

RIA, 33 (3): 77-104
Diciembre 2004
INTA, Argentina

ISSN edición impresa 0325-8718
ISSN edición en línea 1669-2314

BIOTECNOLOGÍA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPECIES FORRAJERAS

DIAZ, M.¹ ; ECHENIQUE, V.² ; SCHRAUF G.³ ; CARDONE, S.³,
POLCI, P.¹ ; LUTZ, E.¹ y SPANGENBERG, G.⁴

RESUMEN

Si bien las técnicas convencionales han contribuido sustancialmente al mejoramiento de las especies forrajeras, la aplicación de diferentes biotecnologías en los últimos 15 años ha redundado en importantes progresos, especialmente en lo que se refiere a calidad de forraje.

En este trabajo se describen los aportes de las herramientas biotecnológicas para ampliar la variabilidad genética como el cultivo de tejidos, la variación somaclonal, la hibridación somática y la transformación, la utilidad de los marcadores moleculares para la selección de caracteres agronómicos complejos y el rol de la genómica para la identificación de genes de interés para los cultivos forrajeros. Se mencionan además los problemas relacionados con el mejoramiento genético de estas especies, el rol de la biotecnología como complemento del mejoramiento convencional, la situación actual y las perspectivas en este campo.

Palabras clave: *cultivo in vitro, transformación, marcadores moleculares, genómica.*

Autor para correspondencia: V. Echenique. echeniq@criba.edu.ar

¹: Dpto. de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. San Andrés 800. 8000 Bahía Blanca.

²: CONICET y Dpto. de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. San Andrés 800. 8000 Bahía Blanca.

³: Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453. 1417 DSE. Capital Federal.

⁴: Plant Biotechnology Center-Agriculture Victoria. La Trobe University-Bundora, Victoria, Australia.

SUMMARY

BIOTECHNOLOGY AND GENETIC IMPROVEMENT OF FORAGE SPECIES

During the last century conventional breeding has contributed substantially to the genetic improvement of forage crops. In the last 15 years, the use of biotechnological tools has led to important progress, specially related to quality traits. This article describes the application of different biotechnological tools for the genetic improvement of forage species, like plant tissue culture, somaclonal variation, somatic hybridization and plant transformation. It also deals with the contribution of molecular markers to the selection of complex agronomic traits in forage species and the role of genomics in the identification of useful and interesting genes for forage crops. Problems related to the conventional breeding of these species as well as the importance of biotechnology as a complement of conventional breeding and the perspectives are discussed.

Keywords: *in vitro culture, transformation, molecular markers, genomic.*

INTRODUCCIÓN

Si bien el mejoramiento genético convencional ha tenido un gran impacto en el incremento del rendimiento, la calidad y la resistencia a plagas y enfermedades en cereales y oleaginosas (Evans, 1998), en las especies forrajeras los progresos han sido significativamente menores, especialmente en lo referido al rendimiento (Snaydon, 1985; Brummer, 1999). Esto obedece a varios factores, como un proceso más reciente de domesticación, la complejidad de objetivos, problemas reproductivos, de mercado y las menores inversiones realizadas en el área. Las herramientas biotecnológicas desarrolladas en los últimos 20 años ofrecen interesantes alternativas que pueden contribuir a mejorar esta situación.

El objetivo de este trabajo es describir el panorama actual en lo referido al mejoramiento de estas especies, la problemática de la producción pecuaria regional, la situación en Sudamérica y Argentina y la descripción de las principales herramientas biotecnológicas y su aplicación para solucionar problemas relacionados con caracteres de interés para el mejoramiento de los forrajes.

1. Mejoramiento tradicional

La ganancia genética de los cultivos forrajeros, en términos de materia seca cosechada, ha sido muy baja, con una tasa promedio del 4% por década, debido a distintos factores:

*La domesticación reciente o ausente, que imposibilita la utilización de especies con alto potencial forrajero debido a la escasa o no rentable producción de semilla de deficiente germinación.

*El producto que se consume (hojas) no es el mismo que se comercializa (semillas), existiendo generalmente una asociación negativa entre la producción de semilla y de forraje. Frecuentemente, una variedad que se destaca como forrajera tiene una escasa producción de semilla que la hace comercialmente no rentable.

*Sistemas reproductivos complejos que garantizan la alogamia, como la autoincompatibilidad o la presencia de una fuerte depresión por endocría, dificultan la propagación y la conservación de la identidad de los genotipos e imposibilitan la obtención de líneas endocriadas. Por otro lado, la apomixis y los órganos florales muy pequeños dificultan o imposibilitan los cruzamientos. El nivel de ploidía elevado (tetraploides a decaploides) se refleja en una mayor complejidad en la expresión de los caracteres de interés agronómico, dificultando la selección clonal para la obtención de variedades sintéticas (Pagano y Rimieri, 2001).

*En especies perennes, para poder sostener que un genotipo es superior a otro es necesario realizar evaluaciones por al menos 3 ó 4 años, especialmente porque el rendimiento del primer año puede no predecir el rendimiento acumulado de 4 años de pro-

ducción y porque las asociaciones entre perennidad y producción suelen ser negativas (Snaydon, 1985). Es decir que cada ciclo de selección llevaría 3 años.

*La producción de forraje no necesariamente predice la producción secundaria (carne, leche o lana), ya que es común hallar asociaciones negativas entre calidad y producción de forraje.

*Decisiones erróneas de manejo del rodeo que enmascaran los efectos de genotipos superiores.

*Menores inversiones en mejoramiento de especies forrajeras con respecto a cultivos agrícolas.

*Aunque la superficie dedicada a la producción pecuaria es mayor que la destinada a la agricultura, el valor de la tierra es inverso. Por ello, es posible predecir que en el futuro la producción pecuaria estará confinada al conjunto de áreas marginales.

*El mercado de semillas forrajeras en Argentina es lábil, debido a que gran parte de la misma se comercializa mediante «bolsa blanca», siendo parte de la economía marginal, no legal, por lo que los esfuerzos en la protección y las inversiones en el mejoramiento genético resultan insuficientes.

A pesar de estas dificultades, entre 1950 y 1960 se obtuvo en Argentina un elevado número de cultivares, muchos de los cuales son aún utilizados. Para ello se seleccionaron genotipos de especies forrajeras exóticas adaptados a las condiciones locales. A mediados de la década iniciada en 1990, el mejoramiento genético comenzó nuevamente a aportar materiales para reemplazar a los tradicionales y se inscribieron nuevos cultivares, producto de la domesticación de especies nativas.

2. Panorama Forrajero Nacional

Mientras que en la mayoría de los países productores de carne los granos constituyen la base de la alimentación del ganado (44% de la producción agrícola mundial) (Evans 1998), en Argentina la principal fuente de alimento la constituyen los pastizales nativos y las especies forrajeras cultivadas (60% y 10% de la superficie, respectivamente) que representan la principal ventaja económi-

ca de la producción pecuaria del país.

De acuerdo con Dubois (2001) existen 539 cultivares de forrajeras inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares. A comienzos de 1990 había solo 157, de los cuales el 50 % eran públicos, seleccionados en el país, fundamentalmente por el INTA, chacras experimentales provinciales o universidades Nacionales. La especie preponderante era la alfalfa, seguida por pasto ovillo, avena y cebada forrajera, festuca alta, cebadilla criolla, raigrás anual y perenne, trébol rojo y moha (Dubois, 2001). En este período se incorporaron 382 nuevas variedades a través del mejoramiento efectuado sobre un total de 75 especies (Fig.1). A pesar de que la alfalfa es la especie donde se colocaron mayores recursos en mejoramiento, la superficie sembrada pasó de 8 millones de ha a 4,5 entre 1990-2000 y sigue reduciéndose debido al desplazamiento de la rotación (cultivos agrícolas-pasturas) por siembra directa (trigo-soja RR). El 59% de los cultivares actuales se encuentran protegidos por derechos de obtentor. En alfalfa sólo el 38% es público.

