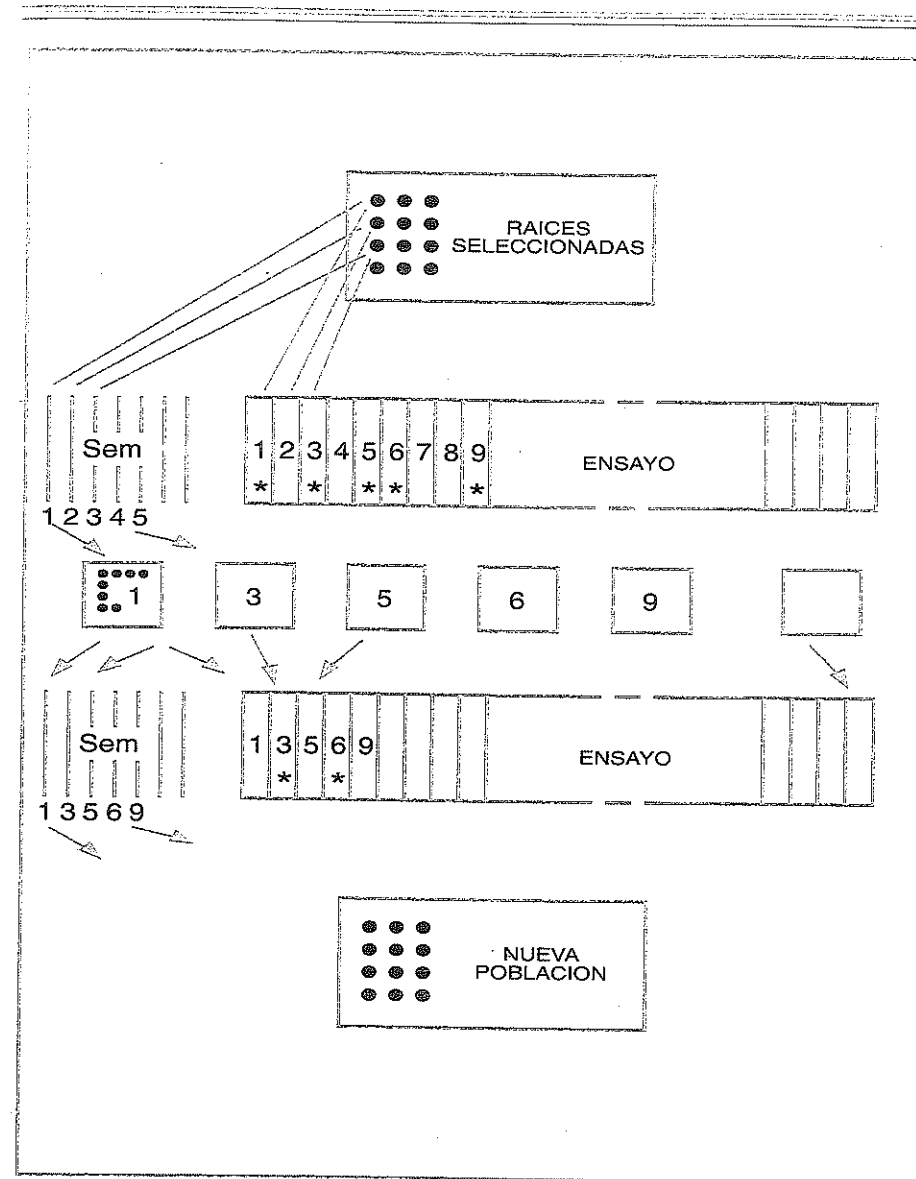


FIGURA 11

Selección genealógica de medios hermanos en remolacha azucarera.

genéticamente mejores, y también del tipo de acción génica que controle los caracteres bajo selección. Al tratarse de semilla producida en una sola planta, las cantidades obtenidas permiten únicamente una evaluación muy restringida, y junto a esto, si el carácter en selección es la producción, los mejores resultados los suelen presentar las familias con alto grado de heterocigosis e interacciones alélicas favorables, y esta superioridad no se la transmitirán a sus descendientes.

Para solucionar parcialmente esta endeblez del método, las familias seleccionadas tras un año de ensayos, se multiplican aisladamente para proceder así a un segundo año de ensayos, que permite una mejor evaluación de las familias, al haberse reducido la heterocigosis y poderse realizar ya en más localidades. Tras esta segunda evaluación se procede a la reconstitución de la población (Figura 11).

Si este proceso se realiza cíclicamente, recibe el nombre de selección recurrente de medios hermanos.

2.2 SELECCIÓN DE HERMANOS COMPLETOS

Consiste en una variante del método anteriormente descrito, que se basa en el agrupamiento por parejas de las raíces seleccionadas, obteniéndose así familias de hermanos completos, y una cantidad de semilla superior.

Debido a su constitución, las diferencias entre familias son más fácilmente detectables, pero sin embargo, el problema de enmascaramiento de resultados por heterocigosis aún es más acusado, por lo que se recomienda fuertemente el proceder a una generación de multiplicación de cada familia. Se han descrito muy diversas variantes sobre este proceso con resultados diversos (Hecker y Helmerick, 1985).

La selección genealógica fue introducida en remolacha por Louis de Vilmorin a mediados del siglo XIX, y se la considera responsable de los rápidos avances iniciales en producción que se alcanzaron hasta 1920. Aunque es sin duda más efectiva que la selección masal, la genealógica tampoco consigue incrementar los niveles de producción

de azúcar por encima de un cierto nivel. Sin embargo para caracteres cuya varianza genética es principalmente aditiva, pero que presentan baja heredabilidad, sigue considerándose un método de gran interés, con una gran incidencia en caracteres de calidad tecnológica que no presentan efectos heteróticos cuando se cruzan materiales diversos, y que sin embargo deben cumplir unos mínimos para generar variedades comerciales.

3 CONSANGUINIDAD

Como ya se ha comentado, en todo trabajo de selección en especies alógamas, es de gran importancia controlar la polinización sobre las plantas seleccionadas. La forma más extrema de este control, es forzar a estas plantas a la auto-polinización, lo que nos lleva de forma rápida a la consanguinidad.

Las consecuencias principales de la consanguinidad son:

- Incremento de la homocigosis
- Aparición de tipos letales y subletales
- Separación del material en tipos muy diversos
- Disminución del vigor y la fertilidad.

Las especies difieren fuertemente en relación a su tolerancia a la consanguinidad, y la remolacha puede definirse como bastante sensible, por lo que líneas que han sido sometidas a unas pocas generaciones de autofecundación, producen normalmente menos de la mitad que una variedad comercial.

Sin embargo y a pesar de estos problemas, la consanguinidad se aplica en los programas de mejora, por alguna de las razones que se exponen a continuación:

- Para facilitar la selección y la fijación de biotipos con caracteres, o combinaciones de caracteres, especiales.
- Para eliminar de la población genes recesivos causantes de anomalías o debilidades en general.

- Para romper la heterocigosidad de los individuos seleccionados, y a través de ensayos de la generación autofecundada, obtener una mejor información sobre su valor real de mejora (Ensayos de S_1).

- Para obtener líneas puras, encaminadas a la producción de variedades sintéticas o híbridas.

Aparte de la consanguinidad derivada de aplicar sucesivos ciclos de selección genealógica sobre familias seleccionadas anteriormente, la consanguinidad en sentido estricto ha sido empleada muy raramente en el desarrollo de variedades compuestas ó sintéticas en remolacha. Existían varias razones para esto, siendo quizás la principal que con este proceso se favorecía indirectamente a aquellas líneas con mayor tendencia a la autopolinización, lo que dificultaba posteriormente una correcta hibridación en la constitución de las variedades sintéticas.

Sin embargo, después de la introducción de la androesterilidad citoplásmica, y las técnicas de mejora de variedades híbridas, la importancia de la consanguinidad se hace muy fuerte, y se convierte en un método fundamental de la mejora de remolacha azucarera. A pesar de que el objetivo principal en la aplicación de estos métodos sea la obtención de líneas puras, no por ello se desprecian las otras ventajas comentadas anteriormente.

La obtención de la líneas puras en remolacha es similar a la empleada en maíz, por el procedimiento de planta autofecundada-línea. Las líneas no apropiadas se eliminan, obteniéndose semilla autofecundada a partir de las mejores plantas de las líneas seleccionadas (Figura 12). Esta semilla constituirá la línea del siguiente año del proceso. Es importante hacer notar que los parámetros para seleccionar estas plantas, durante el proceso de consanguinidad, se centran todos ellos en características como portagranos, es decir, vigor, ramificación, monogermia, tamaño de semilla, producción de semilla, sanidad, etc., no prestando atención a caracteres de producción de raíz que se verían muy falseados por el propio proceso de consanguinidad, y que deberán ser seleccionadas en base al resultado de cruzamientos entre líneas.

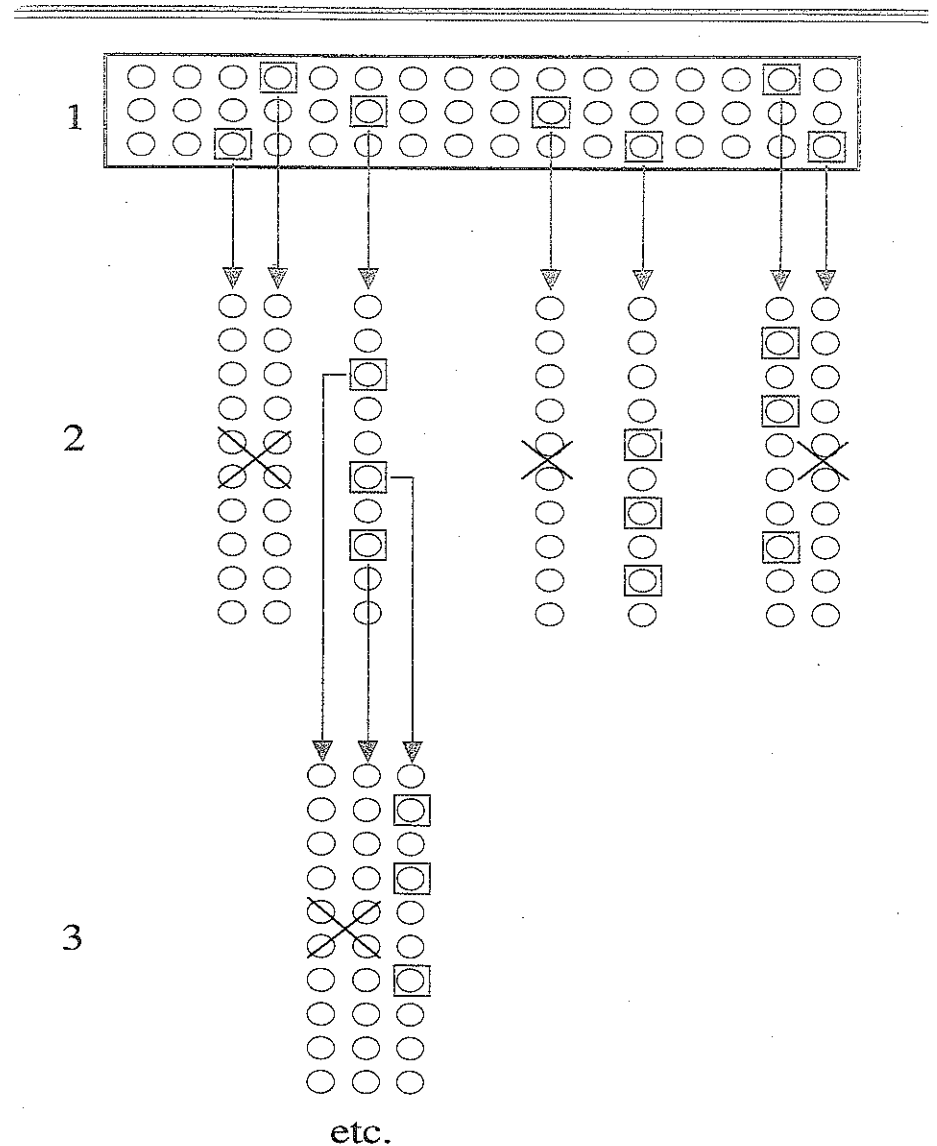


FIGURA 12
Obtención de líneas puras (los números indican generaciones).

4. SELECCIÓN RECURRENTE

Este nombre incluye un conjunto de métodos encaminados a la mejora de poblaciones, desarrollados inicialmente para incrementar la frecuencia de genotipos deseables en poblaciones de maíz, para ser utilizadas como fuente de obtención de líneas puras.

Hull definió "La selección recurrente implica la reelección en sucesivas generaciones, con intercrucamiento de los individuos seleccionados para obtener recombinación genética. Esta selección no es recurrente, mientras los individuos seleccionados no sean intercrucados y se inicie así un nuevo ciclo de selección".

Se definen cuatro tipos principales de selección recurrente, que han sido y son de gran importancia en la mejora de remolacha azucarera:

a) Selección recurrente simple (SRS), en la que la selección se basa únicamente en el fenotipo o en el ensayo de la descendencia de S_1 . Este caso incluye los procesos repetidos de selección masal ó de selección genealógica.

b) Selección recurrente para aptitud combinatoria general (RSGCA), en la que la selección se basa en el resultado de los cruzamientos entre los elementos seleccionados y un probador heterocigótico general.

c) Selección recurrente para aptitud combinatoria específica (RSSCA), similar a la anterior, pero el probador se elige para proveer información sobre aptitud combinatoria específica, como por ejemplo un parental concreto de una variedad comercial.

d) Selección recurrente recíproca (RRS), que involucra a dos poblaciones A y B. Cada población se maneja como selección recurrente para aptitud combinatoria general, siendo la población B el testador de la A, y la A el de la B, con lo que se potencia una gran aptitud combinatoria entre las líneas que se obtengan de ambas poblaciones.

