

Aportes de la biotecnología al mejoramiento del pasto llorón (*Eragrostis curvula*)

Biotechnological and genomic tools for the improvement of weeping lovegrass (Eragrostis curvula)

Echenique¹, V., Pessino², S., Díaz³, M., Selva¹, J.P., Luciani¹, G., Zappacosta³, D., Cervigni¹, G., Meier¹, M., Garbus¹, I., Cardone⁴, S., Miranda³, R. y Spangenberg⁵, G.

CERZOS (CONICET) CCT Bahía Blanca. Departamento de Agronomía (UNS). CONICET y Facultad de Ciencias Agrarias, Rosario. Universidad Nacional del Sur; Bahía Blanca. FAUBA Buenos Aires. Department of Primary Industries, Victorian AgriBiosciences Centre, Victoria, Australia.

-
1. Introducción
 2. Cultivo de tejidos y variación somaclonal
 3. Taxonomía e identificación de pureza varietal utilizando marcadores moleculares
 4. Búsqueda de genes a gran escala
 5. Análisis de la estructura genética
 6. Modo reproductivo
 7. Identificación de genes relacionados al modo reproductivo
 8. Mejoramiento de la calidad del forraje
 9. Transformación genética
 10. Conclusiones y perspectivas
 11. Bibliografía

Resumen

El pasto llorón (*Eragrostis curvula*) es una gramínea de regiones tropicales y subtropicales que en Argentina cubre una superficie de cerca de 800.000 has. Sin embargo, la región potencialmente cultivable es mayor, ya que tiene la capacidad de colonizar áreas marginales de producción debido a sus bajos requerimientos de riego y fertilización, su rápido crecimiento y su gran producción de biomasa en suelos pobres y ambientes semidesérticos. Desde hace varios años nuestro grupo de trabajo se encuentra enfocado en el mejoramiento del pasto llorón a través de la aplicación de herramientas de biotecnología. Entre ellas se incluye la generación mediante cultivo *in vitro* de una serie euploide (diploide sexual, tetraploide con alto grado de sexualidad y tetraploide apomíctico) muy útil para el estudio de los cambios genéticos y epigenéticos relacionados con variaciones en los niveles de ploidía y la forma de reproducción,

*Conferencia presentada, en el Simposio sobre Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras Megatérmicas y Herramientas Biotecnológicas, realizado durante el transcurso del 31° Congreso Argentino de Producción Animal, 15 al 17 de octubre de 2008, Potrero de los Funes, San Luis.

1. CERZOS (CONICET) CCT Bahía Blanca. Departamento de Agronomía (UNS), San Andrés 800 (8000) Bahía Blanca, Argentina. echeniq@criba.edu.ar
2. CONICET y Facultad de Ciencias Agrarias, Rosario.
3. Universidad Nacional del Sur; Bahía Blanca.
4. FAUBA Buenos Aires.
5. Department of Primary Industries, Victorian AgriBiosciences Centre, Victoria, Australia.

la tinción de la deposición de calosa con el fin de diferenciar plantas sexuales y apomíticas eficientemente en los tests de progenie, la generación de bibliotecas de ADNc (ADN copia) para estudios de mapeo genómico y análisis del transcriptoma; y el uso de marcadores moleculares para la identificación de cultivares y de aquellos genes relacionados con la ploidía y la apomixis. De nuestras bibliotecas de ADNc, se ensamblaron 12.300 etiquetas de secuencia expresada (ESTs, expressed sequence tags), se identificaron 8.864 unigenes y se asignaron roles funcionales al 80% de los mismos. Los estudios de polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs, random amplified polymorphic DNA) y polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs, amplified fragment length polymorphism analysis) de la serie mostraron que el 32% de los polimorfismos detectados estaban relacionados con cambios en los niveles de ploidía y/o modo reproductivo. El análisis de agrupamiento mostró que ambos tetraploides estaban más estrechamente relacionados entre sí que con el diploide. Además, las comparaciones entre los grupos de diferente ploidía y modo reproductivo en los estudios de expresión diferencial indicaron que un bajo porcentaje de los genes se encuentran regulados negativamente en los diploides sexuales y los tetraploides apomíticos y sobreexpresados en los tetraploides sexuales, sugiriendo que la diplosporía puede ser una falla en la expresión de la sexualidad en los poliploides. Entre las secuencias encontradas se incluyen genes involucrados en el ciclo celular, la síntesis y degradación de proteínas, la síntesis de ARN y ADN, elementos repetitivos, proteínas ribosomales, factores de transcripción, factores de elongación y proteínas que se expresan en situaciones de estrés. Además, se identificaron secuencias relacionadas con la biosíntesis de lignina como el gen de la enzima cafeoil CoA o-metiltransferasa (*CCoAMT*) y dos factores de transcripción de la familia *R2R3MYB*. Estas secuencias son candidatas interesantes para mejorar la calidad forrajera del pasto llorón por transgénesis. Nuestro laboratorio está desarrollando protocolos de regeneración, selección y transformación para poder evaluar el rol de estos genes relacionados con la apomixis y la síntesis de lignina en plantas transgénicas de pasto llorón. Por otro lado, los recursos generados serán utilizados para la implementación de tecnologías moleculares usando marcadores moleculares, ya que a partir de las bibliotecas se han identificado 254 polimorfismos en las secuencias simples repetitivas (SSRs, simple sequence repeats) y 190 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs/INDELS, single nucleotide polymorphism/short insertion-deletion). Estos se usarán en poblaciones de mapeo a nivel tetraploide, obtenidas de la serie generada y que segreguen por modo reproductivo o calidad de forraje. Se registraron además tres materiales obtenidos por variación somaclonal.

Palabras clave: pasto llorón, *Eragrostis curvula*, mejoramiento molecular, genómica, biotecnología.

Summary

Weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*) is a perennial grass spread over tropical and subtropical regions worldwide. In Argentina, this forage crop covers 800,000 has; however it has potential to colonize marginal production areas due to its low input costs including fertilization and irrigation, fast growth and high biomass production in poor soils and semidesertic environments. Our research group is being focused on molecular breeding of weeping lovegrass by using different genomic and biotechnological tools, including the generation of an euploid series (2x sexual, 4x sexual, 4x apomictic) for studying genetic and epigenetic changes related to ploidy levels and reproductive mode, the generation of calose deposition studies for differentiating between apomictic and sexual types efficiently in progeny tests, the generation of cDNA libraries for genome mapping and transcriptome analysis, the use of molecular markers for cultivar differentiation and for the identification of genes related to ploidy and the reproductive mode.