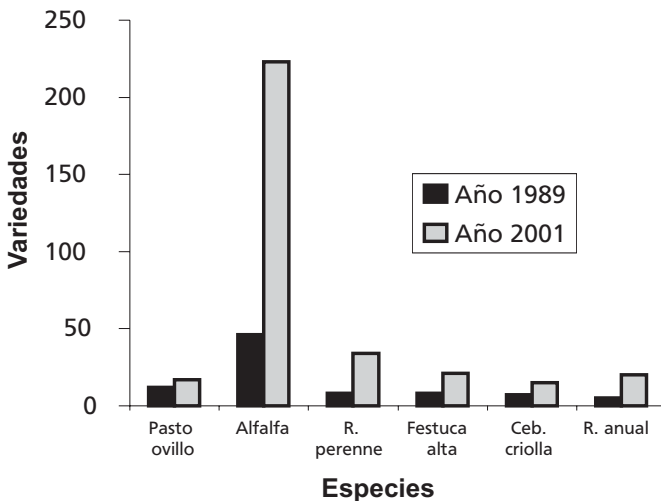


Figura 1. Número de variedades de las principales especies de forrajeras en Argentina.

El aporte de las instituciones nacionales decayó sustancialmente en los últimos años y se comenzó a aplicar protección a los nuevos cultivares. Por otro lado la cantidad de empresas registrantes se incrementó. De las 539 variedades actuales el 70 % proceden del extranjero (Fig.2).

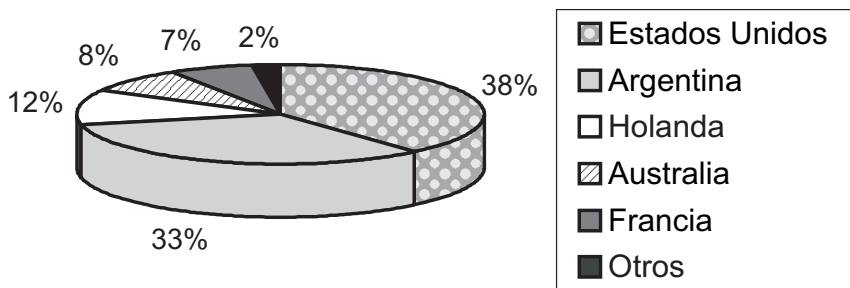


Figura 2. Origen de los cultivares de forrajeras utilizados actualmente en Argentina.

3. Incorporación de técnicas biotecnológicas

En los últimos años la biotecnología ha aportado varias metodologías para complementar los programas de mejoramiento, como el cultivo de tejidos, la hibridación somática, la variación somaclonal y la transgénesis. Esta última resulta muy promisoría, especialmente para incrementar la calidad del forraje, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y para manipular el crecimiento y desarrollo. Los marcadores moleculares brindan su utilidad para la identificación y selección de caracteres agronómicos complejos. Más recientemente, la genómica permite identificar a gran escala genes de interés para su introducción en los forrajes.

3.1. Cultivo de tejidos

En lo que respecta al cultivo *in vitro* y la regeneración de plantas se han desarrollado protocolos exitosos de regeneración para

un amplio rango de especies forrajeras a partir de órganos, tejidos y células. La utilización de explantos como embriones, semillas e inflorescencias es frecuente para la inducción de callo. Los dos primeros (semillas y embriones maduros) poseen la ventaja de hallarse disponibles durante todo el año, aunque si son sexuales segregan y no son clones de individuos destacados, por ello se han ideado protocolos partiendo de solo semilla. En estos casos se utiliza una semilla o embrión para iniciar una línea celular a partir de la cual se realizarán todas las manipulaciones de interés. Las vías de regeneración informadas son la embriogénesis somática y la organogénesis (Komatsuda *et al.*, 1993; Ríos *et al.*, 2001).

La utilización de meristemas minimiza el riesgo de inestabilidad genética que representan los callos, por lo cual se los ha empleado para la conservación de germoplasma y la micropropagación de *Lolium* y *Festuca* (Dale y Dalton, 1983; Perez-Vicente *et al.*, 1993) y *Dactylis glomerata* (Dale y Dalton, 1983). Los meristemas resultan además un método efectivo para la eliminación de virus que, sólo o combinado con quimioterapia, permitió la erradicación del virus del mosaico del tabaco (TMV) en *Trifolium pratense* (Phillips y Collins, 1979) y *Lolium multiflorum* (Dale, 1975). Este método permite la preservación a largo plazo en nitrógeno líquido (-196 C) o el almacenamiento a corto plazo en condiciones de crecimiento limitado para gramíneas (Spangenberg *et al.*, 1998) y leguminosas (Yamada *et al.*, 1991).

Las suspensiones celulares representan un blanco adecuado para la transformación por biolística, para la propagación clonal de un genotipo determinado y como fuente de protoplastos. Se las ha utilizado en *Dactylis glomerata* (Horn *et al.*, 1988), *Festuca* spp. (Wang *et al.*, 1993b, 1995; Spangenberg *et al.*, 1994; Fournier *et al.*, 1996), *Lolium multiflorum* (Wang *et al.*, 1993a, 1995), *Lolium perenne* (Wang *et al.*, 1993a; 1995), *Elymus gigantea* (Wang *et al.*, 1996), *Paspalum* spp (Akashi *et al.*, 1993); *Pennisetum purpureum* (Wan y Vasil, 1996), *Phragmites communis* (Wang *et al.*, 2001a) y *Eragrostis curvula* (Echenique *et al.*, 2001).

Los protoplastos se utilizan para la obtención de híbridos somáticos, cíbridos y para la transformación. Se han logrado plantas en *Festuca spp* (Takamizo *et al.*, 1990; Spangenberg *et al.*, 1994), *Lolium spp* (Wang *et al.*, 1993a, 1995), *Bromus inermis* (Gamborg *et al.*, 1970), *Dactylis glomerata* (Horn *et al.*, 1988), *Paspalum dilatatum* (Akashi y Adachi, 1992); *Pennisetum spp* (Wan y Vasil, 1996) y *Poa pratensis* (Nielsen *et al.*, 1993), entre otras. En *Medicago sativa* se obtuvieron protoplastos a partir de raíces (Xu *et al.*, 1982), de cotiledones (Lu *et al.*, 1982) y de hojas (Johnson *et al.*, 1981).

Las semillas artificiales solo se han informado para alfalfa (McKersie y Bowley, 1993) donde no se las utiliza a nivel comercial. Permiten la propagación vegetativa a gran escala o la producción de semilla híbrida comercial pero su obtención es aún muy laboriosa y los costos elevados.

El cultivo de anteras y micrósporas se utiliza para acelerar el proceso de mejoramiento a través de la producción de haploides. Se ha informado en *Festuca arundinacea* y *Festuca pratensis* (Nitsch y Nitsch, 1969; Niizeki, 1977), *Bromus inermis* (Saito *et al.*, 1973), *Dactylis glomerata* (Saito *et al.*, 1973), *Trifolium alexyrum* (Mokhtarzadeh y Costantin, 1978), *Medicago sativa* (Xu, 1979), *Avena sativa* (Rines, 1983), *Medicago denticulata* (Zagorska *et al.*, 1990), *Lolium spp* (Bante *et al.*, 1990; Opsahl-Ferstad *et al.*, 1994) y *Poa pratense* (Abdullah *et al.*, 1994). Un eficiente sistema de producción de haploides por cultivo de micrósporas permite obtener alrededor de 10.000 embriones de cebada en tiempos relativamente cortos (Kasha, 2001).