Tal como se desarrollaron originalmente en maíz, estos métodos requerían (1) que las plantas seleccionadas fueran autofecundadas,

(2) que las descendencias de las plantas mejores fueran intercrucadas en todas las combinaciones posibles, y (3) que el material de partida del siguiente ciclo de selección estuviera constituido por cantidades iguales de semilla de cada cruzamiento.

En el caso de remolacha, estos condicionantes iniciales dificultaron la aplicación de las selecciones recurrentes para aptitud combinatoria general, aptitud combinatoria específica, ó recurrente recíproca, debido fundamentalmente a la generalizada autoincompatibilidad de los materiales empleados, lo que propició el desarrollo de modificaciones alternativas para su uso. Así Powers et al. (1957) propusieron dividir cada raíz seleccionada, conservando una parte en estado vegetativo hasta conocer los resultados de las pruebas de cruzamiento. En 1971 Barocka (1985) propuso la realización de cruces dialélicos entre las plantas seleccionadas, y basar el siguiente ciclo de selección en aquellos cruzamientos que hubieran dado mejores resultados en los ensayos. La puesta a punto de las técnicas de propagación *in vitro* (Atanassov, 1986), ha permitido abaratar y hacer muy asequibles propuestas como la realizada por Powers et al.

Sin embargo, dado que la autofecundación es un procedimiento excelente para preservar los genotipos seleccionados, y la evaluación de S_1 es muy útil para la selección, sería muy ventajoso si ambas operaciones se incorporaran en un sistema de selección recurrente en remolacha. Especialmente si el objetivo de esta selección es crear poblaciones para extraer líneas puras, los problemas se solucionan mediante la introducción en las poblaciones de plantas, llevando el gen de autofertilidad y segregando para androesterilidad nuclear (Bosemark, 1971b). Con este sistema lo que se consigue es manejar una especie alógama en origen, como autógena ó alógama a voluntad, y a partir de la misma se pueden aplicar esquemas en remolacha azucarera, consistentes en: a) Recombinación, a través de la cosecha sobre las plantas androestériles, b) Ensayos de descendencias de medios hermanos combinada con selección masal en las descendencias seleccionadas, c) Producción de S_1 sobre las raíces seleccionadas de las descendencias seleccionadas, d) Evaluación de las S_1 , e) recombinación de las S_1 seleccionadas, etc. (Figura 13).

Esta filosofía de empleo de autofertilidad y androesterilidad nuclear, que elimina las limitaciones impuestas por las características de autogamia o alogamia de las especies, y que inicialmente fue propuesta por Gilmore (1964), ha permitido desarrollar esquemas de selección recurrente en un gran número de especies, independientemente de su constitución, tales como cebada (Jain y Sunneson, 1964; Lasa et al., 1987; Lasa y Bosemark, 1992), sorgo (Doggett y Eberhart, 1968), soja (Brim y Stuber, 1973), trigo (Driscoll, 1977), etc., habiendo sido denominada **male sterile facilitated recurrent selection (MSFRS)**.

En el caso de remolacha, y con este tipo de poblaciones, se han podido diseñar y practicar varios modelos de selección recurrente, tanto para el desarrollo de poblaciones monogérmes - autofértiles - tipo O, y sus equivalentes androestériles citoplásmicos, como para la mejora de las poblaciones polinizadoras.

Tras la propuesta inicial de Bosemark (1971b) se han realizado diversas aproximaciones y estudios que han permitido analizar la eficacia de estos sistemas. Doney y Theurer (1978) propusieron un sistema de selección recurrente recíproca que utiliza dos poblaciones monogérmes - tipo O - autofértiles, segregando para androesterilidad nuclear, y dado que la producción de raíz está principalmente condicionada por factores no aditivos, y el contenido en azúcar por efectos aditivos, la selección recurrente recíproca parece muy apropiada para el desarrollo de líneas encaminadas a la producción de híbridos simples. Hecker (1985) llevó a cabo dos ciclos de selección recurrente recíproca, con énfasis por separado, en producción de azúcar blanco, producción de raíz y contenido en azúcar, dando lugar a tres poblaciones de cada tipo; en este caso no sólo incrementó el valor "per se" de las poblaciones, sino que los híbridos entre las mismas dieron resultados significativamente superiores en cuanto a producción final de azúcar, confirmando que este sistema de selección recurrente recíproca ofrece muy altas perspectivas para el desarrollo de híbridos simples en remolacha azucarera.

SIMPLE RECURRENT SELECTION IN SUGAR BEET

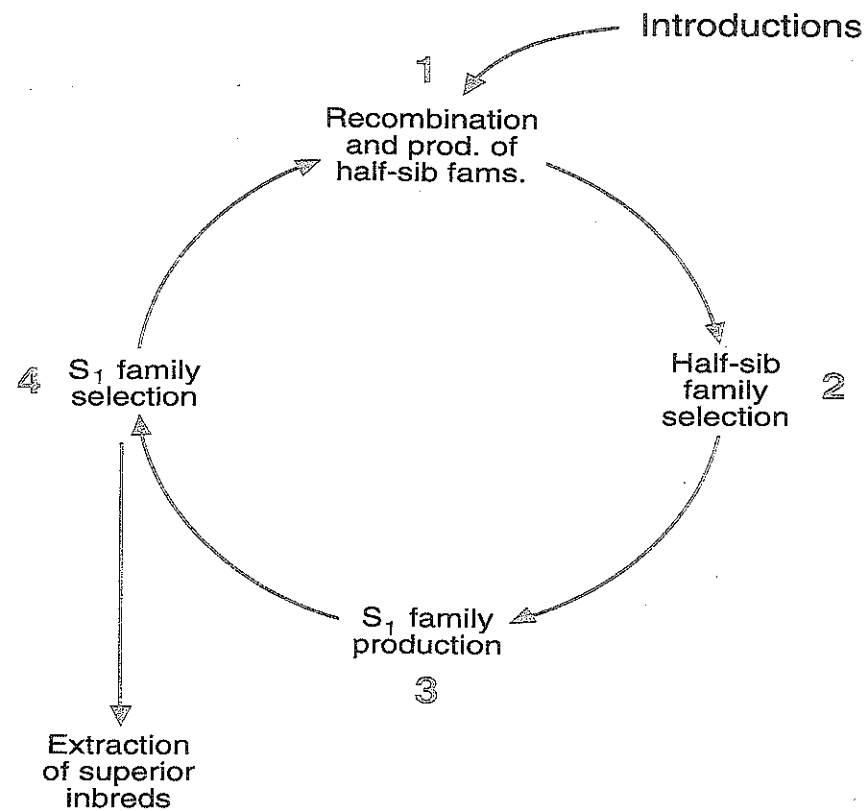


FIGURA 13

Selección recurrente en remolacha azucarera (Lasa y Bosemark, 1992).

VII TIPOS DE VARIEDADES

1 VARIEDADES SINTÉTICAS

1.1 DIPLOIDES SINTÉTICOS

Las líneas constituyentes de una variedad sintética pueden ser combinadas en diferentes formas, siendo común en todos los casos, que la semilla comercial consista en generaciones avanzadas de los cruzamientos entre líneas. Aunque en diploides una cierta parte de los efectos heteróticos se ha perdido en la generación F_2 , es el único procedimiento utilizable cuando las variedades sintéticas se basan en clones o líneas puras, difíciles y caras de reproducir en gran cantidad.

Sin embargo si las líneas componentes pueden ser multiplicadas suficientemente, la generación F_1 entre ellas puede ser utilizada como semilla comercial, evitando así las mencionadas pérdidas de producción de la F_2 . Este último sistema es el que se ha empleado en remolacha durante cerca de 50 años, hasta la llegada de las variedades híbridas. Muchos mejoradores han denominado a estas variedades "multilíneas", pero cuando sus componentes se han seleccionado en base a su aptitud combinatoria mutua, parece más apropiado denominarlas "sintéticas de primera generación".

Los componentes de estas variedades sintéticas en remolacha, han sido usualmente familias o poblaciones, de orígenes diversos, y desarrollados a través de métodos genealógicos o de consanguinidad.

Tras seleccionar estos componentes por su valor "per se", en cuanto a producción, riqueza, impurezas, resistencias, etc., se procede a su evaluación de aptitud combinatoria general. Esto suele ser realizado a través de "top cross", "polycross", o series de cruza-mientos simples, siendo necesario para decidir cuales son los componentes que mejor combinan, la realización de ensayos en varias localidades y durante dos o tres años.

En los componentes seleccionados, se realiza un proceso de multiplicación individualizada, hasta alcanzar cantidades suficientes de semilla madre. En ese momento se realiza una mezcla con iguales cantidades de semilla de cada componente, con la que se producen plantones, que darán lugar a la semilla comercial de la variedad sintética.

1.2 VARIEDADES ANISOPLOIDES

La semilla de las variedades anisoploides de remolacha, frecuente pero incorrectamente llamadas poliploides, se produce al cultivar plantones diploides y tetraploides mezclados, y que se polinizan libremente. La semilla resultante da lugar a una mezcla de diploides, triploides y tetraploides, en diferentes proporciones derivadas de la proporción de plantones diploides y tetraploides.

La razón para producir variedades anisoploides fue que, en promedio, los triploides resultaban ser más productivos que diploides y tetraploides, y hace 35 años cuando este tipo de variedades se desarrolló inicialmente, la androesterilidad no estaba disponible en remolacha, y la semilla triploide pura no podía ser producida. Su introducción en Europa fue relativamente rápida y reemplazaron totalmente a las variedades diploides.

2 VARIEDADES HÍBRIDAS

En la producción de las variedades sintéticas, diploides y anisoploides, de primera generación el objetivo era el hacer uso de los efectos heteróticos resultado del cruzamiento entre algunos genotipos no relacionados. Sin embargo, el descubrimiento de la androesterilidad citoplásmica en remolacha (Owen, 1945), hizo posible obtener estos efectos más eficientemente a través del empleo de líneas androestériles para la producción de variedades híbridas (Owen, 1948, 1950, 1954a), y a lo largo de las dos últimas décadas las variedades sintéticas han sido sustituidas por variedades híbridas en la práctica totalidad de los países cultivadores.

Parte de la causa de este rápido cambio a las variedades híbridas, ha sido que la androesterilidad citoplásmica y la monogermia fueron asequibles simultáneamente para los mejoradores, coincidiendo en el tiempo con problemas de escasez de mano de obra en muchos países.

Enfrentados con el problema de tener que desarrollar rápidamente variedades monogérmicas genéticas, con características de producción y calidad satisfactorias, la elección de un programa de mejora por híbridos para la monogermia fue lo más adecuado. En primer lugar, un programa híbrido no requería la incorporación del carácter monogermen a la totalidad de los materiales de mejora, sino únicamente a parte de ellos; y en segundo lugar, el éxito obtenido por los híbridos de maíz animó fuertemente a la utilización de un esquema similar en remolacha (Johnson, 1952).

De esta forma, y aunque la urgencia en producir variedades genéticas monogérmicas estimuló un cambio hacia la mejora por híbridos, no puede haber duda de que sin la mejora por híbridos no se habrían producido variedades monogérmicas con producción y calidad aceptable, tan rápido como se logró, ni sus rendimientos se habrían elevado de la forma que posteriormente lo han hecho.

2.1 SELECCIÓN Y DESARROLLO DE LÍNEAS MANTENEDORAS (TIPO O) Y SUS ANDROESTÉRILES EQUIVALENTES

La consanguinidad, es decir la obtención de líneas lo más homocigóticas posibles, es el primer paso de cualquier programa de mejora híbrida. Si la producción de semilla híbrida se va a basar en androesterilidad citoplásmica, se requiere el desarrollo de líneas puras con genotipo mantenedor de la androesterilidad. A partir de las mismas, y mediante retrocruzamientos sucesivos sobre plantas portadoras del citoplasma androestéril, se obtienen las líneas androestériles equivalentes.

Los genotipos mantenedores (tipo-O) deben ser identificados a través de cruzamientos de prueba con plantas androestériles citoplásmicas (CMS). Estos cruzamientos se realizan en invernadero o en campo, mediante bolsas o algún tipo de aisladores. Sobre el polinizador se cosecha semilla autofecundada para mantener el genotipo, mientras que la semilla procedente del cruzamiento se estudia para androesterilidad. Para acelerar el sistema, en ocasiones se emplean CMS anuales, que permiten, sin necesidad de vernalización, una rápida llegada a floración de la semilla del cruzamiento, y conocer antes el resultado de la prueba de androesterilidad.

Dado que la remolacha azucarera es normalmente autoestéril, el desarrollo de las líneas tipo O puede presentar dificultades, especialmente en zonas de veranos cálidos, como los nuestros, en los que en aislamiento las remolachas autoestériles producen muy poca o ninguna semilla. Bajo estas condiciones los genotipos de las plantas empleadas como supuestos tipos O, pueden perderse a no ser que sean mantenidos por propagación vegetativa. Como resultado de esto, muchos mejoradores han preferido trabajar con materiales autofértiles para el desarrollo de tipos O (Savitsky, 1954). Aunque esto favorece el desarrollo y mantenimiento de los tipos O, la autofertilidad perjudica notablemente los procesos de mejora en las poblaciones origen de estas líneas. Como ya se ha descrito, esto puede ser solucionado a través de la utilización conjunta de autofertilidad y androesterilidad nuclear.