Revista Argentina de Producción Animal 28 (2): 147-164 (2008)

From our cDNA libraries, 12,300 ESTs were clustered and assembled, 8,864 unigenes were identified and 80% were functionally assigned. Based on RAPD and AFLP studies from the euploid series, 32% of the polymorphisms detected (i.e. 1008 markers) were related to ploidy or reproductive mode. Cluster analyses indicated that both tetraploids were more closely related between than with the diploid line. Sequences from the cDNA libraries were pair-wise subtracted *in silico* to identify differentially expressed genes. A total of 207 differentially expressed genes were identified, related to ploidy and/or reproductive mode. Sequences identified included genes involved in cell cycle regulation, protein turnover, DNA and RNA synthesis, repetitive elements, protein kinases, ribosomal proteins, transcription factors, elongation factors, proteins responsive to stress, cell cycle proteins and proteins with domains to bind or alter DNA. We identified a group of genes that were mostly downregulated in the sexual diploid and apomictic tetraploids but upregulated in the sexual tetraploids, suggesting that a transcriptome repatterning process is needed to maintain sexuality in polyploids and apomixis is probably the consequence of a failure in this repatterning process. Besides, we identified several sequences from genes coding for enzymes such as *CCoAOMT* and transcription factors of the family *R2R3MYB*, involved in lignin biosynthesis. These sequences are suitable candidates to improve weeping lovegrass nutritional quality. Therefore, we are developing regeneration, selection and transformation protocols to evaluate the roles of these candidate genes related to apomixis and lignin biosynthesis in transgenic plants. Implementation of molecular technologies will be also performed using molecular marker technology strategies: 254 SSRs and 190 SNPs/INDELS have already been identified from our cDNA libraries. These markers will be used in mapping populations segregating for apomixis or agronomic traits. Three materials obtained by somaclonal variation were registered.

Key words: weeping lovegrass, *Eragrostis curvula*, molecular breeding, genomics, biotechnology.

1. Introducción

El género *Eragrostis* (familia Poaceae) comprende más de 350 especies distribuidas en diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo. *E. curvula*, comúnmente llamada "pasto llorón", es una gramínea perenne utilizada como forrajera en las áreas subhúmedas y semiáridas de nuestro país (11). Sus principales cualidades son su extraordinaria rusticidad, su capacidad para prosperar en suelos pobres en fertilidad y su aptitud para consolidar los suelos erosionables, de textura suelta. Se ha demostrado que incorpora una considerable cantidad de materia orgánica y que mejora la estructura del suelo. En poco más de un cuarto de siglo, el pasto llorón ha pasado de ser un cultivo restringido a pequeñas parcelas experimentales a formar extensos pastizales que cubren en la actualidad alrededor de 800.000 has (INDEC, 2001), principalmente en la región semiárida pam-

peana. En consecuencia, es hoy la gramínea perenne más extensamente cultivada en Argentina, con la perspectiva de que en el futuro la superficie sembrada se extienda considerablemente, ya que pueden calcularse en más de 5.000.000 has la extensión de nuestro país apta para el cultivo de esta planta, en muchos casos en forma excluyente (13).

El pasto llorón es esencialmente estival y crece vigorosamente en forma cespitosa, aún con escasa humedad debido a su eficiente uso del agua. Su capacidad para rebrotar temprano en primavera y producir forraje verde en otoño hasta más tarde que otras especies ha impulsado su incorporación en los sistemas de producción ganadera. Soporta muy bien el pastoreo, habiendo demostrado su valor no sólo para vacas de cría sino también para recria e invernada. Presenta un aceptable valor nutritivo durante el rebrote y una receptividad alta, comparada con las pasturas naturales de la región semiárida

pampeana. Su gran agresividad le permite competir y controlar importantes malezas. Entre sus principales limitaciones se encuentran su baja aptitud como fuente de forraje invernal y su mediana calidad forrajera.

El origen de los cultivares de pasto llorón es difícil de determinar, ya que casi todos provienen de selecciones practicadas sobre materiales nativos de diversos países sudafricanos, como Tanzania y Sudáfrica (zonas de Transvaal y de Middelburg). Fue introducido en nuestro país aproximadamente en 1930 en una estancia de la provincia de San Luis. De ahí, en 1947, semillas del cultivar *Tanganyika* (primer cultivar adaptado) fueron remitidas a la Estación Experimental INTA Anguil, donde fueron multiplicadas constituyendo la base de la intensificación del cultivo en nuestro país. En nuestro país, el INTA ha realizado numerosos estudios técnicos y comparativos de variedades, principalmente en las EEA Anguil y San Luis, donde se reunieron las colecciones de más de 70 biotipos introducidos de pasto llorón, a partir de los cuales se seleccionaron los cultivares argentinos de pasto llorón. La especie incluye citotipos de diferente ploidía, (desde $2x$ hasta $8x$, con $x=10$). Los diploides ($2n=2x=20$) son raros en la naturaleza, siendo la mayoría poliploides ($2n=4x=40$ a $2n=8x=80$) con formas aneuploides (33). Los escasos diploides naturales se reproducen sexualmente y son autoincompatibles (requieren polinización cruzada), mientras que los poliploides se reproducen por apomixis y son autocompatibles. Aunque la mayoría de las colecciones realizadas en Sudáfrica son apomíticas obligadas, unas pocas fueron descritas como apomíticas facultativas (4, 44).

El pronóstico de cambios climáticos para el hemisferio sur indica que en los próximos años ocurrirá un incremento de la temperatura y una reducción de la humedad del suelo. Por ello se prevé un desplazamiento en la utilización de pasturas C_3 a pasturas C_4 , las cuales, además de soportar temperaturas más elevadas, son más tolerantes a la sequía. Entre estos pastos candidatos a ser intensamente utilizados en un futuro próximo se encuentra el pasto llorón. Sin embargo, una limitación de

este tipo de plantas es la baja calidad del forraje (23) y también el modo reproductivo asexual, que limita las posibilidades de mejoramiento, porque reduce las posibilidades de cruzamiento. Sin embargo, la apomixis representa una gran ventaja, ya que cualquier combinación favorable será fijada indefinidamente desde la primera generación de cruzamiento. Tradicionalmente el mejoramiento del pasto llorón se limitó a la selección de ecotipos en sus lugares de origen o sobre colecciones y procedencias sudafricanas en otros países. En la actualidad, el uso de la biotecnología ofrece otras alternativas para el mejoramiento de esta especie, que son el motivo central de esta revisión.

2. Cultivo de tejidos y variación somaclonal

El comportamiento celular normal es el resultado de una compleja cascada de expresión de genes que son sensibles a la disrupción por estreses bióticos y abióticos. El cultivo *in vitro per se* puede ser muy estresante para las células vegetales e involucra procesos mutagénicos durante el establecimiento del explanto, la inducción de callo, la formación de embriones y la regeneración de plantas. Por esta vía es posible obtener variación, de origen nuclear y/o citoplasmática, que podría ser utilizada para el mejoramiento vegetal. Este proceso, denominado variación somaclonal por Larkin y Scowcroft (24), involucra cambios en las secuencias del ADN de las plantas regeneradas que son transmitidos a la progenie. Asimismo cabe citar la ocurrencia *in vitro* de modificaciones heredables que no involucran cambios en la secuencia de ADN. Estas modificaciones conducen a cambios en la expresión génica que pueden ser más o menos estables. Dichos cambios, denominados "epigenéticos", son también considerados por algunos autores como variación somaclonal, mientras que otros sólo incluyen bajo tal denominación a los cambios genéticos (5). Los cambios epigenéticos más estudiados son la modificación de los extre-

mos N terminales de las histonas, la metilación de citosinas y la reestructuración consecuente de las estructuras heterocromáticas.