3.2 Métodos para incrementar la variabilidad

- **Variación somaclonal:** puede surgir de la variación preexistente en las células del explanto o inducirse durante el proceso de cultivo (Larkin y Scowcroft, 1981; Kaeppeler *et al.*, 2000). Se observó variación cromosómica en *Festuca arundinacea* (Dahleen y Eizenga, 1990) y *Eragrostis curvula* (Frayssinet *et al.*, 1999), albinismo en *Lolium perenne* (Dale *et al.*, 1981; Creemers-Molenar

et al., 1988) y *Festuca pratense* (Vallés et al., 1993), cambios en la morfología de la planta, forma y tamaño de hoja y espiga, desarrollo floral, vigor, y supervivencia en somaclones de *Lolium* (Ahloowalia, 1983; Jackson y Dale, 1989) y *Festuca arundinacea* (Roylance et al., 1994) y disturbios reproductivos en esta misma especie (García et al., 1994). El desarrollo de nuevos cultivares por esta técnica involucra un balance entre la cantidad de variación inducida y el mantenimiento de los caracteres agronómicos del cultivar. Como ejemplo puede citarse el caso de somaclones de pasto bermuda que dieron origen al cultivar Brazos-R3, que es resistente a la oruga militar (Croughan et al., 1994). Si bien desde el punto de vista práctico la variación somaclonal no resulta una técnica muy eficiente en planes de mejoramiento, es una excelente herramienta para estudios de estrés genómico (Kaepler et al., 2000).

- **Hibridación somática:** se utiliza para sortear barreras precigóticas para la hibridación, transferir resistencia a enfermedades o tolerancia a estreses y obtener citoplasmas híbridos (cibridos). La hibridación asimétrica y cibridización sirve como puente para la transferencia de genes individuales. Se han obtenido híbridos intergenéricos entre *Panicum maximum* (+) *Pennisetum americanum* (Ozias-Atkins et al., 1986), *Triticum monococcum* (+) *Pennisetum americanum* (Vasil et al., 1988) y *Festuca arundinacea* (+) *Lolium multiflorum* (Takamizo et al., 1991), entre otras. El primer caso de regeneración de plantas completas de híbridos intergenéricos en gramíneas fue el *Festulolium* (Takamizo et al., 1991; Spangenberg et al., 1994; Spangenberg et al., 1995).

A pesar de los esfuerzos realizados, esta estrategia no ha conducido a la obtención de híbridos de especies importantes debido a problemas de baja o nula fertilidad. Es, sin embargo, una excelente herramienta para estudiar interacciones núcleo-citoplasmáticas entre genomas.

- **Transformación:** las primeras gramíneas forrajeras transgénicas se obtuvieron por transformación de protoplastos. Actualmente el bombardeo de cultivos embriogénicos con

microproyectiles (Wang *et al.*, 2001b) y *Agrobacterium tumefaciens* (McKersie *et al.*, 1993; Boisson-Dernier *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001) representan los métodos más utilizados para la obtención de gramíneas y leguminosas transgénicas, respectivamente. Entre los caracteres «blanco» para esta tecnología se incluyen calidad de forraje, resistencia a plagas, enfermedades y estreses abióticos y la manipulación del crecimiento y desarrollo.

a) Calidad: incrementos del 1% en la digestibilidad *in vitro* del forraje conducen a un aumento en la producción animal del 3.2% de peso vivo promedio (Casler y Vogel, 1999). Entre los subcaracteres de calidad se encuentran:

a-1) Lignina: existe una correlación negativa entre su contenido y la digestibilidad de la materia seca en gramíneas y leguminosas (Albrecht *et al.*, 1987; Casler, 1987). Por ello se han desarrollado técnicas moleculares basadas en la regulación negativa de su biosíntesis, introduciendo genes en sentido o antisentido (Spangenberg *et al.*, 1998) que codifican para enzimas clave en este proceso, como la o-metil transferasa del ácido cafeico (COMT), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), 4-cumarato CoA ligasa (4CL) y cinamoil CoA reductasa (CCR). Este enfoque se ha aplicado en *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* y *Medicago sativa* (Tabe *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2001; Spangenberg *et al.*, 2001). Debido a las múltiples funciones que cumple la lignina en la planta, es necesario evaluar en ensayos a campo el vigor y la tolerancia a estreses de plantas con alteraciones en la vía mencionada.

a-2) Fructanos: están involucrados en las respuestas de las plantas a estreses ambientales tales como sequía y frío (Chatterton *et al.*, 1991; Pilon-Smits *et al.*, 1995). Su acumulación en gramíneas evita las reducciones en la digestibilidad durante el verano. Los levanos, fructanos sintetizados por ciertos microorganismos, se han expresado en *Lolium multiflorum* (Ye *et al.*, 2001), *Trifolium repens* (LePage *et al.*, 2000) y *Medicago sativa* (Jenkins *et al.*, 2000) mediante la introducción de genes como el de la fructosiltransferasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis* y de otros

microorganismos. También se han aislado y caracterizado genes involucrados en el metabolismo de fructanos de *Hordeum vulgare*, *Lolium perenne* y *Festuca arundinaceae* y se ha disectado la vía metabólica correspondiente.

a-3) Proteínas con alto valor nutritivo: la obtención de plantas transgénicas capaces de producir proteínas no degradables por la flora ruminal representa una alternativa a los suplementos de metionina y cisteína postruminales. Estos aminoácidos son esenciales para el crecimiento de la lana en ovinos. Genes que codifican para proteínas de este tipo fueron aislados, caracterizados e introducidos en plantas de festuca alta, alfalfa, trébol blanco y trébol subterráneo (Schroeder *et al.*, 1991; Ealing *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001c). Estas proteínas serían la ovoalbúmina de pollo, la albúmina de arveja y de semilla de girasol.

a-4) Taninos condensados: son, en cantidades moderadas (1-3% de peso seco), agentes antimeteorismo que protegen además a las proteínas de la desaminación ruminal (Tanner *et al.*, 1995). A niveles superiores al 4-5% son perjudiciales para la palatabilidad y digestibilidad. El objetivo es reducir su producción en especies que los expresan a niveles elevados e inducirlos en aquellas que no los sintetizan. Entre las estrategias para lograrlo se encuentran la regulación negativa (Colliver *et al.*, 1997) o positiva de enzimas clave en su biosíntesis (Kacser *et al.*, 1995), como la chalcona sintetasa (CHS) y leucoantocianina-4 reductasa (LAR) respectivamente, o la activación de la ruta biosintética mediante la expresión de genes reguladores apropiados que gobiernen la vía a través de un accionar pleiotrópico. La transformación de *Lotus corniculatus* con el gen regulatorio *Sn* de maíz, resultó en una disminución del contenido de taninos en hojas conjuntamente con un aumento del nivel de los mismos en raíz (Damiani *et al.*, 1999).

La alfalfa carece de taninos condensados en hojas y tallos. Sin embargo, la presencia de estos flavonoides en las semillas demuestra que la especie contiene todos los genes necesarios para su síntesis, lo que facilita su potencial manipulación.

b) Resistencia a estreses bióticos: se han introducido genes que codifican para proteínas antifúngicas (AFPs) como quitinasas en pasto miel (Schrauf *et al.*, 2003), glucanasas y quitinasas en alfalfa (Ferri *et al.*, 2002) y otras AFPs (identificadas en ensayos *in vitro*) en trébol subterráneo (Aldao *et al.*, 2000).

La expresión de genes virales completos o parte de ellos confiere una protección efectiva contra distintos virus que afectan a los forrajes, como ha sido el caso de genes de la cápside viral en trébol blanco (Chu *et al.*, 2000), trébol rojo (Kalla *et al.*, 2000) y raigrás perenne (Altpeter *et al.*, 2000). La tecnología Bt ha permitido lograr resistencia a insectos como porina (*Wiseana spp.*) en trébol blanco (Voisey *et al.*, 2001). Existen actualmente varios proyectos de genómica tendientes al estudio de las interacciones leguminosa/bacteria fijadora de nitrógeno, leguminosa/micorriza y la simbiosis gramínea/endófito, como la asociación con *Neotyphodium coenophialum* a fin de manipular la tolerancia a estreses bióticos y abióticos y alterar la especificidad endófito/hospedante (Johnson *et al.*, 2003).

c) Tolerancia a estreses abióticos: la toxicidad por aluminio, que representa un obstáculo severo en suelos ácidos, puede ser contrarrestada por la sobreexpresión de la enzima malato deshidrogenasa, que incrementa la síntesis de ácidos orgánicos y confiere tolerancia al aluminio en alfalfa transgénica (Tesfaye *et al.*, 2001). La introducción en alfalfa de genes de enzimas que neutralizan los radicales libres que se forman en situaciones de salinidad, frío o sequía, como la superóxido dismutasa (SOD), permiten una mayor supervivencia a campo en situaciones de estrés (McKersie *et al.*, 1996). La introducción de la nicotinamida sintetasa (NAS) de cebada en especies como raigrás perenne se espera que incremente la resistencia a deficiencias de hierro (Alpeter *et al.*, 2003).

d) Agricultura molecular: la expresión de proteínas industriales en plantas transgénicas agrega un valor extra al cultivo, convirtiéndolo en un interesante biorreactor. Existe, además, la tecnología apropiada para extraer las proteínas de interés industrial de

jando un residuo utilizable para la alimentación del ganado. Se han desarrollado y evaluado plantas de alfalfa que producen enzimas microbianas involucradas en la degradación de lignina y celulosa, en la elaboración del papel y en el procesado de almidón (Austin-Phillips y Ziegelhoffer, 2001) así como polímeros biodegradables (Purev *et al.*, 2000).