Los genotipos identificados como tipos O pueden ser manejados en diferentes maneras, según el tipo de variedades híbridas que se quieran producir y la filosofía del mejorador. Si el objetivo es el de variedades híbridas con parentales no muy consanguíneos, los tipos O pueden ser multiplicados como familias, y posteriormente comprobar su aptitud combinatoria mediante cruzamientos con CMS no relacionados.

Más frecuentemente se suele continuar el proceso de consanguinidad, a través de autofecundación de los tipos O durante varias generaciones, generalmente acompañada de sucesivos retrocruzamientos con CMS para producir la línea androestéril equivalente. Un uso eficiente de los recursos recomienda inicialmente, con semilla S_1 , realizar una primera siembra en campo evitando líneas de malas características, y seleccionando las mejores raíces para continuar el proceso de consanguinidad.

En cualquier caso, este proceso de consanguinidad se acompaña de selección visual para varios caracteres tales como monogermia, tamaño, forma y producción de semilla, y vigor. Para realizar esta selección, algunas raíces de cada generación S_1 , S_2 y S_3 deberán ser plantadas en el exterior.

Las líneas que hayan sido seleccionadas tras la generación S_3 , son ensayadas para aptitud combinatoria, primero por aptitud combinatoria general (GCA), y posteriormente por aptitud combinatoria específica (SCA). De esta forma se culminaría el proceso de obtención de tipos O de buena aptitud combinatoria, y sus equivalentes CMS.

La multiplicación de estos materiales debe realizarse siempre bajo aislamiento muy controlado, para prevenir contaminación. Las plantas androestériles empiezan a florecer con anterioridad a sus tipo-O, por lo que existe un gran riesgo de contaminación por polen externo. Los tipos-O, si se han desarrollado a partir de poblaciones autoestériles, son también fácilmente contaminables, por lo que se recomienda si es posible, multiplicarlos en cabinas a prueba de polen. La autofertilidad, como ya se ha comentado, evita fuertemente esta contaminación.

La identificación y el desarrollo de tipos O y sus equivalentes CMS, constituyen la parte más laboriosa y costosa de un programa de

mejora híbrida en remolacha. Esto es debido a la escasez de tipos O con características suficientemente buenas, y que combinen bien. Esta última propiedad, de encontrar y fijar genotipos capaces de producir híbridos sobresalientes, era esperable, pero el problema se agrava en remolacha por la necesidad de que los parentales hembras de los híbridos han de ser monogérmes, y la baja frecuencia de tipos O en la mayoría de estas poblaciones.

De esta forma, una proporción baja de la variabilidad genética de la remolacha está disponible en poblaciones monogérmes, comparada con las mejores características de producción y calidad de las poblaciones multigérmes. Y si la frecuencia de genotipos buenos es baja, menor será aún la de aquellos que además sean de tipo O.

Para incrementar las posibilidades de obtener buenas líneas tipo O, los mejoradores han adoptado soluciones derivadas del maíz, tales como la selección gamética, el retrocruzamiento y las líneas de segunda generación.

Sin embargo, y como se ha mencionado anteriormente al hablar de métodos de selección, la mejor solución para este problema se basa en el desarrollo de poblaciones monogérmes de tipo O, de amplia base genética, y construidas de forma que la frecuencia de genes favorables pueda ser incrementada progresivamente a través de la selección recurrente (Bosemark, 1971b; Doney y Theurer, 1978).

2.2 EVALUACIÓN DE APTITUD COMBINATORIA INCORPORACIÓN A VARIEDADES HÍBRIDAS

Como ya se ha comentado las líneas de tipo O que se han seleccionado tras la generación S_3 , son evaluadas por aptitud combinatoria general (GCA). La semilla para esta evaluación puede ser producida multiplicando cada tipo O con su equivalente CMS, en presencia de un androestéril probador, heterocigótico y no relacionado, de conocida buena GCA. Dado que el mismo probador se emplea para evaluar la GCA de todos los tipos O, se le suele denominar "probador común androestéril" (MSCT).

En las parcelas de producción de semilla, el tipo O y los dos androestériles, se plantan en líneas alternadas (O-MSCT-MSCT-

O-CMS-CMS-O), para facilitar la polinización y permitir que los tres lotes de semilla sean cosechados fácilmente y sin riesgo de mezcla. La semilla cosechada sobre las plantas MSCT es la que se emplea para los ensayos de GCA de los tipos O.

Las líneas que presenten una aceptable GCA, pueden entrar entonces en un cruce dialélico con otros tipos O y sus equivalentes CMS, para producir un conjunto de combinaciones F_1 androestériles que son así evaluadas en campo por su aptitud combinatoria específica (SCA). Como resultado de estos ensayos, las mejores combinaciones F_1 se cruzan con un conjunto seleccionado de polinizadores diploides o tetraploides.

Después de repetidos ensayos de estos cruzamientos, los componentes de aquellos híbridos que parezcan ser superiores a las variedades existentes, son multiplicados para permitir la producción de cantidades comerciales de semilla. Únicamente después de otros ensayos, oficiales, y aprobación por las autoridades componentes, las nuevas variedades híbridas podrán llegar al agricultor.

Obviamente con esta exposición hemos querido presentar un esquema general del procedimiento, que ofrece muy diversas alternativas para el desarrollo y la evaluación de los componentes de las variedades híbridas (Barocka, 1985; Hecker y Helmerick, 1985). Así entre otras, el nivel de consanguinidad de los tipos O y sus equivalentes CMS, puede elevarse durante más generaciones, la evaluación de GCA realizarse en un estado anterior, el desarrollo de los equivalentes CMS dejarse para estados posteriores, y por fin, la variedad comercial puede estar basada en mayor o menor número de líneas y poblaciones.

2.3 TIPOS DE HÍBRIDOS

2.3.1 Híbridos diploides

Con las introducción de la androesterilidad citoplásmica en remolacha, se plantearon diferentes posibilidades de programas híbridos. En los Estados Unidos, donde la poliploidía no se había introducido en la mejora convencional, se aplicaron programas de híbridos

diploides. En Europa, y tras la experiencia positiva de las variedades anisoploides, fue lógica la aplicación de las nuevas posibilidades para la obtención de híbridos triploides. El resultado fue que la práctica totalidad de las variedades producidas en los Estados Unidos fueron híbridos diploides, mientras que en Europa eran triploides. Sin embargo, en la actualidad también en Europa se comercializan algunos híbridos diploides de buenas características.

Como en maíz y en otras especies, los híbridos diploides pueden ser constituidos en diferentes formas, dependiendo del mayor o menor número de componentes que entren en su formación, y de las características de los mismos. Los tipos más comunes podrían ser:

- a.- Híbrido simple $A \times B$
- b.- Híbrido tres vías $(A \times B) \times C$
- c.- Híbrido doble $(A \times B) \times (C \times D)$
- d.- Topcross $A \times \text{Población}$
- e.- Topcross de tres vías $(A \times B) \times \text{Población}$

Hasta el momento las variedades híbridas de remolacha, raramente se han basado en líneas puras, como sería el caso del maíz (a, b y c), sino que se han constituido como topcross de tres vías, usando como parental femenino, un híbrido F_1 entre una línea pura androestéril y un tipo O no relacionado, y como polinizador una población.

Esto no significa necesariamente que no se puedan producir híbridos superiores con empleo de líneas puras únicamente, sino que la razón estriba en el hecho de que para producir híbridos monogérmes, únicamente el parental femenino necesita ser monogermen, y por tanto ha sido natural la utilización de las mejores poblaciones multigérmes como polinizadores por las ventajas iniciales de mayor valor genético y adaptabilidad que las poblaciones presentaban.

Sin embargo, en la actualidad, muchos mejoradores ya producen líneas puras, diploides y multigérmes, que se utilizan en variedades experimentales y comerciales. Algunas de estas variedades se han constituido en forma de híbrido doble clásico, con la salvedad de que el polinizador está constituido por una generación avanzada de un

cruce, entre dos líneas puras, realizado sin androesterilidad. La obtención de auténticos híbridos dobles podría producirse utilizando androesterilidad citoplásmica en uno de los cruces simples (A) y en el final [$(A \times B)$], y androesterilidad nuclear en el otro cruce simple (C), como ya fue propuesto por Owen (1954b). Una desventaja de este método, derivada de la propia constitución de la androesterilidad nuclear, estriba en la necesidad de eliminar, con anterioridad a la floración, el 50 % de las plantas de C, que serán fértiles, y esto hace el sistema muy costoso. Otro método más conveniente para producir estos híbridos dobles podría basarse en la utilización de genes de restauración de fertilidad de polen (Theurer y Ryser, 1969), de forma que las líneas A y C serían androestériles citoplásmicas, B sería tipo O, y D llevaría el gen de restauración. Sin embargo no está clara la capacidad de restauración bajo condiciones meteorológicas adversas, ni tampoco se ha demostrado de forma convincente que tales híbridos dobles ofrecieran ventajas productivas que justificaran los incrementos de coste.

Las posibilidades de que híbridos simples o tres vías, basados en líneas puras, reemplacen en el futuro las actuales variedades de más amplia base, dependerá fuertemente de la capacidad que aquellos presenten de mantener la gran adaptabilidad que ofrecen las variedades actuales (Bosemark, 1976). Sin embargo, la heterogeneidad que tienen las variedades actuales, se traduce también en diversos problemas, tanto desde el punto de vista agronómico como del de mejora. Así, la diversidad genética contribuye a la heterogeneidad en forma de raíz, tamaño de la corona y su posición relativa en el suelo, que son características que afectan a la calidad de la cosecha y por tanto a las pérdidas de conservación y calidad de los jugos.

Otro problema que estas variedades de amplia base presentan, y que cobra gran importancia con la llegada de nuevas tecnologías, de las que se hablará posteriormente, es que para mejorar un carácter en la variedad, se hace necesario el mejorar su valor promedio de uno o más componentes heterogéneos, en lugar de desarrollar un genotipo mejorado en forma de línea pura. Esto influye, tanto en la velocidad del progreso, como en la expresión del carácter que quiere ser introducido en el híbrido.

Diferentes autores han proclamado repetidamente en los últimos años, la posibilidad de que los híbridos simples, basados en líneas puras, son una alternativa claramente viable a las actuales variedades. Según ellos, debe ser posible desarrollar híbridos F_1 con producción y adaptabilidad similares a las actuales variedades, y con claras ventajas en cuanto a calidad tecnológica y resistencia a enfermedades.

Para que estos híbridos simples sean una propuesta comercial viable, las líneas parentales no solo deben tener una gran aptitud combinatoria y producir híbridos de superior producción, calidad tecnológica y resistencias, sino que también las líneas parentales deben ser vigorosas, fáciles de manejar y capaces de producir buenas cantidades de semilla. En remolacha azucarera el sistema más efectivo para lograr esto, debería basarse en el manejo por selección recurrente recíproca, de dos poblaciones, una de mantenedores monogérmes, y otra de polinizadores multigérmes (Bosemark, com.pers.). La primera sería monogermen, tipo O, autofértil y segregaría para androesterilidad nuclear, y constituiría el origen de las líneas de tipo O que nos daría lugar a los CMS equivalentes, para ser usados como hembras de los híbridos simples. La segunda sería multigermen, autofértil y también segregando para androesterilidad nuclear, y de la misma se extraerían las líneas puras polinizadoras.

2.3.2 Híbridos triploides

Aunque en principio los híbridos triploides podrían ser producidos sobre un parental femenino androestéril diploide o tetraploide, en la práctica, casi la totalidad se producen basados en un parental femenino diploide y en un polinizador tetraploide.

La razón inicial se derivaba de que la identificación y el desarrollo de tipos O mediante cruzamientos de prueba en poblaciones tetraploides, presenta gran dificultad. Así, mientras no se desarrollaron buenos diploides monogérmes tipo O, que fueron duplicados cromosómicamente, no pudieron ser usados sus equivalentes CMS, como parentales femeninos de híbridos triploides. La experiencia en este tipo de triploides es bastante limitada, y a pesar de que existen

resultados que parecen ofrecer buenas perspectivas (Hecker et al., 1970; Lahousse, 1976; Bosemark, 1977; Fitzgerald, 1977; Smith et al., 1979), se haría necesario un estudio en mayor profundidad.

Aparte de esto, ambos sistemas tienen ventajas y desventajas. Así, los tetraploides producen polen en menor cantidad y calidad que los diploides, y en horas más tardías (Scott y Longden, 1970), por lo que los androestériles diploides plantados junto a polinizadores tetraploides están mucho más expuestos a contaminación por polen externo, que en el caso opuesto de androestériles tetraploides y polinizadores diploides. Por otro lado, cuando se emplean androestériles tetraploides, es difícil alcanzar niveles aceptables de calidad de semilla, especialmente en el Norte de Europa, y junto a esto la frecuencia de aneuploides es superior.

Aunque los trabajos realizados para mejorar la capacidad de germinación y características de semilla, en poblaciones monogérmes tetraploides de tipo O, han dado bastante buenos resultados, el futuro de los híbridos triploides monogérmes basados en hembras tetraploides debe ser definido como muy dudoso.

En los programas de mejora para la obtención de híbridos triploides, no se plantea la discusión sobre utilización de poblaciones *versus* líneas puras como polinizadores, ya que la obtención de híbridos triploides de gran valor productivo no parece compatible con el estrechamiento de las bases genéticas de los polinizadores (Bosemark, 1969). De esta forma, los polinizadores tetraploides empleados en la producción de semilla híbrida triploide, se desarrollan normalmente con el mismo sistema que las antiguas variedades sintéticas de remolacha.