En el laboratorio de Genética del Departamento de Agronomía de la UNS se llevó a cabo un proyecto para obtener somaclones de pasto llorón. Se trabajó con diferentes cultivares de esta gramínea apomíctica, a saber, *Ermelo*, *Tanganyika*, *Morpa*, *Don Pablo*, *Don Eduardo* y *Kromdraai*. Se estableció un protocolo de cultivo *in vitro* (19, 20) y se analizó la variación obtenida a diferentes niveles: morfológico, citológico, bioquímico y molecular (20, 22). Luego de la evaluación de gran número de plantas se seleccionaron tres materiales, en función de las características de interés (32) a partir del cultivar apomíctico tetraploide *Tanganyika*: 1) una planta diploide sexual, registrada como *Victoria* (RC9192, 2006-2026), 2) una línea tetraploide con un alto grado de reproducción sexual, obtenida a partir de duplicación por colchicina de semillas del diploide, denominada *Bahiense* (RC9193, 2006-2026). La obtención de esta serie euploide de plantas con diferentes modos reproductivos y ploidías en un fondo genético común fue descrita por Cardone et al. (6). Este conjunto de plantas fue útil para realizar estudios posteriores relacionados con (a) la obtención de poblaciones de mapeo a nivel tetraploide, que segreguen para el modo reproductivo, (b) la identificación de alteraciones genéticas, epigenéticas y de expresión que ocurren inmediatamente luego de un cambio en el nivel de ploidía, (c) la identificación de genes asociados a la expresión de la apomixis por análisis del transcriptoma y (d) el desarrollo de estrategias exitosas de mejoramiento en la especie.

El tercer material proviene de una planta poliploide, registrado como cultivar *Don Luis* (RC9191, 2006-2026) en honor al Ing. Luis Mroginski. *Don Luis* se distingue de los otros materiales por su número cromosómico ($2n=64$). Se trata de un cv. de tipo robusta azul. Se diferencia de los cvs. *Ermelo*, *Morpa* y *Don Juan* por el ancho de sus hojas y el color azul de las mismas, y del cv. *Don Eduardo* por el color de sus hojas, el número de cromosomas y su resistencia a bajas temperaturas. En

estado reproductivo se diferencia por el mayor tamaño de las panojas en relación a los mencionados cultivares. Es un cultivar de reproducción apomíctica.

3. Taxonomía y determinación de pureza varietal utilizando marcadores moleculares

El pasto llorón constituye un grupo botánico muy polimórfico con genotipos de distinta ploidía. Como se mencionó anteriormente, muy pocos de estos genotipos son diploides ($2n=2x=20$) y la mayoría de los poliploides son tetraploides ($2n=2x=40$) (43). Los genotipos diploides se reproducen sexualmente y son autoincompatibles, necesitan polinización cruzada (43). Los poliploides se reproducen en forma apomíctica, sin embargo la hibridación también ocurre naturalmente dado que existen genotipos con una baja frecuencia de reproducción sexual (apomícticos facultativos) (43). Si bien existen diferencias morfológicas marcadas entre las variedades de esta gramínea, la existencia de formas o ecotipos con características intermedias entre ellas dificulta la clasificación. A lo anterior se suma la reproducción por apomixis, que fija cualquier nueva variación que surja. Esto ha llevado a una considerable confusión en la distinción de los ecotipos y cultivares que se hallan actualmente a disposición de los mejoradores y productores.

Leigh (25) reconoce dentro de *E. curvula* seis tipos agronómicos en función de características morfológicas y comportamiento en cultivo: robusta azul, robusta verde, robusta intermedio, *curvula*, *chloromelas* alto y *chloromelas* bajo. Si bien las formas netamente características de estos "tipos" son fácilmente identificables, en muchos casos la presencia de plantas con características intermedias hace dificultosa esta clasificación, por lo que algunos autores hacen caso omiso de ella. En varias publicaciones aparecidas en EEUU, se ha clasificado como *E. chloromelas* al pasto Boer, que ahora se identifica como una variedad botánica de *E. curvula*, variedad conferta. Covas (12) propone una clasificación basada en características de las semillas, láminas

foliares y panojas referida a materiales que se cultivan en Argentina.

La caracterización del germoplasma de pasto llorón por medio de marcadores moleculares podría contribuir a clarificar la clasificación de cultivares. Por otra parte, es indispensable a efectos de la conservación de este pasto, ya que *Eragrostis curvula* fue considerada una gramínea prioritaria para su conservación por el Programa de Colección del IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) para regiones áridas y semiáridas (IBPGR, 1985). Los marcadores moleculares derivan de regiones de ADN que muestran diferencias o polimorfismos en su secuencia de nucleótidos, incluso entre individuos dentro de una especie. Es posible identificar marcadores presentes en todos los individuos de un determinado taxón. Las variantes polimórficas pueden originarse por cambios en una sola base, inserciones, deleciones, re-arreglos o acumulación de secuencias repetitivas. Estos polimorfismos son ubicuos y abundantes en todos los organismos (10). Los polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs, random amplified polymorphic DNA) fueron los primeros marcadores moleculares utilizados en forrajes (46). Otros marcadores muy usados actualmente son los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs, amplified fragment length polymorphism analysis) y los polimorfismos en las secuencias simples repetitivas (SSRs, simple sequence repeats) (40, 45). En el género *Eragrostis*, se han empleado AFLP, RAPDs, Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSR, inter simple sequence repeats) y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphism) para la caracterización de cultivares y accesiones de un importante cereal de Etiopía, *E. tef* (2). En *E. curvula*, se han utilizado marcadores bioquímicos (isoenzimas), para la caracterización de cultivares y evaluación del sistema reproductivo (35).