3.3. Marcadores moleculares

Los polimorfismos amplificados al azar (RAPDs) fueron los primeros marcadores moleculares utilizados en forrajeras (Williams *et al.*, 1990). Actualmente los más usados son los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificadas (AFLPs) y los polimorfismos en las secuencias simples repetidas (SSRPs) (Vos *et al.*, 1995). En un futuro cercano prevalecerán los marcadores basados en el polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) (Landegren *et al.*, 1998). Entre los objetivos para su utilización se encuentra la diferenciación de cultivares, la certificación de pureza varietal, la selección de parentales divergentes en caracteres específicos para obtener poblaciones de mapeo, el monitoreo de la estabilidad genética de especies que se propagan vegetativamente y por apomixis, la evaluación de la estructura poblacional de pasturas naturales y artificiales y la discriminación entre especies similares (Forster *et al.*, 2001). Se han utilizado para establecer relaciones genéticas entre accesiones de *Bromus spp.* de los Andes (Zuñiga-Rebolledo *et al.*, 2000), para presentar evidencias de la expansión de la agricultura en Europa (ver Balfourier *et al.*, 2000), para establecer relaciones filogenéticas en alfalfa (Campbell, 2000) y estudiar la diversidad genética en poblaciones de trébol blanco (Gustine y Sanderson, 2001) y de *Lolium perenne* (Posselt y Bolaric, 2000).

También han sido y son empleados para mapeo y selección asistida (SAMM). Debido a que muchos cultivos forrajeros son complejos poliploides con genomas derivados de varios progenitores o con herencia polisómica, el desarrollo de mapas de ligamiento es más complicado y más costoso que en especies

diploides. Entre las gramíneas, los mapas de ligamiento más desarrollados son los de las Poáceas, donde el mapeo comparativo ha revelado extensa conservación en genes y marcadores entre los distintos géneros (Taylor *et al.*, 2001). Se están desarrollando mapas genéticos de raigrás perenne, festuca alta y alfalfa (Forster *et al.*, 2001), siendo este último el más avanzado (Brouwer y Osborn, 1999; Brummer *et al.*, 2000a; Kaló *et al.*, 2000). Se mapearon varios genes y QTLs (loci de caracteres cuantitativos), incluyendo hojas unifoliadas, tolerancia a aluminio, embriogénesis somática, color de la flor, enanismo, rendimiento y resistencia a frío. En algunas gramíneas el mapeo se ha orientado a la localización de genes de apomixis (Pessino *et al.*, 1999; Ortíz *et al.*, 2001), que es un tipo de reproducción agámica característico de muchas forrajeras como *Bothriochloa*, *Cenchrus*, *Chloris*, *Digitaria*, *Eriochloa*, *Heteropogon*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Sorghum*, *Themeda*, *Urochloa*, *Setaria* y *Eragrostis*. El estudio de estos genes se realiza a través del uso de marcadores moleculares, análisis de ADNc y de sintenia genómica en híbridos intra e interespecíficos. El objetivo sería transferirlos a especies de interés agronómico. También se intenta obtener un sistema funcional de apomixis en alfalfa (Rossellini y Veronesi, 2002).

Con hibridación *in situ* se desarrolló un mapa genético ubicando secuencias conocidas e identificando genes en cromosomas específicos de alfalfa (Bauchan *et al.*, 2002). La hibridación *in situ* del genoma completo de una especie con el de otra (GISH), como en el caso del complejo *Medicago sativa* permitirá responder a interrogantes relacionados con la evolución de los poliploides actuales, la introgresión de secuencias foráneas y los rearrreglos cromosómicos (Bauchan *et al.*, 2002).

Los mayores esfuerzos para aplicar SAMM fueron realizados en alfalfa, donde se identificaron QTLs y RFLPs asociados con la tolerancia al aluminio. Esto permitió la introgresión de los mismos desde germoplasma diploide a cultivares tetraploides (Sledge *et al.*, 2002). En la mayoría de las leguminosas los caracteres más

importantes para seleccionar por SAMM son aquellos relacionados con el rendimiento y la adaptación. Ver las revisiones de Forster *et al.*, (2001) y Wang *et al.*, (2001b).

3.4. Genómica

Las leguminosas modelo para los emprendimientos genómicos han sido *Medicago truncatula* (Cook y Denarie, 2000) y *Lotus japonicus* (Gresshoff *et al.*, 2000) donde se han generado 100,000 ESTs (etiquetas de secuencias expresadas) a través de consorcios internacionales (Spangenberg *et al.*, 2001). Para las gramíneas se utilizaron como modelos el arroz y *Brachypodium distachyon*, que en la evolución de las Poideae se encuentra antes de la divergencia de los géneros más importantes que incluyen a la mayoría de las especies de cereales y forrajes de clima templado. Los ecotipos diploides de esta especie ($2n=2x=10$) tienen 5 pares de cromosomas fácilmente distinguibles y su genoma posee un tamaño similar al de *Arabidopsis*, siendo el genoma más simple de gramíneas. Esto, sumado a un ciclo de vida corto, pequeño tamaño, buena respuesta al cultivo *in vitro* y a la facilidad de transformación por bombardeo de micropartículas, lo convierten en un interesante modelo de estudio. El programa de Genómica de Pasturas entre Australia y Nueva Zelanda ha generado aproximadamente 100,000 ESTs de forrajeras típicas de clima templado como raigrás perenne (*L. perenne*) y trébol blanco (*T. repens*) (Spangenberg *et al.*, 2001). Este programa contempla, además, la búsqueda de genes de especies exóticas como *Deschampsia antarctica*, *Agrostis adamsonii* y *Agrostis robusta*, resistentes a frío, salinidad y aluminio, respectivamente, para introducirlos en especies forrajeras de interés comercial.

4. Estado de la investigación biotecnológica en el 2004

La mayoría de los trabajos presentados en el Tercer Simposio Internacional sobre «Molecular Breeding of Forage and Turf», realizado en Texas, USA. en mayo del 2003 tienen un enfoque

genómico y están orientados a la construcción de mapas, a la dilucidación de vías metabólicas y a la identificación y caracterización de genes, como los de resistencia a patógenos (hongos, insectos y bacterias) o los involucrados en la resistencia a frío, calor, aluminio y sequía o los responsables de la autoincompatibilidad en *Lolium perenne*, de vernalización, embriogénesis somática, de control de floración, apomixis e interacción planta-simbionte.

La calidad continúa siendo el blanco fundamental para el mejoramiento. El último enfoque fue la modificación de lípidos para mejorar el redimiento animal y generar efectos positivos en la calidad de la leche y la carne. Se obtuvieron plantas transgénicas de festuca alta con modificaciones en la cantidad y calidad de lignina, lo que incrementó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de un 7,2 al 10,5%. Se dilucidó la vía completa de biosíntesis de lignina y se perfiló una hipotética vía de síntesis de saponinas en *M. truncatula*. Se identificaron genes que podrían activar la biosíntesis de taninos condensados y se iniciaron pruebas de campo con raigrás transgénico que expresa bajos contenidos de alérgenos en el polen.