Otra posibilidad que, tras el desarrollo de las técnicas de propagación *in vitro* (Saunders, 1982; Atanassov, 1986), ha quedado abierta, ha sido la obtención de clones y el cruzamiento entre tetraploides autoestériles altamente heterocigóticos, seleccionados por mayor aptitud combinatoria. Si estos tetraploides "supersintéticos" serán capaces de producir híbridos sustancialmente mejores, es algo que está por ver.

2.3.3 Diploides *versus* triploides

Cuando los mejoradores europeos de remolacha azucarera tuvieron que decidir entre los diferentes métodos para producir variedades monogérmes genéticas, la mayor parte de ellos desarrollaron híbridos triploides basados en diploides monogérmes androestériles, y polinizadores tetraploides multigérmes. Se consideraba que el desarrollo de los híbridos triploides sería un camino más rápido para obtener variedades monogérmes, con características aceptables de producción y calidad, que el desarrollo de variedades convencionales, sintéticas de primera generación, diploides o anisoploides, que requerirían la conversión a monogermia de una gran proporción del material de mejora existente. En los híbridos triploides, dos de los tres genomas presentes serían aportados por el material tetraploide fuertemente adaptado, mientras que sólo uno provendría del material monogermen de origen americano, que mostraba fuertes debilidades.

Lo correcto de esta consideración, quedó demostrado, inicialmente de forma empírica, con la rápida aparición y expansión, de híbridos monogérmes triploides europeos de características razonablemente buenas. En estudios posteriores se ha podido comprobar que en los híbridos triploides, el polinizador tetraploide enmascara la variabilidad existente en las hembras diploides (Lasa et al., 1989), dándose el caso de que al cruzar un conjunto de líneas diploides androestériles monogérmes, con polinizadores diploides y tetraploides; en los híbridos triploides, los únicos efectos significativos eran los causados por la GCA de los polinizadores y la SCA; mientras que en los híbridos diploides, el mismo conjunto de líneas androestériles presentaba variación significativa en cuanto a su GCA, confirmándose de esta forma la idoneidad de la elección inicial de los mejoradores europeos.

Desde los comienzos de la monogermia en Europa, numerosas variedades triploides se han ido desarrollando, con lento pero continuo incremento en sus producciones. Sin embargo, también han ido apareciendo en el mercado muchos híbridos diploides, algunos de los cuales son tan buenos como los triploides. Esto ha hecho que muchos mejoradores se cuestionen el futuro de los híbridos triploides, prin-

cialmente basados en su más alto costo de producción de semilla de calidad, y los mayores riesgos de contaminación. En el momento actual pueden encontrarse mejoradores de prestigio en ambos bandos de la discusión, pero todos ellos aceptarían que la definición del futuro de la poliploidía en remolacha está aún sin resolver.

En Estados Unidos, donde las variedades anisoploides nunca se introdujeron, y la mayor parte de los mejoradores no ha trabajado con materiales tetraploides, los investigadores se han planteado la realización de estudios comparativos entre híbridos triploides y diploides, para decidir si las posibles ventajas de los triploides, justificarían la fuerte inversión necesaria para comenzar allí programas basados en poliploidía.

Los estudios iniciales de Helmerick et al. (1965), basados en androestériles monogérmes americanos y polinizadores tetraploides europeos, no fueron muy aceptados como evidencia positiva de la triploidía. En estudios posteriores (Finkner et al., 1967; Hecker et al., 1970; McFarlane et al., 1972), los resultados no demostraron ninguna ventaja en producción en los híbridos triploides. Pero sin embargo, a la hora de juzgar estos últimos resultados, debe hacerse constar que se realizaron siempre en base a líneas puras, incluso en el parental tetraploide, con lo que perdían gran parte de las ventajas que ofrece la poliploidía al poder hacer uso de un alto grado de heterocigosidad y sus posibilidades de acumular gran número de genes condicionando la producción.

Aún así, debemos concluir que las ventajas de los híbridos triploides, comparados con los diploides, están abiertas a discusión y esto puede durar aún un buen número de años. Sin embargo, hay que recordar que como no presenten una buena ventaja en cuanto a producción, los triploides tienen poco más que ofrecer.

VIII BIOTECNOLOGIA Y MEJORA DE REMOLACHA AZUCARERA

I INTRODUCCION

No existe una definición única ni una característica diferencial común al conjunto de técnicas conocidas bajo el nombre de Biotecnología. En su sentido más amplio, se puede definir como Biotecnología al conjunto de modernas técnicas empleadas en la manipulación y aprovechamiento de los seres vivos. De hecho, la mayor parte de las actividades agrícolas podrían considerarse biotecnológicas; sin embargo, el término Biotecnología se refiere particularmente al conjunto de técnicas desarrolladas a partir de los años 70 basadas en los cultivos celulares, la ingeniería genética y en modernos métodos de diagnóstico que permiten una nueva forma de estudio y utilización de los seres vivos.

Indudablemente, los mayores avances en la mejora de la remolacha en el futuro más inmediato se deberán más a una mejora en los métodos de selección actuales, que permita identificar con más facilidad genotipos superiores para los caracteres deseados, que a una utilización práctica de las nuevas tecnologías moleculares. Sin embargo, las perspectivas que ofrece la biotecnología no pueden ser ignoradas, ya que jugarán un papel fundamental en la obtención de nuevas variedades de remolacha a medio y largo plazo.

2.1 FUNDAMENTO

El cultivo de tejidos es un proceso por el que un organismo, a partir de pequeños trozos de tejidos vivos (explantos), puede ser cultivado y mantenido indefinidamente en un medio nutritivo artificial y aséptico. Actualmente es posible realizar estas técnicas partiendo de células o protoplastos (células vegetales sin pared celular) por lo que también se habla de cultivos celulares y de protoplastos. Los avances en el conocimiento del papel de las diferentes hormonas en los procesos de diferenciación de callos (tejidos indiferenciados), embriones y órganos, han permitido la regeneración de organismos completos a partir de cultivos celulares en un número cada vez mayor de especies vegetales. De esta manera es posible reproducir individuos con una velocidad muy superior a la conseguida por los métodos convencionales. Las aplicaciones de estas técnicas son innumerables.

2.2 APLICACIONES DE LOS CULTIVOS *IN VITRO*

2.2.1 Rápida propagación clonal

Dado que, en principio, los cultivos celulares equivalen a una propagación vegetativa que conserva un genotipo original, han sido ampliamente utilizados en la propagación comercial de variedades de genotipos interesantes. Estas técnicas permiten una tasa de multiplicación varietal muy superior a la conseguida por los métodos convencionales. En remolacha existen procedimientos sencillos para una rápida propagación clonal (Saunders, 1982) que se han utilizado con distintos objetivos: (1) mantenimiento y multiplicación de tipos mantenedores de esterilidad (tipos O), especialmente cuando son auto-incompatibles; (2) obtención de un número elevado de propágulos genéticamente idénticos para su empleo en policruzamientos, con vista a asegurarse una polinización homogénea y aleatoria; (3) mantenimiento de plantas de elevado interés genético y baja viabilidad, como algún tipo trisómico mencionado anteriormente (Casas et al., 1987); etc.

La aplicación de los cultivos celulares en la multiplicación a gran escala de los cultivos puede no limitarse a especies de reproducción vegetativa como la patata, los cítricos, etc. sino que podría extenderse a especies que habitualmente se reproducen sexualmente (como la propia remolacha, hortícolas, etc.) mediante las denominadas **semillas artificiales**. Aunque las **semillas artificiales** todavía no son una realidad, se producirían reproduciendo embriones artificiales por cultivo *in vitro* del genotipo deseado y envolviéndolo de una cubierta protectora imprescindible para las primeras fases de la germinación.

Un tipo de cultivos celulares de gran interés como fuente de material básico para las técnicas de ingeniería genética es el cultivo de protoplastos. En remolacha este tipo de cultivos celulares son difíciles, pero posibles, habiéndose llegado a regenerar plantas enteras (Bosemark, comunicación personal).

2.2.2 Variación somaclonal y selección *in vitro*.

Aunque, teóricamente, los cultivos celulares no generan variabilidad, se ha comprobado la existencia de una alta tasa de mutación en callos, que provoca la aparición de nuevas variantes fenotípicas y genotípicas. A esta variabilidad inducida por el cultivo *in vitro* se le denomina **variación somaclonal** y puede ser utilizada en mejora genética para la obtención de nuevas variedades. Aunque no parecen existir nuevas variedades de remolacha obtenidas vía este tipo de variación somática, si que se han obtenido en otras especies.

La aplicación de la variación somaclonal en la mejora de cualquier especie es muy sencilla. Sobre plantas regeneradas con posterioridad al cultivo celular, se lleva a cabo una selección artificial en base a determinados tratamientos (estrés hídrico, presencia de toxinas, etc.) que conduzcan a plantas adultas que posean una determinada característica que posteriormente será evaluada en el campo (resistencia a la sequía o a una enfermedad por ejemplo).

2.2.3 Obtención rápida de líneas puras

La posibilidad de cultivar gametos masculinos (granos de polen) u óvulos femeninos, ha permitido, tras la inducción de la duplicación

cromosómica, la obtención de individuos adultos con una determinada dotación cromosómica repetida. En individuos diploides esto equivale genéticamente a una fijación del carácter en homocigosis. De esta manera se consigue en una sola generación lo que por los métodos convencionales necesitaría un mínimo de 7-9 generaciones, con el consecuente ahorro de tiempo. Existen numerosas líneas puras de arroz, cebada, tabaco, maíz, etc. obtenidas de esta manera.

El cultivo de óvulos, para la obtención de haploides, es relativamente sencillo en esta especie, habiéndose podido conseguir en un 50 % de los genotipos ensayados, con unos niveles de regeneración de plantas haploides, cercanos al 10 % (Lux et al., 1990).

2.2.4 Obtención de híbridos interespecíficos

Tradicionalmente los híbridos interespecíficos se han venido obteniendo por cruzamientos convencionales entre individuos de distintas especies. Pero en muchos casos existe una incompatibilidad que impide la viabilidad de la semilla híbrida resultante. Actualmente se consigue el desarrollo de ciertos híbridos interespecíficos cultivando *in vitro* la semilla obtenida, técnica que se conoce como **rescate de embriones**. Los cruzamientos interespecíficos así conseguidos han permitido la obtención de nuevas especies (triticale p.e.) o la transferencia de genes interesantes de especies silvestres a especies cultivadas genéticamente próximas.

Una alternativa más moderna es la denominada **fusión de protoplastos**. Consiste en la inducción de la unión de protoplastos de células somáticas de dos especies distintas. El híbrido resultante de la fusión de ambos tipos de células y de sus núcleos se reproduce al principio en un medio de cultivo adecuado. De esta manera es posible superar determinadas barreras de incompatibilidad que pueden surgir en los procesos sexuales.

2.2.5 Crioconservación y almacenamiento de germoplasma

El desarrollo de técnicas de cultivo a bajas temperaturas permite la conservación de determinados genotipos durante largos periodos

de tiempo, reduciendo muy significativamente la necesidad de subcultivos. De esta forma es posible mantener materiales de especies que no se conservan mediante sus semillas, utilizando meristemas, embriones, callos, etc.

2.2.6 Selección *in vitro*

(a) Selección esporofítica *in vitro*

En cualquier tipo de cultivos *in vitro* (plántulas, meristemas, callos, cultivos celulares) es posible incorporar en el medio un producto que imponga artificialmente un estrés. Teóricamente, los genotipos más resistentes deberían presentar una mayor probabilidad de sobrevivir al estrés que aquellos que son susceptibles al mismo. Este es el fundamento de la selección *in vitro* cuyo esquema general para su uso en remolacha aparece descrito por Smith (1987) para el caso que se incorpore una toxina de un hongo como la *Cercospora*, un herbicida o un producto químico para inducir un estrés salino u osmótico.

Dos aspectos cruciales en este tipo de selección son: (1) capacidad de regeneración de plantas completas a partir de los explantes tolerantes o resistentes; y (2) necesidad que esta tolerancia o resistencia se exprese a nivel planta entera. Frecuentemente cultivos celulares que muestran altos niveles de tolerancia a un medio artificial rico en una sustancia, no manifiestan esta tolerancia en plantas regeneradas.

(b) Selección gametofítica *in vitro*

El fundamento de este tipo de selección *in vitro* consiste en someter a un estrés a polen cultivado artificialmente. Polen susceptible al producto o toxina incorporada en el medio no sobrevivirá, mientras que el polen tolerante permanecerá viable. Este polen viable podrá ser recuperado y utilizado en la polinización de plantas femeninas. Este método se ha utilizado con éxito en remolacha para la identificación y selección de polen resistente a un herbicida específico (ethofumesato) (Smith y Moser, 1985).