Nuestro grupo de trabajo se encuentra abocado a la evaluación de la homogeneidad intracultivar, al establecimiento de las relacio-

nes genéticas entre cultivares y a la caracterización de los nuevos genotipos obtenidos en nuestro laboratorio mediante la aplicación de diferentes marcadores de ADN (48). Se evaluaron 9 cultivares comerciales de pasto llorón. Las semillas de 8 de ellos fueron provistas por la EEA INTA Anguil y las semillas del cv. *Kromdraai* (K) se obtuvieron de colecciones existentes en el Departamento de Agronomía de la UNS. Los 8 cultivares citados en primer término son los siguientes, mencionando entre paréntesis el tipo agronómico según Covas (12): (cv. *Tanganyika* (T, curvula), cv. *Morpa* (M, curvula), cv. *Ermelo* (E, curvula), cv. *Don Arturo* (DA, curvula), cv. *Don Walter* (DW, conferta), cv. *Don Pablo* (DP, robusta azul), cv. *Don Eduardo* (DE, robusta verde), cv. *Don Juan* (DJ, chloromelas/robusta o pilosa) DJ). Y se incluyeron tres materiales obtenidos en nuestro laboratorio: *Victoria* (V), *Bahiense* (B) y UNST1112 (U).

Como control de la uniformidad dentro de cada genotipo se evaluaron plantas provenientes de una misma panoja de los cultivares apomícticos M (30 plantas) y T (25 plantas) y del cultivar sexual V (20 plantas). Se utilizaron marcadores de RAPDs, SSR y AFLPs. Los SSRs fueron desarrollados por nuestro grupo a partir de genotecas de ADNc (8). En los controles, como era de esperarse, se observó uniformidad en las progenies de las plantas apomícticas y variabilidad en las progenies de las sexuales. Al evaluar la uniformidad dentro de cada genotipo, los cultivares apomícticos M y DE mostraron variabilidad en sus patrones moleculares por lo que no fueron considerados en el análisis posterior. Esta variabilidad podría estar causada por contaminación o mezcla de la semilla. Los cultivares DW, DJ, E, T, DA, DP y K mostraron uniformidad entre sus individuos. Se hallaron polimorfismos para los tres tipos de marcadores: RAPDs (56 marcadores), AFLP (101 marcadores) y SSR (26 marcadores). Con los datos de estos marcadores se elaboraron los índices de similitud de Jaccard y se graficaron las relaciones de similitud para cada marcador por separado. En la Figura 1 se observa un gel de SSR y las

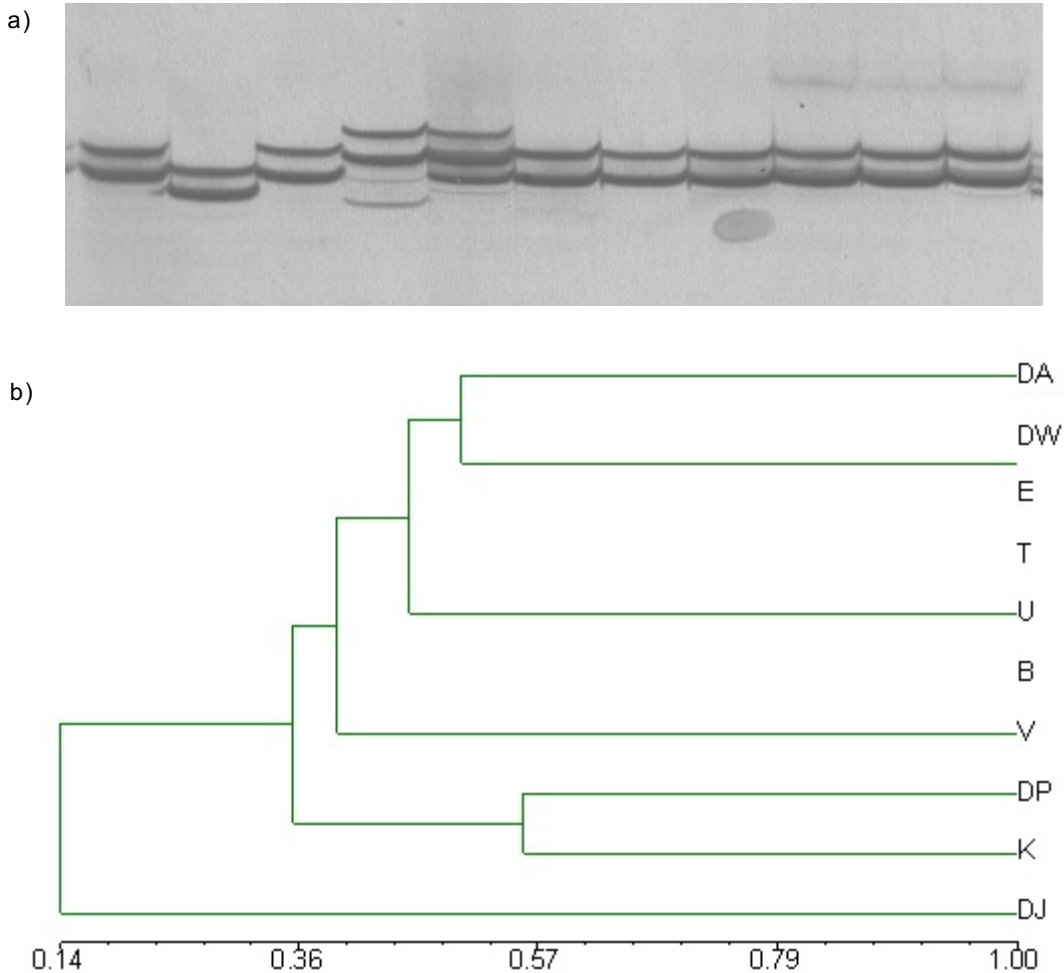


Figura 1: a) Patrón de microsatélites en gel de acrilamida de distintos genotipos de pasto llorón. De izquierda a derecha se muestran los patrones de amplificación con el cebador E29 que corresponden a los siguientes cultivares: *Don Walter* (DW), *Don Juan* (DJ), *Don Pablo* (DP), *Don Eduardo* (DE), *Kromdraai* (K), *Don Arturo* (DA), *Morpa* (M), *Ermelo* (E), *Tanganyika* (T) y los materiales UNST1112 (U) y UNST1131 (B, cv. *Bahiense*). b) Agrupamiento obtenido con marcadores microsatélites de los genotipos anteriores incluyendo al cultivar diploide V: *Victoria*.

relaciones de similitud obtenidas con marcadores AFLPs (48). En todos los casos fue posible diferenciar los distintos tipos agronómicos, aunque se presentaron problemas con algunos marcadores para discriminar dentro del tipo agronómico curvula. Los microsatélites fueron los que presentaron menor poder discriminatorio, mientras que los AFLP fueron los

únicos capaces de discriminar entre todos los cultivares comerciales, incluyendo DA de E. Los agrupamientos obtenidos con SSR y AFLP son los más similares entre sí y con el agrupamiento previo obtenido por isoenzimas (33). Ellos muestran a DW vinculado al grupo de los curvula y a K vinculado a DP, lo que confirma el resultado obtenido con isoenzimas.

Con respecto a los nuevos materiales generados en el laboratorio, los tetraploides (B y U) se agruparon dentro de los curvula y vinculados a T, que es el cultivar a partir del cual se originaron. Con AFLP y RAPDs se logró diferenciarlos de T y sólo con RAPDs se logró diferenciarlos entre sí. El caso de V es peculiar, ya que al ser diploide presenta amplias diferencias morfológicas con los otros cultivares del grupo curvula.