Los temas de investigación en el área que han suscitado el interés de los investigadores en los últimos años se presentan en la figura 3.

5. Situación actual de la investigación biotecnológica en Sudamérica y la Argentina

Se tuvieron en cuenta los trabajos en especies forrajeras presentados en congresos de REDBIO Argentina y Latinoamericana (1995, 1998, 2001 y 2002) y el Congreso Argentino de Genética (1999, 2001, 2002 y 2003) (Fig. 4).

REDBIO 95: Seis de 332 comunicaciones (1,81%) (5 de Argentina y 1 de Brasil), involucraban trabajos en cultivo de tejidos (*Eragrostis curvula* (2), *Brachiaria* (1), *Setaria* (1), *Medicago* (1) y *Desmodium* (1)).

REDBIO 98 Seis de 621 comunicaciones (0,97%). Tres sobre cultivo de tejidos (*Arachis pintoi*, *Panicum maximum*, *Vigna*

92 Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras

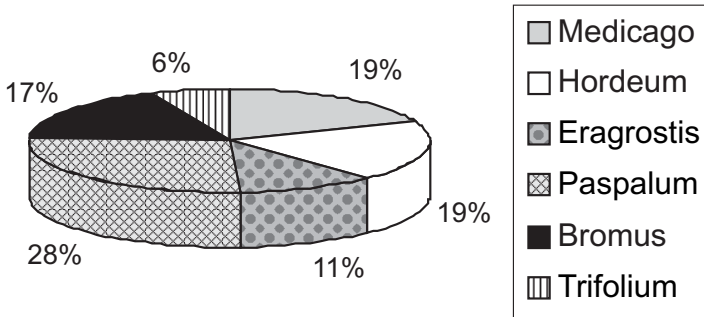


Figura 3. Géneros en los cuales se ha centrado la investigación en biotecnología de forrajeras en los últimos años en Sudamérica.

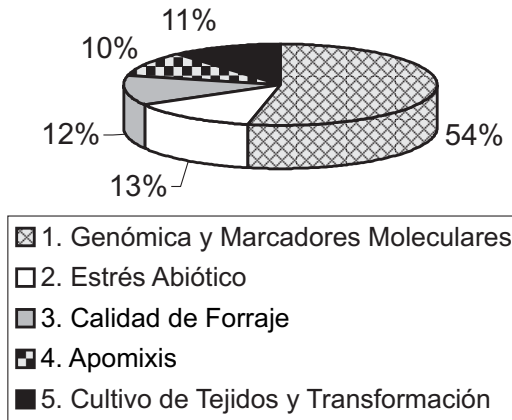


Figura 4. Temas de investigación en biotecnología de forrajeras que han suscitado el interés de los investigadores en los últimos años.

luteola), 1 sobre apomixis (*Brachiaria*), 1 de marcadores moleculares (*Bromus*) y 1 de transformación (*Sorghum*).

REDBIO 2001: 18 de 398 trabajos (4,52%). Tres de cultivo de tejidos (*Avena sativa*, *Brachiaria* y *Eragrostis curvula*), 10 de optimización de protocolos de transformación y aplicaciones de

transgénesis (*Hordeum vulgare*, *Paspalum dilatatum*, *Eragrostis curvula*, *Avena sativa*, *Brachiaria brizantha*, *Medicago sativa*) y 5 en marcadores moleculares (*Bromus*, *Medicago sativa* y *Hordeum vulgare*).

REDBIO 2002: Trece de 117 comunicaciones (11,1%). Seis sobre distintos aspectos del mejoramiento de alfalfa por transformación: manipulación de la biosíntesis de taninos condensados; expresión del virus de la fiebre aftosa; de un epítotope inmunodominante (eBRV4) del rotavirus bovino con el fin de evaluar su efectividad como inmunógeno y agente terapéutico; de la glicoproteína gp53 del virus de la diarrea viral bovina (VDVB), y tolerancia a enfermedades fúngicas. Un trabajo presentó la optimización de un protocolo de transformación para el género *Paspalum*. El resto incluyó cultivo de tejidos en *Arachis glabra*, caracterización molecular de líneas selectas de *Bromus catharticus* y clonado de genes de frutossiltransferasas de *B. pictus*.

En aproximadamente 10 años se ha pasado desde la puesta a punto de técnicas de cultivo de tejidos a la utilización de transgénesis y marcadores moleculares. Recientemente la CONABIA autorizó la realización de ensayos en condiciones de invernáculo para alfalfa y pasto miel.

Existen grupos trabajando en el área en el Instituto de Botánica del Nordeste y la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) (en Corrientes), la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, el INTA Castelar, el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, la Facultad de Agronomía de la UBA y de la Universidad de San Luis y el Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) de Córdoba.

CONCLUSIONES

En función del panorama descrito, es de esperar que en los próximos años el número de genotipos de especies forrajeras se incremente sustancialmente como producto de la complementación de la biotecnología con los métodos conven-

cionales de mejoramiento. El desafío actual es estudiar la base de caracteres complejos, realizar selección asistida por marcadores moleculares, evaluar el potencial de la transferencia de genes, generar variabilidad genética y nuevo germoplasma elite e incorporarlos en programas de mejoramiento. La utilización de marcadores moleculares permitirá entender y capturar la heterosis, identificar QTLs, desarrollar detallados mapas genéticos, introgresar variación genética, realizar selección y determinar los factores involucrados en las interacciones genotipo ambiente. La aplicación de transgénesis y mejoramiento molecular implicará avances significativos en el mejoramiento de la calidad del forraje, la resistencia a plagas y enfermedades y brindará la posibilidad de agregar valor a los cultivos forrajeros mediante la incorporación de genes que permitan la obtención de proteínas recombinantes heterólogas.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDULLAH, A.; PEDERSEN, S.; ANDERSEN, S.B. 1994. Triploid and hexaploid regenerants from hexaploid timothy (*Phleum pratensis* L.) via anther culture. *Plant Breed.*, 112: 342-345.
- AHLOOWALIA, B.S. 1983. Spectrum of variation in somaclones of triploid ryegrass. *Crop. Sci.*, 23: 1141-1147.
- AKASHI, R.; ADACHI, T. 1991. High frequency somatic formation in cultures of immature embryos of guineagrass, *Panicum maximum*. *Jpn. J. Breed.*, 41: 85-93.
- AKASHI, R.; ADACHI, T. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). *Plant Sci.*, 82: 219-225.
- AKASHI, R.; HASHIMOTO, A.; ADACHI, T. 1993. Plant regeneration from seed-derived embryogenic callus and cell suspension cultures of bahiagrass (*Paspalum notatum*). *Plant Sci.* 90: 73-80.
- ALBRECHT, K.A.; WEDIN, W.F.; BUXTON, D.R. 1987. Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop. Sci.*, 27: 735-741.
- ALDAO, G.; DRAYTON, M.; KALLA, R.; CAMMUE, B.; SPANGENBERG, G. 2000. Development of transgenic subterranean clover expressing different chimeric AFP genes for enhanced resistance to fungal disease. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria,