3.1 FUNDAMENTO

3.1.1 Conceptos generales

Se conoce por Ingeniería Genética a un conjunto de técnicas que permiten la incorporación en una especie determinada de genes procedentes de otra, pudiendo estar filogenéticamente muy distantes. Este proceso también conocido como **técnicas de ADN recombinante** exige la sucesión de fases:

- Corte del ADN de la especie donante en lugares precisos mediante enzimas de restricción.
- Identificación y asilamiento del fragmento de ADN a transferir.
- Presencia de un fragmento de ADN que actúe como 'vector' (fragmento de ADN encargado de transportar los genes que se pretende transferir).
- Unión de ambos fragmentos mediante enzimas ligasas específicas.
- Incorporación de ADN donante al individuo receptor mediante algún sistema de transformación.
- Reconocimiento de los individuos receptores que han incorporado los genes deseados mediante algún sistema de marcadores genéticos (resistencia a un antibiótico, presencia de sustancias específicas, etc.).
- Reproducción o regeneración de los individuos transformados. En el caso de microorganismos unicelulares se han de multiplicar en determinados medios de cultivo, mientras que en los vegetales pluricelulares se han de generar y diferenciar plantas completas a partir de las células transformadas.
- Adaptación del genotipo receptor a la óptima expresión de los genes transferidos que suele estar controlada por otros genes asociados llamados **promotores**. Se ha comprobado que no es suficiente insertar un determinado número de copias del gen deseado para que se exprese, sino que han de localizarse en determinadas posiciones. La inclusión de determinados promotores permite la expresión dife-

rencial de genes con independencia de su posición en distintos tejidos específicos.

3.1.2 Sistemas de transformación

Se han desarrollado varios sistemas para la incorporación de genes extraños en especies vegetales diferentes. Una revisión completa y reciente sobre estas técnicas es la de Potrykus (1991).

(a) Transformaciones mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria que produce una enfermedad en muchas dicotiledóneas caracterizada por la aparición de un tumor en el cuello de las plantas infectadas. La causa de esta proliferación es la existencia en la bacteria de un fragmento de ADN (plásmido t-ADN) que se inserta en los cromosomas de la planta huésped produciendo su replicación y la síntesis de unas proteínas, las **opinas**, que necesita para su metabolismo. Se trata, por tanto, de un caso de ingeniería genética natural.

En los últimos 5-10 años se ha conseguido artificialmente aprovechar dicha característica e incorporar determinados genes en el plásmido t-ADN para que *Agrobacterium* actúe como vector para introducirlos en el cromosoma de la planta huésped, una vez desactivada su acción patogénica. Como elementos que permiten reconocer la transformación en plantas regeneradas a partir de los tejidos a los que se ha aplicado la bacteria, se emplean marcadores bioquímicos. Los más frecuentes son genes de resistencia a antibióticos tipo kanamicina y neomicina. Las células vegetales que sobrevivan a un cultivo en el que se incorporan estos antibióticos serán resistentes indicando que ha habido transformación. Este procedimiento es frecuentemente denominado **Agroinfección**.

En la naturaleza *Agrobacterium tumefaciens* puede infectar a la remolacha azucarera siendo, dado que es el mecanismo mejor conocido a nivel molecular, el mecanismo de transformación más frecuentemente empleado en este cultivo. El procedimiento básico consiste en el cultivo *in vitro* en medio líquido, de discos de tejido foliar de genotipos de remolacha al que se añade *Agrobacterium*

turnefaciens portador del plásmido desarmado (no provoca enfermedad) pero al que se ha incorporado el gen de interés. A continuación se induce formación de callo, del que se regeneran cultivos resistentes a los antibióticos indicadores de transformación, que darán lugar a plantas potencialmente transgénicas.

(b) Transfección con virus

Este sistema se basa en la utilización de la capacidad de determinados virus de integrarse en los cromosomas de la planta huésped. Incorporando los genes deseados en el virus ha sido posible transferirlos al huésped.

(c) Electroporación

Consiste en la aplicación de grandes diferencias de potencial en cultivos celulares, con el objeto de abrir poros en sus membranas por los que pueden penetrar al núcleo fragmentos de ácidos nucleicos que se añaden al medio y que poseen la información genética que se quiere incorporar. Se producen bajas frecuencias de transformación y frecuentemente se presentan problemas de regeneración de plantas enteras:

(d) Microinyección y microproyectiles

En algunos casos es posible la inyección directa del ADN deseado en el interior de las células o su lanzamiento unido a un microproyectil a través de la membrana.

(e) Otros métodos

En la revisión citada de Potrykus (1991) también se hace una revisión crítica a cada una de otros procedimientos menos importantes, mediante los que, aparentemente, se han obtenido plantas transgénicas. Estos son: transformación directa de ADN a partir de la incubación de ADN en cultivo de tejidos, semillas secas y embriones; transformación de polen; electroforesis; fusión o inyección de liposomas; microlaser; etc.

3.2 APLICACIONES DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

Aunque los primeros logros de la Ingeniería Genética han sido muy espectaculares, es necesario limitar las expectativas sobre todo a corto plazo. La Ingeniería Genética actual solamente puede mani-

pular caracteres de base genética sencilla (caracteres cualitativos), pero no puede modificar directamente los caracteres cuantitativos que están codificados por muchos genes y que son los que tienen mayor importancia económica (por ejemplo rendimiento en peso, en azúcar o calidad). Algunas aplicaciones actuales o potenciales son la incorporación a las nuevas variedades de las siguientes características:

3.2.1 Resistencia a plagas

Uno de los principales logros hasta el momento en este ámbito ha sido la incorporación en 1987 de los genes de la toxina de la bacteria *Bacillus thuringensis*, letal para algunos insectos en tabaco, tomate y algodón mediante Agroinfección. Las plantas transgénicas así obtenidas resultaron resistentes a la larva de *Manduca sexta*. Actualmente se encuentran en fase de multiplicación comercial variedades transgénicas de patata y tomate. También se trabaja en otros casos de resistencia como son genes que inhiben la acción de enzimas digestivos (tripsina, amilasas, proteasa, etc.) de determinadas plagas que se verían incapaces de digerir los tejidos de las plantas transformadas. En este campo destacan los trabajos realizados por el grupo de los profesores García-Olmedo y Carbonero en la Escuela de Ingenieros Agrónomos de Madrid.

Aunque la incorporación de estas resistencias a insectos sería técnicamente sencilla en remolacha, no hay constancia en la literatura de la existencia de plantas transgénicas de remolacha para estos caracteres.

3.2.2 Resistencia a virus

La resistencia conseguida se basa en el fenómeno 'protección cruzada' por el que la presencia en una planta de un determinado componente (proteína de la cubierta, satélite, etc..) de una cepa poco virulenta de un virus, la protege de otras más virulentas, incluso de especies diferentes. De esta manera se pudieron conseguir plantas transgénicas de tabaco y tomate, con el gen de la proteína de la cubierta del virus del mosaico del tabaco, que se mostraban tolerantes a dicho virus.

La enfermedad a la que se dedica mayor atención actualmente es la Rizomanía, debida como ya se ha señalado al virus BNYVV. Ya existen plantas de remolacha transgénicas resistentes a esta enfermedad. Esto se ha conseguido incorporando proteína de la cubierta por el método del *Agrobacterium tumefaciens* (Buchting, 1989; Perez et al., 1990).

3.2.3 Resistencia a enfermedades producidas por hongos o bacterias

La mayor parte de las enfermedades de las plantas se deben a hongos y bacterias. Sin embargo, la ingeniería genética ha avanzado más lentamente en este campo que en los anteriores. Una posible razón fundamental es que la resistencia a estos parásitos se debe a múltiples factores bioquímicos, particularmente a las fitoalexinas. Así se denominan a unas moléculas con efectos antibióticos que no están presentes en plantas sanas, pero que se acumulan en respuesta a la infección microbiana. Sin embargo, diferentes mecanismos de resistencia se están investigando en otras especies. Se han transferido genes bacterianos que hidrolizan la quitina en guisante con objeto de interferir el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. La presencia de genes de tionina en plantas resulta tóxica para algunas bacterias y hongos en trigo y cebada. Otro caso es el de la transferencia a patata de genes de insectos con propiedades inmunológicas contra bacterias patógenas.

3.2.4 Tolerancia a herbicidas

Este es el campo en el que la ingeniería genética a corto y medio plazo, puede producir un mayor impacto. Dos son los motivos fundamentales. Indudablemente los herbicidas ocupan un lugar muy importante en la Agricultura, particularmente en cultivos de lenta implantación como la remolacha. Pero, sin embargo, tiene mayor importancia el hecho de que en los últimos 10 años, muchas casas productoras de semillas han sido adquiridas por las grandes multinacionales químicas. En plantas transgénicas, portadoras de genes de resistencia a ciertos herbicidas no selectivos, es posible un control eficaz de malas hierbas que de otra manera no se podría realizar. Esta estrategia supone una integración de las actividades de las compañías de una misma casa matriz que comercializa de un modo complementario la variedad y el herbicida.

La resistencia de las plantas a los herbicidas se puede conseguir por tres mecanismos diferentes: (1) sobreproducción de la sustancia bioquímica sensible al herbicida; (2) cambio en la estructura bioquímica de la sustancia objetivo del herbicida; (3) producción de una sustancia que degrade o detoxifique al herbicida antes de que encuentre el objetivo bioquímico dentro de la célula vegetal. En el primer caso, el herbicida actúa pero la planta responde al seguir produciendo el enzima objetivo; en el segundo caso el herbicida no es capaz de reconocer su objetivo, ya que éste es bioquímicamente ligeramente distinto, sin embargo pese al cambio de estructura es capaz de llevar a cabo su actividad enzimática normal; en el tercero, el herbicida no llega a actuar ya que es bloqueado antes de alcanzar su objetivo.

Ya existen a nivel experimental plantas transgénicas de remolacha resistentes por lo menos a tres herbicidas distintos: glifosato, sulfonilurea y glufosinato (Bormman, 1990). En los dos primeros casos se han encontrado genes de resistencia debidos a los mecanismos 1 y 2 mencionados anteriormente. Para el glufosinato, la resistencia es debida a la detoxificación interna del herbicida.

3.2.5 Modificación del sistema de polinización

Se puede inducir autoincompatibilidad en una planta introduciendo genes que permitan que una planta autógena pase a comportarse como alógama o, por el contrario, incorporar alelos de autofertilidad a genotipos autoincompatibles.

Dada la existencia en remolacha del alelo S^F (ver apartado IV) estas modificaciones no son necesarias en esta especie.

3.2.6 Sistemas de androesterilidad

El sistema de androesterilidad citoplásmica en remolacha funciona perfectamente (ver también apartado IV). Sin embargo, repetidas veces se ha mencionado el riesgo que supone el hecho de que todas las remolachas híbridas cultivadas son portadoras de un mismo citoplasma responsable de la esterilidad. Es conocido el caso del ataque en maíz hace 20 años en Estados Unidos de una raza patogénica específica de un hongo, entonces llamado *Helminthosporium maydis*, que atacaba selectivamente a los híbridos portadores del citoplasma T

responsable de la androesterilidad. Esta enfermedad supuso pérdidas muy importantes en la cosecha de ese año y condujo a la desaparición del empleo de híbridos de maíz basados en la androesterilidad citoplásmica.

En todas las especies se están realizando esfuerzos importantes de cara a la búsqueda de citoplasmas alternativos a los existentes, por la vulnerabilidad que supone la uniformidad genética presente. En remolacha uno de los grupos más activos en este contexto ha sido el del profesor Bosemark en Suecia. Aparentemente ya disponen de híbridos en distintos citoplasmas todavía no comercializados, de modo que pudieran llegar a sustituir a los actuales en el caso hipotético, poco probable, de aparición de una enfermedad análoga a la citada para el maíz.

La ingeniería genética también permite de un modo sencillo, la obtención de híbridos basados en sistemas de androesterilidad a partir de la transformación de plantas. Recientemente se ha conseguido transformar plantas de tabaco y colza con un gen para la síntesis de una ribonucleasa que se expresa en las células del tapete de las anteras (gen **TA29-RNase**, Mariani et al., 1990). La expresión de este gen supone la destrucción selectiva de estas células y por tanto provoca la androesterilidad. El funcionamiento de este gen se puede ver facilitado por la incorporación simultánea de otro, estrechamente ligado al anterior, responsable de resistencia a un herbicida de acción total (**Hr**) (Lasa y Bosemark, 1992). Plantas heterocigóticas para estos genes serán androestériles y resistentes al herbicida, comportándose de un modo análogo al de un sistema de androesterilidad genética mendeliana dominante. Cuando se polinicen con plantas normales, producirán un 50% de plantas androfértiles y otro 50% de plantas androestériles. Las primeras podrán ser eliminadas por la aplicación del herbicida, ya que las androestériles son resistentes. El mismo grupo, más recientemente, ha sido capaz de aislar un gen (**barstar**) que tiene un efecto restaurador del anterior.

La utilización integrada de estos genes, permite la producción de híbridos simples. Supongamos que tenemos dos líneas **A** y **B** que queremos cruzar. Transformaríamos cada una de estas líneas de forma independiente:

A ->transformación->**A^T** = **A** transgénica **TR29-RNase Hr / ++**

B ->transformación->**B^T** = **B** transgénica **barstar / + ->**

B^{TT} barstar/barstar

Para multiplicar la línea **A^T** será necesario aplicar el herbicida de acción total una vez finalizada la polinización, las plantas **A ++/++** que serán androfértiles serán susceptibles al herbicida y no llegarán a producir semilla, sin embargo habrán aportado polen +. Las **A^T TR29-RNase Hr / ++** son resistentes al herbicida y pese a su androesterilidad son perfectamente ginofértiles, es decir producirán semilla que segregará al 50% entre plantas análogas a la original **A** y análogas a la transgénica **A^T**. La línea **B^{TT}** se multiplicaría normalmente, sin necesidad de tratamientos específicos. La producción final del híbrido sería posible tratando con herbicida bandas de genotipos **A/A^T** para eliminar las plantas androfértiles. De este modo el único cruzamiento posible sería:

♀ : **A^T TR29-RNase Hr / ++** x ♂ **B^{TT} barstar / barstar**

El híbrido final sería siempre portador del gen **barstar** por lo que sería androfértil, ya que este gen anula (restaura) el efecto **TR29-RNase**.