Como conclusión podemos decir que 1) el agrupamiento de materiales con SSR y AFLPs concuerda con los estudios previos realizados con isoenzimas (33) y caracteres morfológicos (12), 2) los AFLP son los marcadores que poseen un mayor poder de discriminación entre cultivares de pasto llorón (48), 3) estas técnicas permiten determinar el grado de uniformidad de los cultivares y detectar la presencia de contaminación con semillas de otras fuentes, 4) se surge incluir a Victoria, diploide sexual, dentro de un nuevo tipo agronómico, ya que posee caracteres de tipo robusta y perfiles moleculares tipo curvula. El especial vigor encontrado en este diploide es típico de otros diploides obtenidos artificialmente (39).

4. Búsqueda de genes a gran escala

Dada la complejidad de los genomas eucariotas, los proyectos de secuenciación de genomas completos de vegetales se han limitado hasta ahora a especies modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. La primera es una dicotiledónea de fácil cultivo, ciclo corto y tamaño reducido, que posee uno de los genomas vegetales más pequeños que se conozcan (<http://www.arabidopsis.org>). Por otra parte el arroz (*Oryza sativa*) representa el genoma más pequeño dentro de las gramíneas (<http://rice.plantbiology.msu.edu>), familia a la cual pertenecen la mayoría de los cereales de mayor importancia en agricultura.

El mapeo genético comparativo ha demostrado que la organización de los genes dentro de los cromosomas ha permanecido

muy conservada a través de la evolución, existiendo estrechas relaciones de colinealidad entre los genomas de casi todas las gramíneas cultivadas. En el caso de especies poco estudiadas como *E. curvula*, se partió de un examen del transcriptoma. El transcriptoma es el conjunto de ARN mensajeros presentes en el citoplasma de la célula. Estos ARN mensajeros se originan en los genes activos en el genoma de la planta o en respuesta a situaciones particulares. Para estudiar el transcriptoma se aíslan los ARN mensajeros, se hacen copias de ellos para obtener poblaciones de ADNc (ADN copia) y luego estas copias se secuencian de forma masiva para generar miles de etiquetas de secuencias expresadas (ESTs) (18). En el año 2003 nuestro grupo de trabajo generó una colección de ESTs (se secuencian un número de nucleótidos de entre 300 – 500 de cada ADNc) de 4 genotecas (bibliotecas de genes expresados) de ADNc de pasto llorón, tres de ellas de panojas jóvenes de la serie isogénica mencionada en el apartado 2 (tetraploide apomítico, diploide sexual y tetraploide con alto grado de sexualidad). La cuarta se generó a partir de hojas de plántulas de tanganyica de 12 días. El objetivo era identificar y caracterizar genes relacionados al modo reproductivo y a calidad del forraje. Se secuenciaron un total de 12.295 ESTs, que después de agrupadas y ensambladas permitieron identificar 8.884 unigenes. De estos, un total de 7.029 (79,11%) fueron categorizados en función de similitud de secuencia contra bases públicas de genes. Se obtuvieron además un total de 254 EST-SSRs y 190 SNPs e INDELS. Las ESTs y los marcadores moleculares obtenidos en este estudio son un recurso muy valioso para identificación de genes, mapeo genético, identificación de cultivares, análisis de diversidad genética, genotipado molecular y selección asistida por marcadores moleculares (8). Para una revisión básica de los conceptos de genómica, transcriptómica y bioinformática puede consultarse Echenique et al. (18), Pessino y Martelotto (31) y Paniego et al. (30).

5. Análisis de la estructura genética

A fin de analizar la estructura genómica de nuestra serie euploide (apartado 2) y así contribuir al estudio del genoma del pasto llorón, se utilizaron marcadores moleculares del tipo RAPD y AFLPs (27). El objetivo era analizar los cambios genéticos que ocurren ante modificaciones en los niveles de ploidía (4x - 2x - 4x). Este estudio permitió detectar niveles considerables de polimorfismo entre las líneas, y observar que, curiosamente, los polimorfismos revertían al restaurar la ploidía original (31,45% de 1008 marcadores de RAPD y AFLP fueron del tipo 1/0/1 y 0/1/0) (Figura 2a).

Esta observación de que un número considerable de marcadores moleculares muestra un patrón de reversión cuando se restaura el nivel de ploidía original, sugiere que las alteraciones genómicas son específicas y confieren a la planta una estructura genética característica de un nivel de ploidía. El estudio confirmó que las bandas que revertían correspondían a fragmentos génicos e intergénicos de idéntica secuencia. En efecto, el análisis de agrupamientos demostró que los dos tetraploides están muy relacionados y difieren del diploide (Figura 2b). Las secuencias involucradas representaban principalmente regiones no codificantes, aunque algunas de ellas muestra-

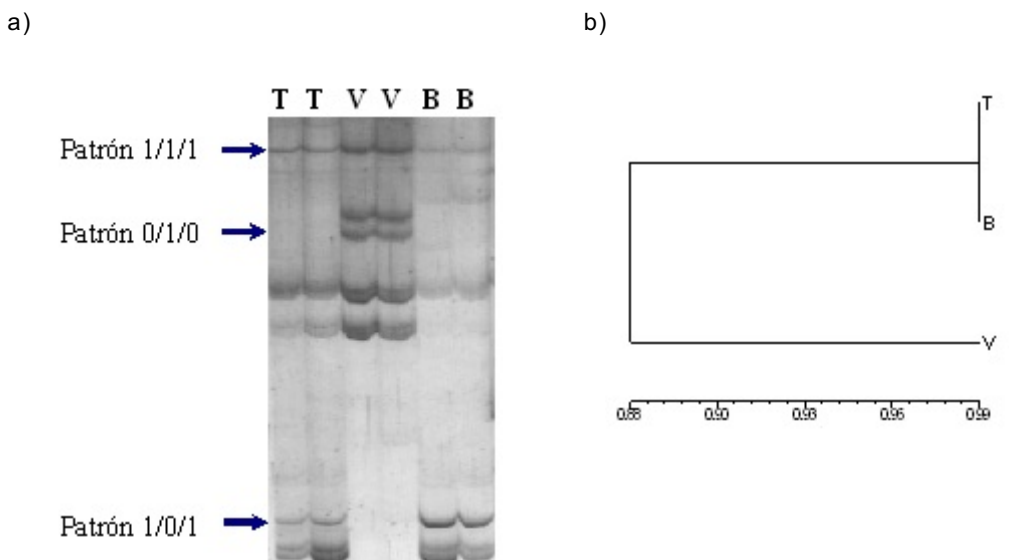


Figura 2: a) Porción de gel de poliacrilamida en el que se compara mediante RAPDs las líneas Tanganyika (T, 4x), Victoria (V, 2x) y Bahiense (B, 4x). Las amplificaciones se realizaron por duplicado. Con flechas se indican tres de los siete patrones posibles observados. El patrón 1/1/1 corresponde a marcadores presentes en los tres genotipos, el patrón 0/1/0 a marcadores presentes sólo en la línea dihaploide V, mientras que el patrón 1/0/1 corresponde a marcadores presentes en ambas líneas tetraploides, la natural T y la colchipoide B. b) Dendrograma mostrando la distancia genética entre los genotipos de *Eragrostis curvula*. T y B (tetraploides) V (diploide).

ron similitud con genes conocidos. También se hicieron estudios de metilación de citosinas utilizando la técnica de MSAP (amplificación de polimorfismos sensibles a metilación) y se

observó un patrón revertiente, aunque en este caso las reversiones eran menos reproducibles y abarcaban un porcentaje menor de los polimorfismos totales.