- Australia, 2000. p 110.
- ALPETER, F.; HENSEL, G.; VALKOV, V.; BAEUMLEIN, H.; XU, J. 2003. Improvement of iron deficiency tolerance by ectopic expression of a barley nicotinamine synthase in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Abstracts 3th International Symposium Molecular Breeding of Forage and Turf, Dallas, Texas and Ardmore, Oklahoma, USA. p 29
- ALTPETER, F.; XU, J.P.; SALAHUDDIN, A.; POSSELT, U.K.; SCHUBERT, J. 2000. RNA-mediated virus resistance in fertile transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, 2000. p 103.
- AUSTIN-PHILLIPS, S.; ZIEGELHOFFER, T. 2001. The production of value-added proteins in transgenic alfalfa. In: Molecular Breeding of Forage Crops. (ed. G. Spangenberg). Kluwer Acad. Pub. pp. 285-302.
- BALFOURIER, F.; IMBERT, C.; CHARMET, G. 2000. Use of restriction fragment analysis of chloroplast DNA to infer colonizations routes of *Lolium* species in Europe. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, 2000. pp. 88.
- BANTE, I.; SONKE, T.; TANDLER, R.F.; VAN DEN BRUEL, A.M.R.; MEYER, E.M. 1990. Anther culture of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*. In: The impact of Biotechnology in Agriculture. (eds. R.S. Sangwan y B.S. Sangwan-Norreel), Kluwer Acad. Dordrecht. pp.105-127
- BAUCHAN, G.R.; CAMPBELL, T.A.; HOSSAIN, M.A. 2002. Chromosomal polymorphism as detected by c-banding patterns in chilean alfalfa germoplasm. *Crop Sci.*, 42: 1291-1297.
- BOISSON DERNIER, A.; CHABAUD, M.; GARCIA, F.; BECARD, G.; ROSENBERG, C.; BARKER, D.G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant Microbe Interactions*, 14:695-700.
- BROUWER, D. J.; OSBORN, T.C. 1999. A molecular linkage map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 99: 1194-1200.
- BRUMMER, E. C. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci*, 39:943-954.
- BRUMMER, E.C.; BOUTON, J.H.; SLEDGE, M.; KOCHERT, G. 2000a. Molecular mapping in alfalfa related species. In: DNA-based markers in plants. (eds. I.K. Vasil y R. Phillips). Kluwer Acad. Dordrecht.
- BRUMMER, E.C.; LUTH, D.; COUNCIL, C.L. 2000b. Mapping yield and winterhardiness in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Proc. Plant and Animal Genome VIII*, San Diego. U.S.
- CAMPBELL, T.A. 2000. Molecular analysis of genetic relatedness among alfalfa clones differing in levels of self-incompatibility. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia. 2000.

- CASLER, M.D. 1987. In vitro digestibility of dry matter and cell wall constituents of smooth bromegrass forage. *Crop Sci.*, 27: 931-934.
- CASLER, M.D.; VOGEL, K.P. 1999. Accomplishments and impact from breeding for increased forage nutritional value. *Crop Sci.*, 39: 12-20.
- CHATTERTON, N.J.; THORNLEY, W.R.; HARRISON, P.A.; BENNETT, J.H. 1991. DP-3 and DP-4 oligosaccharides in temperate and tropical grass foliage grown under cool temperatures. *Plant Physiol. Biochem.*, 29: 367-372.
- CHU, P.; HOLLOWAY, B.; VENABLES, I.; LANE, L.; GIBSON, J.; LARKIN, P.; HIGGINS, T.J. 2000. Development of transgenic white clover (*Trifolium repens*) with resistance to clover yellow vein virus. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia. 2000.
- COLLIVER, S.P.; MORRIS, P.; ROBBINS, M.P. 1997. Differential modification of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis with an antisense chalcone synthase construct in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Mol Biol.*, 35: 509-522.
- COOK, D.R.; DENARIE, J. 2000. Progress in the genomics of *Medicago truncatula* and the impact for grain legume crops. NSF Project 9872664, 1999-2000 Progress Report (NSF Plant Genome Program). <http://www.medicago.org/documents/NSFReport2000.html>
- CREEMERS-MOLENAR, J.; LOEFFEN J.P.M.; VAN DER VALK, P. 1988. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence-derived callus of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. *Plant Sci.*, 57:165-172.
- CROUGHAN, S.S.; QUISENBERRY, S.S.; COLYER, P.D.; BROWN, T.F. 1994. Registration of Brazos-R3 bermudagrass germplasm. *Crop Sci.* 34:542.
- DAHLEEN, L.S.; EIZENGA, G.C. 1990. Meiotic and isozymic characterization of plants regenerated from euploid and selfed monosomic tall fescue embryos. *Theor. Appl. Genet.*, 79: 39-44.
- DALE, P.J. 1975. Meristem tip culture in *Lolium multiflorum*. *J. Exp. Bot.*, 26:731-736.
- DALE, P.J.; DALTON, S.J. 1983. Immature inflorescence culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 111:39-45.
- DALE, P.J.; THOMAS, E.; BRETTELL, R.I.S.; WERNICKE, W. 1981. Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture.*, 1:47-55.
- DAMIANI, F.; PAOLOCCI, F.; CLUSTER, P.; ARCIONI, S.; TANNER, G.; JOSEPH, R.; LI, Y.; DE MAJNIK, J.; LARKIN, P. 1999. The maize transcription factor Sn alter proanthocyanidin synthesis in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Aust J Pl Physiol*, 26: 159-169.
- DAVIES, L.J.; COHEN, D. 1992. Phenotypic variation in somaclones of *Paspalum dilatatum* and their seedling offspring. *Can. J. Plant Sci.* 72: 773-784.
- DUBOIS, M. 2001. «El escenario varietal argentino y la red de ensayos de variedades forrajeras». Génesis, Revista de la Cámara de Semilleristas de la Bolsa de

Cereales. Argentina.

- EALING, P.M.; HANCOCK, K.R.; WHITE, D.W.R. 1994. Expression of the pea albumin 1 gene in transgenic white clover and tobacco. *Transgenic Res.*, 3: 344-354.
- ECHENIQUE, V.; DÍAZ, M.; POLCI, P.; MROGINSKI, L. 2001. Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Biocell*. 25: 131-138.
- EVANS, L.T. 1998 *Feeding Ten Billion*. Cambridge. Univ. Press Cambridge. UK.
- FERRI, A.; GALLETA, G.; RIOS, R.; LLORENTE, B.; ARDILA, F.; FRANZONE, P. 2002. Obtención de plantas transgénicas de alfalfa con tolerancia a enfermedades fúngicas V Simposio Nacional de Biotecnología Vegetal, REDBIO Argentina.
- FORSTER, J.; JONES, E.; KÖLLIKER, R.; DRAYTON, M.; DUMSDAY, J.; DUPAL, M.; GUTHRIDGE, K.; MOHONEY, N.; VAN ZIJLL DE JONG, E.; SMITH, K. 2001. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: *Molecular breeding of forage crops*. (ed. G. Spangenberg). Kluwer Academic Publishers. pp.101-133.
- FOURNIER, D.; GHESQUIERE, M.; POISSON, C. 1996. Plant regeneration from cell suspension cultures of tetraploid tall fescue. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 46:165-168.
- FRAYSSINET, N.; CARDONE, S.; POLCI, P.; MROGINSKI, L.; ECHENIQUE, C.V. 1999. Cytological alterations in *Eragrostis regenerants*: *Cytologia* 64: 129-135.
- GAMBORG, O.L.; CONSTABEL, F.; MILLER, R.A. 1970. Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of *Bromus inermis*. *Planta*, 95:355-358.
- GARCÍA, A.; DALTON, S.J.; HUMPHREYS, M.O. 1994. Reproductive disturbances and phosphoglucoisomerase instability in *Festuca arundinacea* (tall fescue) plants regenerated from callus and cell suspension cultures. *Heredity*, 73:355-362.
- GRESSHOFF, P.M.; MEN, A.E.; MAGUIRE, T.; GRIMMOND, S.; LOHAR, D.; AYANRU, S.; MEKSEM, K.; LIGHTFOOT, D.; STILLER, J. 2000. An integrated functional genomics and genetics approach for the plant's function in symbiotic nodulation. In: *Molecular breeding of forage crops*. (ed. G. Spangenberg). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- GUO, D.; CHEN, F.; INOUE, K.; BLOUT, J.; DIXON, R.A. 2001. Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell*, 13:73-88.
- GUSTINE, D.; SANDERSON, M. 2001. Quantifying spatial and temporal genotypic changes in white clover populations by RAPD technology. *Crop Scie.*, 41: 143-148.
- HORN, M.E.; CONGER, B.V.; HARMS, C.T. 1988. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Plant Cell Rep.*, 73:371-374.
- JAKSON, J.A.; DALE, P.J. 1989. Somaclonal variation in *Lolium multiflorum* L. and