4 INMUNOENSAYOS Y MARCADORES MOLECULARES

Una parte importante de la Biotecnología está constituida por nuevas técnicas de detección específica de estructuras moleculares complejas en tejidos vegetales o animales. Los dos tipos de técnicas más empleadas son la tecnología de inmunoensayo y el análisis con sondas de ácidos nucleicos.

(a) Inmunoensayos

Se basa en las reacciones de reconocimiento específico entre antígenos y anticuerpos. Tradicionalmente, los anticuerpos se producían por extracción y purificación del suero de animales inmunizados con el antígeno correspondiente. Dichos anticuerpos eran policlonales y estaban formados por una mezcla de diferentes anticuerpos, lo que

originaba que su utilización no fuera completamente eficaz para un diagnóstico específico. Los **anticuerpos monoclonales** son poblaciones homogéneas producidas ilimitadamente por cultivo *in vitro* de un tejido especial denominado hibridoma. Este se obtiene por fusión de células de un tipo de cáncer de ratón (mieloma) con células especializadas en la producción de un determinado anticuerpo. Esta estabilidad en la producción y en la composición permite estandarizar las reacciones inmunológicas e incluso reproducirlas a escala industrial mediante filtros o columnas inmuno-adsorbentes.

(b) Sondas de ácidos nucleicos

Se basan en el empleo de secuencias de ADN o ARN asociadas a un marcador para detectar secuencias complementarias de ácidos nucleicos, debido a la propiedad de los ácidos nucleicos de aparearse con secuencias que tengan la misma o parecida información genética. De particular interés en este contexto, son los denominados *Restriction Fragments Length Polimorphisms* (RFLPs) o los más modernos RAPDs basados en la *Polimerase Chain Reaction*, que cuando se encuentran ligados a caracteres cuantitativos o cualitativos, pueden ser usados como marcadores indirectos para selección de aquellos caracteres. Dado que los marcadores moleculares, contrariamente a los caracteres cuantitativos, no están afectados por el ambiente, la selección puede realizarse de forma mucho más efectiva (Tanksley et al., 1989).

¹ Queremos agradecer la colaboración del Dr. A. Michelena en la elaboración de este Capítulo.

IX ANALISIS DE LAS PERSPECTIVAS FUTURAS

El éxito de los híbridos de maíz, y la demostración de la existencia de heterosis en algunos cruzamientos simples de remolacha, originó un interés considerable entre los mejoradores de remolacha norteamericanos. Sin embargo, en aquellos momentos, el tipo de floración de la especie, había impedido la explotación comercial de híbridos estrictos.

El descubrimiento de Savitsky (1950) y la creación de la línea SLC 101 como fuente de monogermia, coincide en el tiempo con la descripción de la androesterilidad citoplásmica, y con los primeros informes sobre métodos de producción de híbridos en remolacha azucarera (Owen, 1945, 1948). Todo ello supuso un fuerte impulso para los trabajos de obtención de variedades híbridas diploides monogérmicas, con empleo de metodologías desarrolladas para maíz. Aunque la importancia de la androesterilidad citoplásmica y de las técnicas de mejora híbrida, fueron reconocidas por los mejoradores europeos, estos se encontraban fuertemente involucrados en los programas de mejora por poliploidía, y no pudieron dedicar fuertes cantidades de recursos a estos nuevos programas de híbridos. Sin embargo, unos años más tarde, el encarecimiento y escasez de mano de obra, forzó a los mejoradores europeos a decidir entre los diferentes

métodos de producir variedades monogérmenes, y como ya hemos analizado en el apartado VII, la mayor parte de ellos decidió la producción de híbridos triploides, mediante el empleo de diploides monogérmenes androestériles y polinizadores tetraploides.

Desde entonces, se han desarrollado numerosas variedades triploides, que de forma lenta pero continuada han incrementado las producciones. Posteriormente fueron apareciendo en el mercado nuevos híbridos diploides de buenas características, lo que se pudo interpretar como que los híbridos diploides estaban tomando posiciones sobre los triploides, y que en un cierto período de tiempo, podrían reemplazarlos. Sin embargo, más recientemente, la proporción de híbridos triploides ha vuelto a aumentar de nuevo, de forma que si analizamos un mercado como el francés, en 1988, de 192 variedades monogérmenes en la lista, 174 eran triploides.

Dejando de lado, por un momento, las razones de este fallo aparente en la mejora de híbridos diploides, está claro que ha sido el éxito de la transición entre las viejas variedades multigérmenes a los modernos híbridos monogérmenes lo que ha salvado el cultivo de remolacha en muchos países. En cualquier caso, sería dudosa la rentabilidad de los programas de mejora híbrida solo por sus aumentos de producción, y que se estiman en un escaso 15 % para 20 años de trabajo, sino fuera por la aportación del carácter monogermen. ¿Significaría esto que la mejora por híbridos, en remolacha, *ha fracasado*, o que el potencial para mejora híbrida de este cultivo es menor que en el maíz ?. Ciertamente no, pero sugeriría que a pesar de 25 años de trabajo para mejorar las poblaciones monogérmenes, aún no se ha logrado superar la restricción creada por la necesidad de seleccionar simultáneamente para monogermia y para mantenimiento de la androesterilidad citoplásmica.

A pesar de que en los últimos años, se ha podido observar una mejora significativa en producción y otros caracteres, podríamos afirmar que la mejora híbrida en remolacha se encuentra aún en sus comienzos, y que en los próximos años, este tipo de mejora se va a traducir en nuevos incrementos de producción, pero fundamentalmente en mejora de las características de calidad y de resistencias a

enfermedades y plagas. Para substanciar esta afirmación, se requiere que nos detengamos un momento a analizar la forma, más común, en la que se producen, hoy en día, las variedades de remolacha, y qué sistemas alternativos o nuevas tecnologías pueden estar disponibles.

El primer hecho que destaca, es que hasta el momento, las variedades híbridas de remolacha prácticamente nunca se han basado en líneas puras, contrariamente a lo ocurrido en maíz. El sistema más normal ha sido la utilización, como parentales femeninos, de híbridos F_1 entre una línea androestéril citoplásmica, mas o menos consanguínea, y un mantenedor de la androesterilidad, no relacionado. El polinizador ha consistido en una población multigermen tetraploide, que ocasionalmente ha sido diploide. El híbrido *topcross* resultante, no es solo altamente heterocigótico, sino también muy heterogéneo. Esta combinación de un alto grado de heterocigosidad, con una diversidad genética, ha contribuido sin duda al mantenimiento, en las variedades monogérmenes, de la alta adaptabilidad que presentaban las antiguas variedades multigérmenes, y que era el resultado del intercrucamiento de varias líneas o poblaciones de amplia base, no relacionadas. El miedo a perder esta adaptabilidad, ha sido probablemente, una de las principales razones por las que los mejoradores europeos se han mostrado escépticos a estrechar las bases genéticas de sus variedades, en particular hacia la dirección de los híbridos simples entre líneas de alta consanguinidad.

Por la misma razón, las pocas variedades diploides que han llegado al mercado, se han basado en híbridos heterogéneos *topcross*. El hecho de que estos diploides tengan dificultades para competir con los híbridos triploides correspondientes, se debe probablemente a que al estarse aprovechando, en ambos tipos de híbridos, prácticamente sólo la aptitud combinatoria general, la mayor eficiencia en el uso de la heterocigosidad de los triploides los diferencia favorablemente. Sin embargo, la heterogeneidad de los actuales híbridos de remolacha, que está aún más pronunciada en los triploides, presenta muchas dificultades, tanto desde el punto de vista agrícola, como desde el de mejora. De esta forma, la diversidad genética contribuye a la variabilidad en forma y tamaño de la raíz, forma y tamaño de la corona, altura de la raíz sobre el suelo, etc., que son características, todas ellas,

que afectan a la calidad de la cosecha, produciendo pérdidas en cosecha, almacenamiento y fabricación. Junto a esto se presentan también variaciones en contenido en azúcar, y en impurezas. Otros problemas, de los que ya hemos comentado, se centran sobre las pérdidas debidas a aneuploidía, o sobre el menor vigor de nascencia, en general, que presentan los materiales poliploides en relación con los diploides.

Junto a esto, en muchos países, las autoridades responsables de la inscripción de variedades y la certificación de la semilla, protestan, desde hace mucho tiempo, por la falta de homogeneidad y estabilidad de las variedades de remolacha, que dificulta gravemente el control de identidad de las variedades. Hasta el momento ha sido posible frenar estas protestas argumentando que el tipo de estabilidad y homogeneidad que las autoridades reclaman, podría ser obtenido a expensas de una reducción en producción y en estabilidad. Sin embargo, en los últimos años, diversos investigadores y mejoradores de remolacha, han afirmado que híbridos simples, basados en líneas altamente consanguíneas, son una alternativa viable a las actuales variedades, y que es posible el desarrollo de estos híbridos F_1 , que tendrán tanta producción y adaptabilidad como las variedades actuales, y junto a esto presentarán mucho mejor calidad tecnológica y resistencia a enfermedades (Le Cohec, 1982). Estas afirmaciones se han visto claramente reforzadas por la aparición en el mercado de algún híbrido simple altamente competitivo (Kawakatsu et al., 1985).

Para que estos híbridos simples diploides, sean una propuesta comercial viable, tanto para el mejorador como para el productor de semilla, las líneas puras parentales no deberán presentar únicamente una gran aptitud combinatoria y producir híbridos de gran producción, calidad y resistencias, sino que también, las líneas por si mismas, deberán ser vigorosas, fáciles de manejar, y produciendo altas cantidades de semilla de buena calidad. Un método efectivo para el desarrollo de este tipo de líneas, requiere la aplicación de sistemas de selección recurrente, basada en generaciones S_1 o S_2 , y en el cual pueden ser eliminados los genes subletales, o reductores del vigor. También podría emplearse un sistema de selección recurrente recíproca, basado en una población monogermen y mantenedora, y en

una población polinizadora multigermen, en el que se combina selección S_1 dentro de cada población, con selección por GCA basada en cruzamientos de prueba con la población opuesta.

En los últimos años las ventajas aportadas a la mejora, por las tecnologías de cultivos celulares y de tejidos, han sido ampliamente reconocidas por los mejoradores de remolacha. Aunque la remolacha ha resultado ser una especie muy recalcitrante en cuanto a la regeneración de plantas a partir de células transformadas, no hay duda que la introducción de genes vía ingeniería genética, va a jugar un papel de creciente importancia en los avances que se obtengan en los próximos años (véase apartado VIII). Sin embargo, hay también otros beneficios de gran importancia derivados de la ingeniería genética, que a la larga van a ser tan importantes para la mejora de remolacha, como los derivados de la transferencia de genes. Así hay que destacar, como ya se ha comentado, a los RFLPs y RAPDs que facilitarán enormemente la identificación de genotipos superiores portadores de caracteres de interés económico ligados a los marcadores moleculares.

De esta forma, las poblaciones F_2 , desarrolladas a partir del cruzamiento de dos líneas puras con características deseables y complementarias, podrá ser, cada vez más, un origen favorable de nuevas líneas, las llamadas de segunda generación. También los trabajos de retrocruzamiento, buscando la transferencia de caracteres específicos cualitativos, de una línea a la otra, incrementarán notablemente su eficacia con empleo de RFLP's, siendo posible, después de pocos retrocruzamientos, la selección de descendientes que porten el mínimo de material genético no deseado ligado al gen que se busca.

Aunque la mejora continua, y el reciclado de las líneas puras elite vía retrocruzamiento y selección asistida por marcadores, deberá traducirse en un progreso considerable y acumulativo, el énfasis en poblaciones derivadas de cruces simples, puede resultar en un excesivo estrechamiento de las bases genéticas del programa. Se hace necesario, por tanto, que paralelo a estos refinamientos en los sistemas de retrocruzamiento y genealogía, se desarrollen y mejoren continuamente las poblaciones designadas para capitalizar una amplia variabilidad genética.

Como resumen, pensamos que en un período de unos 10 años, los híbridos diploides F_1 , comenzarán a impactar el mercado de variedades de remolacha, y reemplazarán gradualmente a las actuales variedades triploides. Estos desarrollos serán el resultado del incremento de la eficacia en los métodos de mejora poblacional, lo que permitirá la obtención de líneas con un mínimo de recesivos deletéreos y una clara mejora en sus resultados. Estas líneas deberán ser mejoradas posteriormente a través de la introducción de diversos caracteres cualitativos, vía transformación genética, y de introducción de genes cuantitativos de interés, vía selección asistida por marcadores.

Al igual que en maíz, la mejora de los híbridos dependerá más de la mejora del valor de las líneas puras, que de un mayor grado de heterosis. La integración de los métodos tradicionales con las nuevas tecnologías, creará un potencial para el desarrollo de variedades de remolacha azucarera, que no sólo ofrecerán mayores producciones de azúcar blanco, sino que exigirán menores aportes de agroquímicos y estarán más adaptadas a sistemas de cultivo económicos y sostenibles.

REFERENCIAS

Atanassov, A.J. 1986. Sugar beet. Handbook of plant cell culture, 4: 652-680. MacMillan, New York.

Balis, C. and Payne, M.G. 1971. Triglycerides and cercosporin from Cercospora beticola: fungal growth and cercosporin production. Phytopathology, 61: 1477-1484.

Barocka, K.H. 1985. Zucker- und Futterrüben (Beta vulgaris L.). En Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen, 2: 245-287. Ed. Verlag Paul Parey, Berlin.