La reversión de los polimorfismos en pasto llorón implica la existencia de una cierta "memoria celular" que permita reinstalar en el genoma secuencias de ADN antes desaparecidas. Dicho mecanismo de memoria es aún desconocido, y aunque se ha postulado un mecanismo que involucra copias móviles de ARN (ARN cache), el mismo no ha sido comprobado aún (26). Otros casos similares al observado en *E. curvula* fueron informados por 1) Song et al (37) en aloploidos de *Brassica nigra*, donde desaparecen bandas parentales en la F_1 y luego reaparecen en generaciones posteriores (de F_2 a F_5), 2) Cullis (15) en genotipos de lino, donde el estímulo del calor induce cambios genéticos que revierten al desaparecer las condiciones de stress y 3) Lolle et al. (26) en plantas de *A. thaliana* donde se demostró que mutantes homocigotas para el gen *hothead* revierten espontáneamente a una tasa muy superior a lo esperable.

6. Modo reproductivo

En el pasto llorón la célula madre de la megáspora puede tomar dos destinos, sufrir meiosis y seguir un proceso sexual típico, tipo *Polygonum*, lo que sucede en los genotipos diploides sexuales y poliploides apomícticos facultativos, o iniciar un proceso apomíctico de tipo diplospórico, que presenta como característica particular la ausencia de estadíos meióticos. En este proceso, la célula madre de la megáspora, luego de dos mitosis, forma un saco embrionario tetranucleado con una célula huevo, dos sinérgidas y un núcleo polar (14). Al principio el saco embrionario de pasto llorón fue clasificado como de tipo *Antennaria* (38) pero se demostró que carece de antípodas, lo que dio lugar a una nueva denominación, tipo *Eragrostis* (14). Para

formar el endosperma se requiere de la fecundación del núcleo polar, proceso denominado pseudogamia. Los diploides son sexuales y presentan sacos de tipo *Polygonum* (Figura 3).

Una particularidad que se observó en esta especie (28) es la abundante deposición de calosa en la megasporogénesis de plantas del cv. *Tanganyika* ($2n=4=40$, apomíctico), en la pared de la célula madre de las megásporas, que se mantiene durante su elongación posterior dentro de la nucela. Esto último no concuerda con antecedentes bibliográficos previos (7), donde se considera que no existe deposición de calosa en procesos diplospóricos. La deposición de calosa en la megasporogénesis del diploide sexual Victoria es idéntica a la normalmente encontrada en procesos sexuales (en la pared de la célula madre de la megáspora (CMM), en la formación de la tétrada lineal y en las tres megásporas degenerantes). Pero aunque existe calosa en ambos tipos de reproducción, el patrón de deposición es diferente, y la tinción de este polisacárido permite diferenciar fácilmente la tétrada de megásporas de origen sexual de la célula madre elongada que dará origen luego a un saco embrionario no reducido. Por lo tanto en nuestro laboratorio hemos encontrado que la tinción con azul de anilina, colorante fluorescente específico para calosa, resulta ser una técnica muy eficiente para la discriminación entre materiales sexuales y apomícticos, que hemos aplicado exitosamente a la clasificación de poblaciones de mapeo que segregan para el modo reproductivo. En este momento nuestro grupo se encuentra trabajando en la obtención de poblaciones de mapeo a nivel diploide y tetraploide para el mapeo de regiones asociadas al modo reproductivo y caracteres de interés agronómico.

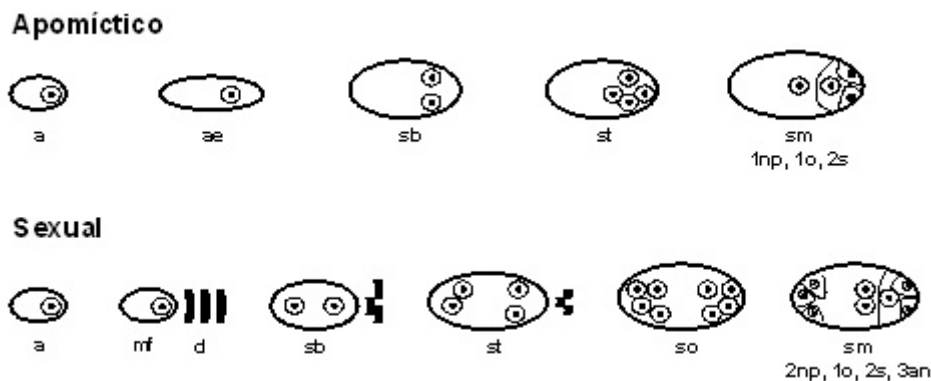


Figura 3: Diagrama de los procesos apomíctico y sexual en la megasporogénesis de pasto llorón (a: arquespora, æ: arquespora elongada, d: degenerantes, mf: megaspóra funcional, np: núcleos polares, o: oosfera/ovocélula, s: sinérgidas, sb: saco embrionario binucleado, sm: saco embrionario maduro, so: saco embrionario octonucleado, st: saco embrionario tetranucleado).

En el Laboratorio de Suelos y Aguas de Grassland (USDA, ARS, Temple, Texas, EEUU) Voigt y colaboradores estudiaron el control genético de la apomixis en pasto llorón (41, 42). Realizaron cruzamientos entre tetraploides sexuales y apomícticos. La evaluación del modo reproductivo de las progenies se realizaron a través de dos análisis: pruebas de progenie de plantas espaciadas a 1 m en parcelas a campo (evaluación de variabilidad en caracteres morfológicos) y por análisis citológico de la megasporogénesis y desarrollo del saco embrionario. En las pruebas de progenie se analizaron de 12 a 15 plantas de cada progenie y se midió: tamaño y altura de la planta, ancho y color de la hoja, número de cañas floríferas y tipo de ramificación de la inflorescencia. En esta prueba, los híbridos fueron clasificados en apomícticos, sexuales o intermedios si la progenie contenía un 30% o menos de plantas fuera de tipo, fenotipo no uniforme o unas pocas plantas posiblemente uniformes, respectivamente. En el análisis citológico, los híbridos se consideraron apomícticos, intermedios o sexuales cuando 0-25%, 26-75% o 76-100% de los sacos embrionarios procedían de reproducción sexual, respectivamente. El estudio de la progenie

(150 individuos) dio como resultado: 57 plantas apomícticas, 84 sexuales y 11 intermedias. Esto representa una proporción apomíctico:sexual de 1:1,4. Observaron que cuando el grado de sexualidad es bajo, las pruebas de progenie solían dar resultados equívocos. Por esta razón en un estudio posterior (34) se evaluó el uso de isoenzimas para estudiar el modo reproductivo y se obtuvieron buenas correlaciones con los otros test. De cualquier manera es necesario realizar pruebas de progenie realizando conteo de sacos embrionarios y utilizando marcadores moleculares para realmente determinar el tipo de herencia de este carácter.