- L. temulentum* L. Plant Cell Rep. 8:161:164.
- JENKINS, C.; SIMPSON, R.; HIGGINS, T.J.; LARKIN, P. 2000. Transgenic white clover and lucerne containing bacterial fructan as a novel carbohydrate for grazing animals. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, 2000. p.32.
- JOHNSON, L.B.; STUTEVILLE, D.L.; HIGGINS R.K.; SKINNER, D.Z. 1981. Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected clones. Plant Sci. Lett. 20:297-304.
- JOHNSON, R.; CAMPBELL S.; CHRISTENSEN M.; VOISEY C.; BRYAN, G. 2003. Identification of perennial ryegrass and endophyte proteins involved in symbiosis. Abstracts 3th International Symposium Molecular Breeding of Forage and Turf, Dallas, Texas and Ardmore, Oklahoma, USA. p 54
- KACSER, H.; BURNS, J.; FELL, D. 1995. The control of flux. Bioc. Soc. Trans. 23: 341-366.
- KAEPLER, S.; KAEPLER, H.; RHEE, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology, 43: 179–188.
- KALLA, R.; LUDLOW, E.; LEPAGE, C.; BRAMMAR, G.; NAGEL, J.; SPANGENBERG, G. 2000. Development of clovers with immunity to white clover mosaic virus. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, 2000. p.106.
- KALO, P.; ENDRE, G.; ZIMNAYI, L.; CSANÁDI, G.; KISS, G.B. 2000. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Theor. Appl. Genet. 100: 641-657.
- KARP, A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Euphytica, 85: 295-302.
- KASHA, K.J.; SIMION, E.; ORO, R.; YAO, Q.A.; HU, T.C.; CARLSON, A.R. 2001. An improved in vitro technique for isolated microspore culture in barley. Euphytica 120: 379-385.
- KHAN, M.R.I.; CERIOTTI, A.; TABE, L.; ARYAN, A.; MCNABB, W.; MOORE, A.; CRAIG, S.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. 1996. Accumulation of a sulphur-rich seed albumin from sunflower in the leaves of transgenic subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) Transgenic Res. 5: 179-185.
- KIM, K.Y.; SUNG, B.R.; RIM, Y.W.; CHOI, G.J.; LIM, Y.C.; JANG, Y.S.; SEO, S.; YOON, S.H.; PARK, G.J.; JO, J. 2001. Transformation of alfalfa by BcHSP17.6 gene using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Kor. Soc. Grassl. Sci., 21: 151-156.
- KOMATSUDA, T.; ANNAKA, T.; OKA, S. 1993. Genetic mapping of a quantitative traits locus (QTL) that enhances the shoot differentiation rate in *Hordeum vulgare* L. Theor. Appl. Genet., 86:713-720.
- LANDEGREN, U.; NILSSON, M.; KOWK, P.Y. 1998. Reading bits of genetic information – methods for single nucleotide polymorphism analysis. Genome Res. 8: 769-776.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60:197-

214.

- LE PAGE, C.; MACKIN, L.; LIDGETT, A.; SPANGENBERG, G. 2000. Development of transgenic white clover expressing chimeric bacterial levansucrase genes for enhanced tolerance to drought stress. Abstracts 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, 2000. p.80.
- LU, D.Y.; PENTAL D; COCKING, E.C. 1982. Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. Z.Pflanzenphysiol., 107:59-63.
- MCKERSIE, B.D.; BOWLEY, S.R. 1993. Synthetic seed in alfalfa. In Synseeds Applications of Synthetic Seed to Crop Improvement. (ed. K. Redenbaugh), CRC Press Boca Raton., pp. 231-255.
- MCKERSIE, B.D.; BOWLEY, S.R.; HARJANTO, E.; LEPRINCE, O. 1996. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase, Plant Physiol., 111:1177-1181.
- MOKHTARZADEH, A.; COSTANTIN, J.M. 1978. Plant regeneration from hypocotyl and anther derived callus of barseem clover. Crop Sci.18:567-572.
- NIELSEN, K.A.; LARSEN, E.; KNUDSEN, E. 1993. Regeneration of protoplast-derived green plants of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Plant Cell Rep., 12:537-540.
- NIIZEKI, M. 1977. Haploid, polyploid and aneuploid plants from cultured anthers and calluses in species of *Nicotiana* and forage crops. J. Facul. Agri. Hokkaido Univ. 58: 343-466.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 163: 85-87.
- OPSAHL-FERSTAD, H.G.; BJORNSTAD, A.; ROGNLI, O.A. 1994. Influence of medium and cold pretreatment on androgenic response in *Lolium perenne* L. Plant Cell Rep., 13: 594-600.
- ORTIZ, J. P.; PESSINO, S.C.; BHATB, V.; HAYWARD, M.D.; QUARÍN, C. L. 2001. A Genetic Linkage Map of Diploid *Paspalum notatum*. Crop Sci., 41: 823-830.
- OZIAS-AKINS, P.; FERL, R.; VASIL. I. 1986. Somatic hybridization in the Gramineae: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. (pearl millet) + *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass). Mol. Genet., 203: 365-370.
- PAGANO, E.; RIMIERI, P. 2001. Genética y Mejoramiento de especies forrajeras. En Forrajeras y Pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. José Maddaloni y Liliana Ferrari. INTA. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Facultad de Cs. Agrarias.
- PÉREZ-VICENTE, R.; WEN, X.D.; WANG, Z.Y.; LEDUC, N.; SAUTTER, C.; WEHRLI, E.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 1993. Culture of vegetative and floral meristems in ryegrasses: potential targets for microballistic transformation. J. Plant Physiol., 142:610-617.
- PESSINO, S.; ORTIZ, J.P.; HAYWARD, M.D.; QUARIN, C.L. 1999. The molecular genetics of gametophytic apomixis. Hereditas 130: 1-11.

100 Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras

- PHILLIPS, G.C.; COLLINS, G.B. 1979. Virus symptom-free plants of red clover using meristem culture. *Crop Sci.* 19: 2, 375-381
- PILON-SMITS, E.A.H.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M.J.W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.*, 107:125-130.
- POLCI, P. 2000. Cultivo de Tejidos para la Obtención de variantes somaclonales Pasto Llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur.
- POSSELT, U.; BOLARIC, S. 2000. Genetic diversity among populations of *Lolium perenne* based on RAPD markers. Abstracts of the 2nd Second International Symposium of Molecular Breeding of Forage Crops, Australia. pp. 94
- PUREV, S.; SOMMERS, D.A.; SAMAC, D.A. 2000. Synthesis of biodegradable plastics in alfalfa plants. Abstracts of the 2nd International Symposium of Molecular Breeding of Forage Crops, Australia. pp. 100.
- RINES, H.W. 1983. Oat anther culture: genotype effects on callus initiation and the production of a haploid plant. *Crop Sci.* 23: 268-272.
- RÍOS, R.D.; GÓMEZ, C.; FERRI, A.; CIANCIO, J.; ARDILA, F.; FRANZONE, P. 2001. Transformación genética de alfalfa. REDBIO. Abstracts of the VI Latin-American Meeting on Plant Biotechnology. Brazil. pp.52.
- ROSELLINI, D.; VERONESI, F. 2002. Potential of biotechnology for alfalfa. *AgBiotechNet*, 4: 1-3.
- ROYLANCE, J.T.; HILL, N.S.; PARROT, W.A. 1994. Detection of somaclonal variation in tissue culture regenerants of tall fescue. *Crop Sci.* 34: 1369-1372.
- SAITO, K.; NAKAYAMA, R.; TAKEDA, K.; KUWATA, H. 1973. Studies of the breeding of grass. IV. Differentiation of plants by anther culture in orchardgrass and smooth bromegrass. *Bull. Fac. Agric., Hirotsaki Univ.*, 21: 1-8.
- SCHRAUF, G.; ALESSANDRI, E.; BARRERA ORO, E.; BARTOLONI, N.; CAPURRO, P.; CARDONE, S.; DI CAMILLO, E.; FIGUERAS, I.; GARCÍA, A.M.; GIAVEDONI, J.; MROGINSKI, L.; NARANJO, C.A.; PENSIERO, J.; PICARDO, P.; POGGIO, L.; STANELONI, R.; TOMAS, P.; ZAVALA, M.; SAWATANI, P.; SPANGENBERG, G. 2003. Molecular and conventional breeding programs of forage grasses and legumes of the FAUBA Argentina. Molecular Breeding Forage & Turf. Third International Symposium Dallas Texas USA
- SCHROEDER, H.E.; KHAN, M.R.I.; KNIBB, W.R.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. 1991. Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivators. *Aust. J. Plant Physiol.*, 18: 495-505.
- SLEDGE, M. K.; BOUTONB, J.H.; DALL'AGNOLL, M.; PARROTTB, W.A.; KOCHERTC, G. 2002. Identification and Confirmation of Aluminum Tolerance QTL in Diploid *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. *Crop Sci.*, 42: 1121-1128.
- SNAYDON, R. 1985. Aspects of the ecological genetics of pasture species. In : Structure and functioning of plant populations. Ed. J. Haecck and J. W. Woldendorp. N. Holl. Pub. Amsterdam