Battle, J.P. and Whittington, W.J. 1971. Genetic variability in time to germination of sugar-beet clusters. J.Agric.Sci. Camb., 76: 27-32.

Bell, G. 1946. Induced bolting and anthesis in sugar beet and the effect of selection of physiological types. J.Agr.Sci., 36: 167-183.

Beysel, D. 1957a. Osmotischer Wert und Viskosität des Protoplasmas diploider und polyploider Zuckerrüben. Ber.Dtsch.Bot.Ges., 70: 109-120.

Beysel, D. 1957b. Assimilations und Atmungsmessungen an diploiden und polyploiden Zuckerrüben. Der Züchter, 27: 261-272.

Bilgen, T., Gaskill, J.O., Hecker, R.J. and Wood, D.R. 1969. Transferring Cercospora leaf spot resistance from Beta maritima to sugar beet by back-crossing. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 15: 444-449.

Björling, K. 1976. Virus yellows: Incidence, Epidemiology and Agronomic control. Proc.39th Winter Congr.I.I.R.B., 1-11.

Bordonos, M.G. 1939. A study on the inheritance of the single-germ character in beets. USSR All Union Res.Inst.Sugar Beet Industry, 1939: 357-359.

Bordonos, M.G. 1940. The characteristics of single-germ beet hybrids. USSR All Union Res.Inst.Sugar Beet Industry, 1940: 238-240.

Bordonos, M.G. 1941. Unilocular types of sugar beet. Proc. Lenin All Union Acad. Agric. Sci., 11: 3-4.

Bormotov, V.E., Scherbakova, A.M. and Luneva, M. 1973. Cytological characteristics in trisomic types of sugar beet. Nauka Tekh., 1973: 27-34.

Bornman, C.H. 1990. Molecular biology in sugar beet. IIRB 53rd Winter Congress, 31-38.

Bosemark, N.O. 1966. On the origin and consequences of aneuploidy in triploid and tetraploid sugar beet. I.L.R.B., 2: 9-34.

Bosemark, N.O. 1967. The effect of aneuploidy on yield in anisoploid sugar beet varieties. I.L.R.B., 2: 145-161.

Bosemark, N.O. 1969. Polyploidy and hybrid breeding in sugar beet. Sveriges Utsädesförenings Tidskrift, 107-112.

Bosemark, N.O. 1971a. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. Hereditas, 69: 193-204.

Bosemark, N.O. 1971b. Use of Mendelian male sterility in recurrent selection and hybrid breeding in beets. Rep. Meet. Eucarpia Fodder Crops Section, Lusignan, Sept. 1970, p.127-136.

Bosemark, N.O. 1976. The genetic basis of variety buffering. Proc. 39th Winter Congress Inter. Inst. Sugar Beet Res., 27-31.

Bosemark, N.O. 1977. Use of tetraploid monogerm male-steriles in triploid hybrid-seed production. Proc. Int. Inst. Sugar Beet Res., 271-287.

Bosemark, N.O. 1987. Sugar beet breeding. IAM de Zaragoza.

Bosemark, N.O. and Bormotov, V.E. 1971. Chromosome morphology in a homozygous line of sugar beet. Hereditas, 69: 205-212.

Brim, C.A. and Stuber, C.W. (1973), Application of genetic male sterility to recurrent selection schemes in soybeans. Crop Sci., 13, 528-530

Buchting, A.J. 1989. Pflanzenzüchtung und Gentechnologie-Realitäten und Perspektiven bei KWS. Zuckerindustrie, 114(11): 904-906.

Buttler, K.P. 1977. Revision von Beta Sektion Corollinae (Chenopodiaceae) I. Selbststerile Basisarten. Mitt. Bot. München, 13: 255-336.

Butterfass, T. 1964. Die chloroplastenzahlen in verschiedenartigen Zellen trisomer Zuckerruben (Beta vulgaris L.) Z. Bot., 52: 46-77.

Campbell, G.K. 1953. Selection of sugar beet for resistance to bolting. IIRB Winter Meet., p.5.

Casas, A., Lasa, J.M., Hecker, R.J. and Romagosa, I. 1988. In vitro multiplication of sugar beet primary trisomics. J. Sugar Beet Res., 26: 19-25.

Cistué, L., Romagosa, I. and Lasa, J.M. 1983. Chromosome contraction in somatic prophase in sugar beet. An. Aula Dei, 16: 264-274.

Cistué, L., Romagosa, I. and Lasa, J.M. 1984. High meiotic association in a monoploid sugar beet plant. An. Aula Dei, 17: 180-190.

Cistué, L., Romagosa, I., Tsuchita, T. and Lasa, J.M. 1985. Haploid karyotypes in sugar beet. Bot. Gaz., 146: 259-263.

Coons, G.H. 1954. Breeding for resistance to diseases. USDA Yearbook Agr., 1953, p. 174-192.

De Jong, J.H. and De Bock, T.S.M. 1978. Use of haploids of Beta vulgaris for the study of orceine and Giemsa stained chromosomes. Euphytica, 27: 41-47.

Desprez, M. 1980. Observations et remarques sur la montée a graine chez la betterave sucriere. Acad. D' Agric. France, 1980: 44-53.

Doggett, H. and Eberhart, S.A. (1968), Recurrent selection in Sorghum. Crop Sci., 8, 119—121

Doggett, H. and Majisu, B.N. 1972. Fertility improvement in autotetraploid Sorghum. 3. Yields of cultivated tetraploids. Euphytica, 21: 86-89.

Doney, D.L. and Theurer, J.C. 1978. Reciprocal recurrent selection in sugarbeet. Field Crops Res., 1: 173-181.

Doney, D.L. and Whitney, E.D. 1990. Genetic enhancement in Beta for disease resistance using wild relatives: a strong case for the value of genetic conservation. Economic Botany, 44: 445-451.

Driscoll, C.J. (1977), Reorganizing existing variability in wheat and related species. In Proc. 3rd Int. Congr. of SABRAO. Canberra, Australia.

Fassoulas, A. 1973. A new approach to breeding superior yielding varieties. Aristotilian Univ., Special Publ. 3, Thessaloniki, pp.42.

Finkner, R.E., Stafford, R.E., Doxtator, C.W. and Redabaugh, H.S. 1967. Performance of diploid and triploid sugar beet hybrids from the same genetic source. J.Amer.Soc.Sugar Beet Res., 14: 578-592.

Fitzgerald, P. 1977. Influence of crossing direction on the agronomic performance of sugar beet triploids. Irish J.Agric.Res., 16: 149-153.

Ford-Lloyd, B.V. and Williams, J.T. 1975. A revision of Beta section vulgares (Chenopodiaceae), with new light on the origin of cultivated beets. Bot. J.Linn.Soc., 71: 89-102.

Frandsen, K.J. 1939. Colchicininduzierte Polyploidie bei Beta vulgaris L. Der Züchter, 11: 17-19.

Gardner, C.O. 1961. An evaluation of the effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. Crop Sci., 1: 241-245.

García, A. y Lasa, J.M. 1991. Ensayos de vigor de nascencia: Revisión bibliográfica. Bol.Aula Dei, 14, 64 pp.

Gilmore, E.C. (1964), Suggested method of using reciprocal recurrent selection in some naturally self-pollinated species. Crop Sci., 4, 323-325

Hecker, R.J. 1967. Evaluation of three sugar beet breeding methods. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 14: 309-318.

Hecker, R.J. 1972. Inbreeding depression in diploid and autotetraploid sugarbeet, Beta vulgaris L. Euphytica, 21: 106-111.

Hecker, R.J. 1978. Recurrent and reciprocal recurrent selection in sugarbeet. Crop Sci., 18: 805-809.

Hecker, R.J. 1985. Reciprocal recurrent selection for the development of improved sugar beet hybrids. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 23: 47-58.

Hecker, R.J. and Helmerick, R.H. 1985. Sugar beet breeding in United States. Progress in Plant Breeding, 1: 37-61.

Hecker, R.J., Ruppel, E.C., Maag, G.W. and Rasmuson, D.M. 1975. Amino acids associated with Cercospora leaf spot resistance in sugar beet. Phytopath.Zeitschrift, 82: 175-181.

Hecker, R.J., Stafford, R.E., Helmerick, R.H. and Maag, G.W. 1970. Comparison of the same sugarbeet F_1 hybrids as diploids, triploids and tetraploids. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 16: 106-116.

Helmerick, R.H., Finkner, R.E. and Doxtator, C.W. 1963. Variety crosses in sugar beets (Beta vulgaris L.) I. Expression of heterosis and combining ability. J.Amer.Soc. Sugar Beet Tech., 12: 573-584.

Helmerick, R.H., Finkner, R.E. and Doxtator, C.W. 1965. Combining ability in autotetraploid sugar beets, Beta vulgaris L. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 13: 538-547.

Hull, R. 1960. The selection of sugar beet varieties for tolerance to virus yellows. Proc.23rd Winter Congr.I.I.R.B., 407-417.

Ishimura, S. 1972. Cytological studies on polyploid sugarbeets with special reference to some problems associated with occurrence of aneuploids. Hokkaido Takushoku Jr. College Bull., Spec.Vol. 5.

Jain, S.K. and Suneson, C.A. (1963), Male sterility for increased outbreeding in populations of barley. Nature, 199, 407—408

Janvier, A. 1985. Possibilités de la sélection et du génie génétique. Publ.Int.Roy.Belge Amélior.Betterave, 53: 123-128.

Johnson, R.T. 1952. A comparison between corn and sugar beet breeding methods. Proc.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 7:296-306.

Jung, C. 1987. Breeding for nematode resistance in sugarbeet. Ann.Botany, 3: 15-25.

Kaltsikes, P.J. and Evans, L.E. 1967. Production and identification of trisomic types in Beta vulgaris. Can.J.Genet.Cytol., 9: 691-699.

Kawakatsu, M., Mizoguchi, T., Sekimura, K. and Tanabe, H. 1985. Improving production by seed parent lines of monogerm F₁ hybrid seed in sugar beet (Beta vulgaris L.). 1. Improvement of seed production. Proc.Sugar Beet Res. Assoc., Japan, 27: 50-56.

Knapp, E. 1957. The significance of polyploidy in sugar beet breeding. Proc.Int.Genet.Symp., Tokyo (1956), p.300-304.

Knapp, E. 1966. Probleme der Polyploidie in der Pflanzenzüchtung. Umschau, 1966(22): 729-733.

Koch, F. 1970. Leistungsfähigkeit von Cercospora-resistenten Zuckerrübensorten. Inst.Inter.Res.Better., 5: 12-23.

Koch, F. 1982. Die Rizomania der Zuckerrübe. Proc.45th Winter Congr.I.I.R.B., 211-238.

Koch, F. 1988. La selezione genetica nella lotta contro l'Heterodera schachtii. Sementi Elette, 34: 23-26.

Kruger, W., Schmidt, E.W. and Sneider, F. 1939. Züchtung der Beta-Rüben. In: Handbuch der Pflanzenzüchtung, Berlin.

Lacadena, J.R. 1988. Genética. AGESA, Madrid.

Lahousse, R. 1976. Use of monogerm tetraploid male-steriles and realization of triploid varieties of sugar beet. Rep.Meet. Genetics and Breeding, Inst.Inter.Res.Better., Bologna.

Larsen, K. 1978. Four S-genes in one linkage group in Beta vulgaris L. Incompatibility Newslett., 987-982.

Lasa, J.M. 1977. Sugar beet bolting in the root crop. J.Agric. Sci.Camb., 89: 223-228.

Lasa, J.M. and Bosemark, N.O. 1992. Male sterility. In: Hayward, M., Bosemark, N.O. and Romagosa, I. (eds) Plant Breeding: Principles and Perspectives, Chapman & Hall, London (in press).

Lasa, J.M., Cistué, L., Gracia, P., Sanz, J.M., Medina, B. y Pérez-Peña, C. 1984. Híbridos monogérmicos de remolacha azucarera II. Adaresistamono. Variedad tolerante a Cercospora. An.Aula Dei, 17: 172-179.

Lasa, J.M. and Hecker, R.J. 1988. Registration of sugarbeet parental lines AD-1, AD-2, and AD-3. Crop Sci., 28: 1041-1042.

Lasa, J.M., Hecker, R.J. and Medina, B. 1979. Contamination and ploidy degradation in sugar-beet (Beta vulgaris L.). An.Aula Dei, 14: 376-383.

Lasa, J.M. and Medina, B. 1978. Multiplication of bolting resistant sugar beet (Beta vulgaris L.). An.Aula Dei, 14: 163-172.

Lasa, J.M. and Medina, B. 1981. Selection criteria for field emergence in sugarbeet, Beta vulgaris L. An.Aula Dei, 15: 417-423.

Lasa, J.M., Pavón, A. and Medina, B. 1987. Barley populations for drought tolerance. An.Aula Dei, 18: 163-170.

Lasa, J.M. and Pérez-Peña, C. 1976. Plant growth regulators and bolting in sugar beet (Beta vulgaris L.). An.Aula Dei, 13: 357-361.

Lasa, J.M., Romagosa, I., Hecker, R.J. and Sanz, J.M. 1989. Combining ability in diploid and triploid sugarbeet hybrids from diverse parents. J.Sugar Beet Res., 26: 10-18.

Lasa, J.M. and Sanz, J.M. 1976. Bolting variability in sugar beet (Beta vulgaris L.). An.Aula Dei, 13: 345-356.

Lasa, J.M. y Silván, A. 1977. Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera. 47 pp. Fundación Juan March, Serie Universitaria, núm. 38.