7. Identificación de genes relacionados al modo reproductivo

Cuando nuestro grupo inició los estudios moleculares en *E. curvula* los genes y las vías metabólicas involucrados en la expresión de la diplosporía aún no habían sido identificados, así como tampoco se había establecido claramente la relación entre la expresión de este modo reproductivo y la poliploidía. Nuestro grupo de trabajo realizó un análisis compa-

rativo de la expresión de genes a gran escala utilizando ESTs y display diferencial utilizando la serie de plantas mencionada en el apartado 2 (8). De un total de 8.884 unigenes secuenciados de tejidos de inflorescencias inmaduras, 112 (1,26%) resultaron diferenciales por modo reproductivo y/o nivel de ploidía. Realizando comparaciones de a pares (plantas sexuales y apomícticas de iguales o diferentes ploidías, plantas diploides vs tetraploides) se identificaron genes relacionados con el modo reproductivo y con los cambios tempranos en los niveles de ploidía. También se encontró un grupo muy particular de genes cuya regulación podría estar afectando el modo reproductivo. La mayoría de estos genes están regulados negativamente en las plantas apomícticas (8).

Como consecuencia de los estudios mencionados, ahora se dispone de una lista de genes que participan del proceso apomíctico en *E. curvula*. Estos genes representan una "caja de herramientas" que podrían utilizarse en el futuro para la manipulación del modo de reproductivo en ésta y otras especies por ingeniería genética. Estos genes agrupan preferencialmente en ciertas categorías: control del ciclo celular, recambio de proteínas, síntesis de ADN y ARN, transposones. Un número considerable de genes inactivos en plantas diploides sexuales están también inactivos en la planta poliploide diplospórica pero activos en la tetraploide sexual, por lo que postulamos la hipótesis de que la diplosporía podría consistir en una falla para expresar genes que son necesarios para mantener la sexualidad en niveles poliploides.

8. Mejoramiento de la calidad del forraje

Los tipos celulares con paredes engrosadas tales como los de haces vasculares, el esclerénquima, la epidermis y el parénquima de las vainas de los haces en las gramíneas C_4 son los principales factores determinantes de una baja calidad forrajera. Forman bloques multicelulares sólidos, difícilmente digeribles debido a la lignificación y a los problemas de

accesibilidad a los microorganismos. Más del 50% de los carbohidratos de reserva y las proteínas de la hoja están contenidos dentro de las células de las vainas que rodean a los haces (Figura 4). Debido a esto, la digestión es lenta (24 - 48 hs o más) (47).

La lignina es un polímero complejo que presenta un alto grado de variabilidad estructural dependiendo del tejido y células en que se encuentra depositada y de las condiciones ambientales. Esta heterogeneidad se relaciona con la proporción relativa de los tres monómeros que constituyen el polímero, hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S), con los diferentes tipos de enlaces entre las unidades H, G y S y con la presencia de unidades fenólicas "no convencionales" dentro del mismo, lo cual afecta el grado de degradabilidad y, concomitantemente, la digestibilidad del forraje. En las gimnospermas, la lignina está típicamente compuesta por unidades G, con una menor proporción de unidades H, mientras que en las angiospermas la lignina está principalmente compuesta por unidades G-S (Ros Barceló, 1997). La vía de biosíntesis de este polímero es muy compleja y en la misma intervienen enzimas comunes a otras vías como la fenilalanina amonioliasa (PAL), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), la 3-O-metiltransferasa del ácido cafeico (COMT), la hidroxicinamoil CoA ligasa (4CL), la cafeoil CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT), y otras específicas de esta vía como la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y la cinamoil CoA reductasa (CCR). La regulación negativa de la expresión de algunos de estos genes mediante transformación genética es una estrategia muy valiosa para mejorar la calidad de los forrajes, ya que aún pequeñas disminuciones en el contenido de lignina tienen un alto impacto en la digestibilidad.

La mejora de la digestibilidad no sólo incrementa la recuperación de la energía del forraje, sino que reduce los costos de producción animal. El contenido total de lignina está asociada íntimamente con los polisacáridos de la pared celular, como la celulosa y hemicelulosa, lo que limita su digestibilidad y, por lo tanto, la producción de energía. Esto se debe a que

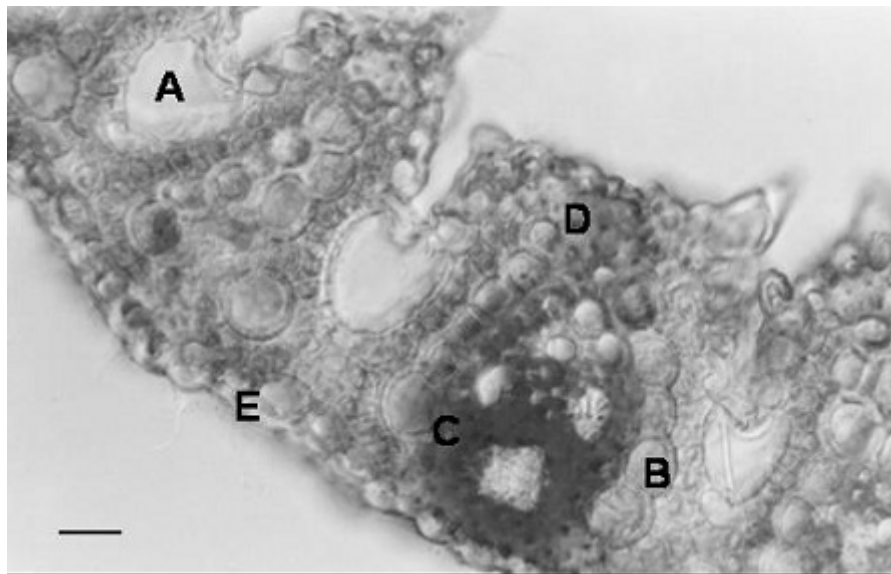


Figura 4: Corte transversal de una hoja de pasto llorón, cv. *Morpa*, teñido con fluoroglucinol, mostrando las células buliformes (A), la vaina parenquimática (B), la vaina mestomática (C), las extensiones de las vainas mestomáticas (D) y la epidermis (E). La barra equivale a 250 μm .