- SPANGENBERG, G.; KALLA, R.; LIDGETT, A.; SAWBRIDGE, T.; ONG, E.K.; JOHN, U. 2001. Transgenesis and genomics in molecular breeding of forage plants. In: *Molecular Breeding of Forage Crops* (ed. G. Spangenberg). pp. 219-237.
- SPANGENBERG, G.; WANG, Z.Y.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I. 1994. Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Sci.* 97: 83:94.
- SPANGENBERG, G.; WANG, Z.Y.; POTRYKUS, I. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: *Monographs on Theor. Appl. Genet.* (eds. R. Frankel et al.) Volume 23, Springer Verlag, Heidelberg.
- SPANGENBERG, G.; WANG, Z.Y.; LEGRIS, G.; MONTAVON, P.; TAKAMIZO, T.; PÉREZ-VICENTE, R.; VALLÉS, M.P.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I. 1995. Intergeneric symmetric and asymmetric somatic hybridization in *Festuca* and *Lolium*. *Euphytica.* 85: 235-245.
- TABE, L.M.; HIGGINS, C.M.; MC NABB, W.C.; HIGGINS, T.J.V. 1993. Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. *Genetica,* 90: 181-200.
- TAKAMIZO, T.; SPANGENBERG, G.; SUGINOBU, K.; POTRYKUS, I. 1991. Intergeneric somatic hybridization in Gramineae: somatic hybrid plants between tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) *Mol. Gen. Genet.,* 231: 1-6.
- TAKAMIZO, T.; SUGINOBU, K.I.; OHSUGI, R. 1990. Plant regeneration from suspension culture derived protoplasts of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) of a single genotype. *Plant Sci.,* 72: 125-131.
- TALIAFERRO, C.M. DABO, S. M. MITCHELL, E.D.; JOHNSON, B.B.; METZINGER, B.D. 1989. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in tissue culture regenerated plants of apomictic old-world bluestem grasses (*Bothriochloa* sp). *Plant Cell Tissue Org. Culture,* 19: 257-266.
- TANNER, G.J.; MOATE, P.M.; DAILEY, L.; LABY, R.; LARKIN, P.J. 1995. Proanthocyanidins (condensed tannins) destabilise plant protein foams in a dose dependent manner. *Aust.J. Agric. Res.,* 46: 1101-1109.
- TAYLOR, C.; MADSEN, K.; BORG, S.; MOLLER, M.; BOELT, B.; HOLM, P. 2001. The development of sequence-tagged sites (STSs) in *Lolium perenne* L. : the application of primer sets derived from other genera. *Theor. Applied Genetics,* 103 : 648-658.
- TERAKAWA, T.; SATO, T.; KOIKE, M. 1992. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.). *Plant Cell Rep.,* 11: 457-461.
- TESFAYE, M.; TEMPLE, S.J.; ALLAN, D.L.; VANCE, C.P.; SAMAC, D.A. 2001. Overexpression of Malate Dehydrogenase in Transgenic Alfalfa Enhances Organic Acid Synthesis and Confers Tolerance to Aluminum 1. *Plant Physiol.,* 127: 1836-1844.
- VALLÉS, M.P.; WANG, Z.Y.; MONTAVON, P.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 1993.

102 Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras

- Analysis of genetic stability of plants regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). *Plant Cell Rep.*, 12: 101-106.
- VASIL, V.; FERL, R.; VASIL, I. 1988. Somatic hybridization in the Gramineae: *Triticum monococcum* L. (Eikorn) + *Pennisetum americanum* (L) K. Schum. (pearl millet). *J. Plant Physiol.*, 132: 160-163.
- VEILLEUX, R.E.; JOHNSON, A.T. 1998. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breed. Rev.* 16: 229-268.
- VOISEY, C.R.; DUDAS, B.; BIGGS, R.; BURGESS, E.P.J.; WIGLEY, P.J.; MCGREGOR, P.G.; LOUGH, T.J.; BECK, D.L.; FORSTER, R.L.S.; WHITE, D.W.R 2001. Transgenic pest and disease resistant white clover plants In: *Molecular breeding of forage crops.* (ed. G. Spangenberg). Kluwer Academic Publishers. pp.239-250.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DER LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 : 4470-4414.
- WAN, C.H.; VASIL, I.K. 1996. Regeneration of plants from embryogenesis callus, cell suspension cultures of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *J.Plant. Physiol.*, 148: 718-726.
- WANG, L.; WANG, X.; HUANG, B. 1996. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from single cell suspension cultures of *Elymus giganteus* Vahl. *Plant Cell Rep.*, 15: 865-868.
- WANG, W.; CUI, S.; ZHANG, C. 2001b. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 67: 11-27.
- WANG, Z.Y.; HOPKINS, A.; MIAN, R. 2001a. Forage and turf grass biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sci.*, 20: 573-619.
- WANG, Z.Y.; LEGRIS, G.; VALLES, M.P.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 1995. Plant regeneration from suspension and protoplasts cultures in the temperate grasses *Festuca* and *Lolium*. In: *Curr. Issues Plant Mol. and Cell. Biol.* (eds. M. Terzi, R. Cella, y A. Falavigna), Kluwer Academic Pub., Dordrecht. pp. 81-86.
- WANG, Z.Y.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 1993b. Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Sci.*, 94: 179-193.
- WANG, Z.Y.; VALLÉS, M.P.; MONTAVON, P.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 1993a. Fertile plant regeneration from protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). *Plant Cell Rep.*, 12: 95-100.
- WANG, Z.Y.; YE, X.D.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 2001c. Expression of a sulphur-rich sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) plants. *Plant Cell Reports*, 20: 213-219.
- WILLIAMS J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGAY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- XU, S. 1979. Success of induction of pllen plants in alfalfa. *Plant Mag.*, 6:5.

- XU, Z.H.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. 1982. Organogenesis from root protoplasts of the forage legumes *Medicago sativa* and *Trigonella foenum-graecum*. *Zeitschrift-fur-Pflanzenphysiologie*, 107: 231-235.
- YAMADA, T.; SAKAI, A.; MATSUMURA, T.; HIGUCHI, S. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Sci.*, 73: 111-116.
- YE, X.D.; WU, X.L.; ZHAO, H.; FREHNER, M.; NOSBERGER, J.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 2001. Altered fructan accumulation in transgenic *Lolium multiflorum* plants expressing a bacterial levansucrase gene. *Plant Cell Rep.*, 20:205-212.
- ZAGORSKA, N.; STEREVA, R.; ROBEVA, P. 1990. Alfalfa (*Medicago sativa*): In vitro production of haploids. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.12. Haploids in Crop Improvement. I. Springer, Berlin. 458-471.
- ZÚÑIGA-REBOLLEDO, J.; SEGUEL-BENÍTEZ, I.; ORTEGA-KLOSE, F.; CAMPOS DE QUIRÓZ, H. 2000. Genetic diversity of Andean *Bromus* spp. Genetic resources as detected by AFLPs. Abstracts of the 2nd International Symposium of Molecular Breeding of Forage Crops, Australia. pp. 92.

Original recibido el 29 de abril de 2004