Le Buanec, B. and Perret, J. 1986. La rhizomanie de la betterave. Biofutur, Dec.1986: 55-60.

Le Cochec, F. 1982. Les variétés monogermes de betterave sucrière. Suggestions pour la sélection d'un autre type de variétés: Les hybrides F₁ ou hybrides entre deux lignées fixées. Le Sélectionneur français, 30: 45-48.

Le Cochec, F. et Soreau, P. 1989. Mode d'action des gènes et hétérosis pour le caractère montée à graines dans le croisement de deux lignées fixées de betterave à sucre (Beta vulgaris L.). Agronomie, 9: 585-590.

Lejealle, F. 1983. Maladies et parasites de la betterave sucrière. Ed. Inst. Inter. Res. Better., pp. 167.

Levan, A. 1942. The effects of chromosomal variation in sugar beet. Hereditas, 28: 345-399.

Lexander, K. 1967. Experiences physiologiques de la montée à graine chez la betterave sucrière. IIRB 30th Winter Cong., 126-131.

Lexander, K. 1981. Physical and physiological characteristics influencing field emergence of sugar beet. IIRB 44th Winter Cong., 21-36.

Litcher, R. 1967. Konkurrenzbeziehungen zwischen eu- und aneutetraploiden Pflanzen in tetraploiden Zuckerrüben. Zucker, 20: 351-355.

Litcher, R. 1975. Genetical aspects of different ploidy levels, especially of autotetraploids, with crosspollinating plants. Rep. Meet. Fodder Crops Section Eucarpia, April 1975, p.21-23.

Longden, P.C., Scott, R.K. and Tyldesley, J.B. 1975. Bolting of sugar beet grown in England. Outlook on Agriculture, 8: 188-193.

Lux, H., Herrmann, L. and Wetzel, C. 1990. Production of haploid sugar beet (Beta vulgaris L.) by culturing unpollinated ovules. Plant Breeding, 104: 177-183.

MacLachlan, J.B. 1972a. Estimation of genetic parameters in a population of monogerm sugar beet (Beta vulgaris). 1. Sib-analysis of mother-line progenies. Ir. J. Agr. Res., 11: 237-246.

MacLachlan, J.B. 1972b. Estimation of genetic parameters in a population of monogerm sugar beet (Beta vulgaris). 2. Offspring/parent regression analysis of mother-line progenies. Ir. J. Agr. Res., 11: 319-325.

MacLachlan, J.B. 1972c. Estimation of genetic parameters in a population of monogerm sugar beet (Beta vulgaris). 3. Analysis of a diallel set of crosses among heterozygous populations. Ir. J. Agr. Res., 11: 327-338.

Margara, J. 1960. Recherches sur le déterminisme de l'élongation et de la floraison dans le genre Beta. Ann. Amel. Plantes, 10: 361-471.

Mariani, C., De Beuckeller, M. Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R.B. 1990. Introduction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature, 347: 737-741.

McFarlane, J.S. 1975. Factors affecting sugarbeet seed germination in North America. IIRB, 7: 1-9.

McFarlane, J.S., Skoyen, I.O. and Lewellen, R.T. 1972. Performance of sugarbeet hybrids as diploids and triploids. Crop Sci., 12: 118-119.

Mesken, M. 1989. Respons van divergente massaselectie op kophoogte bij diploide en tetraploide suikerbieten. Prophyta, 43: 49-51.

Moltz, E. 1917. Über die Züchtung widerstandsfähiger Sorten unserer Kulturpflanzen. Z. Pflanzenzücht., 5: 121-144.

Munerati, O. 1924. Observations sur la montée à graine des betteraves dans la première année. Compte rendu de l'Académie des sciences, 179: 604-606.

Munerati, O. 1932. Sull'incrocio della barbabietola coltivata con la beta selvaggia della costa adriatica. Industria Saccar. Ital., 25: 303-304.

Nakamura, C., Skaracis, G. and Romagosa, I. 1991. Cytogenetics and breeding in sugarbeet. In: Tsuchiya, T. and Gupta, P.K. (eds), Chromosome engineering in plants, Elsevier, Amsterdam, pp. 295-313.

Nakamura, C. and Tsuchiya, T. 1982. Pachytene chromosome morphology in diploid sugar beet, Beta vulgaris. Z. Pflanzenzücht., 89: 229-244.

Nakamura, C. and Tsuchiya, T. 1988. Nematode resistance and meiotic abnormality in diploid sugar beet selected for interspecific Beta vulgaris x B. procumbens hybrids. Plant Breeding, 100: 41-53.

Nelson, R.T. and Deming, G.W. 1952. Effect of bolters on yield and sucrose content of sugar beets. Sugar Beet Tech., 441-442.

Oltmann, W., Burba, M. and Bolz, G. 1984. Die Qualität der Zuckerrübe: Bedeutung Beurteilungskriterien und züchterische Massnahmen zu ihrer Verbesserung. In: Fortschritte der Pflanzenzüchtung, 12: 1-159. Verlag Paul Parey, Berlin.

Orlovskii, N.J. 1957. Monogerm sugar beet. Field Crop Abstr., 10: 221-224.

Owen, F.V. 1945. Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets. J.Agr.Res., 71: 423-440.

Owen, F.V. 1948. Utilization of male-sterility in breeding superior-yielding sugar beets. Proc.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 5: 156-161.

Owen, F.V. 1950. The sugarbeet breeder's problem of establishing male-sterile populations for hybridization purposes. Proc.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 6: 191-194.

Owen, F.V. 1954a. Hybrid sugar beets made by utilizing both cytoplasmic and Mendelian male sterility. Proc.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 8: 64.

Owen, J.V. 1954b. The significance of single gene reactions in sugar beets. Proc.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 8: 392-398

Perez, P., Gerentes, D., Kallerhoff, J., Hosemans, S., Tahar, S.B. and Perret, J. 1990. Biotechnologies and rhizomanie. IIRB 53rd Winter Congress, 47-52.

Perry, D.A. 1973. Studies on field establishment of monogerm sugar beet. J.Agric.Sci.Camb., 81: 245-252.

Peto, F.H. and Boyes, J.W. Comparison of diploid and triploid sugar beet. Canad.J.Res., 18: 273-282.

Potrykus, I. 1991. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol., 42: 205-225.

Powers, LeRoy, Finkner, F.E., Doxtator, C.W. and Swink, J.F. 1957. Preliminary studies on reciprocal recurrent selection in sugar beets. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 9: 596-610.

Powling, A. 1982. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugarbeet with normal and male sterile cytoplasm. Heredity, 49: 117-120.

Rasmusson, J. and Levan, A. 1939. Tetraploid sugar beets from colchicine treatments. Hereditas, 25: 97-102.

Richard-Molard, M. 1985. Rhizomanie, situation en 1985. Proc. 48th Winter Congr.I.I.R.B., 347-356.

Rietberg, H. 1959. Virus yellows of sugar beet and its control. Proc.Winter Congr.I.I.R.B., 269-309.

Romagosa, I. 1982. Family size in primary trisomic analysis. An.Aula Dei, 16: 67-94.

Romagosa, I. 1983. Primary trisomics in sugar beet. PhD Thesis Dissertation. Colorado State University.

Romagosa, I., Cistué, L., Tsuchiya, T. and Lasa, J.M. 1985. Cytological identification of acrotrisomy in sugar beet. J.Hered., 76: 227-228.

Romagosa, I., Cistué, L., Tsuchita, T., Lasa, J.M. and Hecker, R.J. 1987. Primary trisomics in sugar beet: II. Cytological identification. Crop Sci., 27: 435-439.

Romagosa, I., Cistué, L., Tsuchita, T., Lasa, J.M. and Hecker, R.J. 1988. Restitution gametes in sugar beet primary trisomics. J.Hered., 79: 306-308.

Romagosa, I., Hecker, R.J. and Lasa, J.M. 1982. Conversion of sugar beet primary trisomic types into annual and male sterile condition. An.Aula Dei, 16: 141-149.

Romagosa, I., Hecker, R.J., Tsuchita, T. and Lasa, J.M. 1986. Primary trisomics in sugar beet: I. Isolation and morphological characterization. Crop Sci., 26: 243-249.

Romagosa, I., Hecker, R.J., Tsuchita, T., Cistué, L., Casas, A. and Lasa, J.M. 1991. Registration of eight sugarbeet trisomics genetic stocks. Crop Sci., 31: 248-249.

Romagosa, I. and Fox, P.N. 1992. Genotype x Environment Interaction. In: Hayward, M., Bosemark, N.O. and Romagosa, I. (eds) Plant Breeding: Principles and Perspectives, Chapman & Hall, London (in press).

Rommel, M. 1965. Cytogenetics of autotetraploid sugar beet (Beta vulgaris L.) Part I: Tetraploid varieties. Der Züchter, 35: 219-222.

Russel, G.E. 1960. Breeding for resistance to sugar beet yellows. British Sugar Beet Review, 28: 163-170.

Russel, G.E. 1966. Recent developments in breeding for resistance to virus yellows of sugar beet. Acta Agric.Scand. Suppl., 16: 140-143.

Russel, G.E. 1968. The distribution of sugar beet yellowing viruses in East Anglia from 1965-1968. British Sugar Beet Review, 37:77-84.

Saunders, J.W. 1982. A flexible in vitro shoot culture propagation system for sugarbeet that includes rapid floral induction of ramets. Crop Sci., 22: 1102-1105.

Savitsky, H. 1954. Self-sterility and self-fertility in monogerm beets. Proc.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 8: 29-33.

Savitsky, H. 1960. Viable diploid, triploid and tetraploid hybrids between Beta vulgaris and species of the section Patellares. J.Am.Soc.Sugar Beet Tech., 11: 215-235.

Savitsky, H. 1978. Nematode (Heterodera schachtii) resistance and meiosis in diploid plants from interspecific Beta vulgaris x B. procumbens hybrids. Can.J.Genet.Cytol., 20: 177-186.

Savitsky, V.F. 1950. Monogerm sugar beets in the United States. Proc.Am.Soc.Sugar Beet Tech., 6: 156-159.

Schwanitz, F. 1938. Die Herstellung polyploider Rassen bei Beta-Rüben und Gemüsearten durch Behandlung mit Colchicin. Der Züchter, 10: 278-279.

Scott, R.K. and Longden, P.C. 1970. Pollen release by diploid and tetraploid sugar-beet plants. Ann.Appl.Biol., 66: 129-135.

Shaw, H.B. 1917. Climatic control of the morphology and physiology of beets. Sugar, 19: 387-391.

Silván, A. 1966. Primeras variedades poliploides de remolacha azucarera obtenidas en España. Genét.Ibérica, 17: 177-200.

Silván, A., Lasa, J.M. y Galán, A. 1972. Influencia de la temperatura en la germinación de la remolacha azucarera (Beta vulgaris L.). An.Aula Dei, 11: 366-376.

Smith, G.A. 1980. Sugarbeet. In: Fehr, W.R. and Hadley, H.H. (eds.) Hybridization of Crop Plants. ASA, Madison, Wisconsin. pp. 601-616.

Smith, G.A. 1987. Sugar beet breeding. In: Fehr, W.R. (ed) Principles of cultivar development Vol.2, Macmillan, New York.

Smith, G.A. and Gaskill, J.D. 1970. Inheritance of resistance to Cercospora leaf spot in sugar beet. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 16: 172-180.

Smith, G.A., Hecker, R.J., Maag, G.W. and Rasmuson, D.M. 1973. Combining ability and gene action estimates in an eight parent diallel cross of sugar beet. Crop Sci., 13: 312-316.

Smith, G.A., Hecker, R.J. and Martin, S.S. 1979. Effects of ploidy level on the components of sucrose yield and quality in sugarbeet. Crop Sci., 19: 319-323.

Smith, G.A. and Martin, S.S. 1989. Effects of selection for sugarbeet purity components on quality and sucrose extractions. Crop Sci., 29: 294-298.

Smith, G.A. and Ruppel, E.C. 1974. Cercospora leaf spot in sugar beet. Crop Sci., 14: 113-115.

Sperlingsson, Ch. 1981. The influence of the seed bed soil physical environment on seedling growth and establishment. IIRB 44th Winter Cong., 59-77.

Szota, M. and Szota, Z. 1971. Krzyżówki buraków cukrowych z gatunkami sekcji Patellares. Bull.IHAR, 6: 9-17.

Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. and Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for and old science, Bio/Technology, 257-264.

Theurer, J.C. and Ryser, G.K. 1969. Inheritance studies with a pollen fertility restorer sugar beet inbred. J.Amer.Soc.Sugar Beet Tech., 15: 538-545.

Tsuchiya, T. 1986. Chromosome engineering in sugarbeet breeding for cyst nematode resistance. Proc.Sugar Beet Res.Assoc.Japan, 28: 166-177.

Usai, M. 1988. Metodologia do ottenimento di linee maschio-sterili diploidi monogermi tolleranti la rizomania e la cercospora. Sementi Elette, 34: 29-33.

Whitney, E.D. 1989. Identification, distribution, and testing for resistance to rhizomania in Beta maritima. Plant Disease, 73(4): 287-290.

Willey, L.A. 1970a. Varietal differences in field emergence. J.Nat.Inst.Agric.Bot., 12: 347-354.

Willey, L.A. 1970b. The field emergence of monogerm varieties. British Sugar Beet Review, 39: 23-25.

Winner, C. 1987. Fortschritte im Kampf gegen die Rizomania-Forschung und Züchtung im strategischen Verband. Zuckerind., 112, 19-23.