restringe la accesibilidad de las enzimas de los jugos digestivos a los polisacáridos de la pared celular. El contenido total de lignina, así como la proporción p-cumarato/ferulato (pCA: FA) y el contenido de metoxilo (proporción S/G) se encuentran correlacionados negativamente con la digestibilidad del forraje por los rumiantes. De manera que los cambios en la composición de monolignoles pueden mejorar la accesibilidad de las enzimas digestivas a los carbohidratos y de esta manera acelerar el proceso de digestión. Existen tres niveles de control en la manipulación del contenido de lignina: a) síntesis de monolignoles, b) transporte de monolignoles desde el sitio de síntesis al de polimerización y c) polimerización de los monolignoles para dar los productos finales. En particular, nuestro grupo ha considerado el primer enfoque para diseñar una estrategia biotecnológica para mejorar la calidad forrajera de *E. curvula*. Varios estudios demostraron que en la manipulación genética de la biosíntesis de lignina algunos genes como *pal*, *ch4* y *4cl* no

son buenos candidatos para la transformación, porque afectan varios aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta (36). Sin embargo, *omt*, *ccoamt* y *cad* son blancos apropiados para modificar la cantidad y calidad de la lignina debido a que en la mayoría de los casos la alteración de su expresión no produce efectos negativos (3).

A partir de las genotecas de ADNc de pasto llorón (ver apartado 4) se identificaron secuencias parciales de los genes de las enzimas PAL, COMT y CCR y el ADNc completo del gen que codifica para la CCoAOMT. Se realizó la caracterización de este último, determinándose el número de copias, la secuencia genómica (compuesta por 5 exones) y el patrón de expresión en tres tejidos: inflorescencias, hojas y raíces. También se identificaron varios alelos del mismo y actualmente estamos abocados al estudio de la posible expresión diferencial de los mismos en los distintos tejidos considerados a fin de producir cambios lo más específico posibles

sin producir disturbios en el desarrollo de la planta (16). Debido a que se utilizará una estrategia de antisentido para regular en forma negativa la expresión de este gen es importante disponer de esta información y del clon mencionado.

Dado que varios de los promotores de los genes que codifican para las enzimas de la vía de biosíntesis de lignina están regulados por los factores de transcripción de tipo *myb*, estos últimos resultan buenos candidatos para alterar tanto el contenido como la calidad de la lignina, en particular los de la familia *R2R3MYB*. Recientemente, Fornalé *et al.* (21) identificaron dos nuevos factores de transcripción pertenecientes a esta familia (*ZmMYB31* y *ZmMYB42*), observaron los patrones de expresión de dichos factores en *Arabidopsis thaliana* y estudiaron su influencia sobre varias enzimas involucradas en la síntesis de lignina incluyendo la COMT, tanto de *Arabidopsis* como de maíz. Estos autores observaron que la actividad de las COMTs y el contenido de lignina disminuyeron en las plantas transgénicas. A su vez, análisis de alineamientos múltiples de las genotecas provenientes de inflorescencias de pasto llorón con estos factores y otros provenientes de la misma familia -*AtMYB4*, *AtMYB32* (de *Arabidopsis thaliana*), *AmMYB308* y *AmMYB330* (de *Anthirinum majus*)- han permitido identificar dos secuencias altamente homólogas a genes ya reconocidos como inhibidores de la biosíntesis de lignina (Luciani, resultados no publicados).

9. Transformación genética

La transformación de especies apomícticas como el pasto llorón es una estrategia atractiva para los programas de mejoramiento ya que presenta varias ventajas: 1) los transgenes son integrados en el genoma en una sola generación, 2) estos transgenes son transmitidos de generación en generación por vía materna a través de las semillas, y 3) en el caso de aquellos cultivares apomícticos obligados, como el cultivar *Tanganyika* (4x), existe bajo riesgo de dispersión y/o cruce

con plantas del mismo cultivar u otros cultivares estrechamente relacionados ya que la apomixis diplospórica funciona como un sistema natural de contención de transgenes.

El desarrollo de protocolos de regeneración y transformación estable adecuados es el factor clave que determinará el éxito en la obtención de plantas transgénicas y su inclusión como líneas elite en los programas de mejoramiento.

Echenique *et al.* (20) evaluaron los efectos de reguladores de crecimiento como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la benzilaminopurina (BAP) en cuatro cultivares de pasto llorón. Entre estos genotipos, la mayor tasa de regeneración se observó en el cv. *Kromdraai*, mientras que los cvs. *Tanganyika* y *Don Pablo* mostraron tasas de regeneración relativamente bajas a partir de inflorescencias. Posteriormente, se evaluó el efecto de distintos explantos en el inicio de suspensiones celulares y la inducción y proliferación de callos y regeneración de plantas en tres cultivares (19). En este estudio, los autores observaron que las inflorescencias inmaduras, principalmente aquellas provenientes del cultivar *Kromdraai*, fueron los explantos con los mayores porcentajes de inducción de callos y regeneración de plantas. En cambio, las semillas y embriones indujeron un porcentaje similar de callos en los tres cultivares, aunque dichos callos mostraron bajos niveles de regeneración. Recientemente, Díaz (17) corroboró que las inflorescencias inmaduras resultaron ser los mejores explantos en medio sólido para la inducción de callos y regeneración de plantas del cultivar *Kromdraai*. Sin embargo, el uso de estos explantos no sólo limita la disponibilidad de inflorescencias como material de partida a la época de floración, sino también la línea de investigación queda sujeta a la cantidad y calidad de la semilla disponible cada año. Además, si bien *Kromdraai* ha sido ampliamente empleado en los estudios de cultivo *in vitro* debido a su performance en la inducción de callos y regeneración, no es un material de uso común en nuestro país y, aparentemente, es apomíctico facultativo.

En base a la información disponible, nuestro laboratorio evaluó los efectos de dos medios de cultivo empleados previamente en el cultivo de inflorescencias de pasto llorón (MS + 2 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l BAP, informado en (19) y en el cultivo de semillas de pasto bahía (MS + 3 mg/l dicamba + 1 mg/l BAP, informado en (1) en la inducción de callos y la regeneración de plantas de los cvs. *Tanganyika*, *Don Pablo* y *Kromdraai*. En este estudio se observó a los 15 días de la siembra los callos comenzaron a formarse a partir de la base de la semilla en el medio MS suplementado con 2,4-D, crecieron activamente como callos blancos y friables, y no regeneraron plantas luego de 75 días (2 y 1/2 meses). En cambio, en el medio MS suplementado con dicamba, los callos se formaron a partir del epicótilo a los 30 días, se mostraron pequeños y embriogénicos y dieron porcentajes de regeneración (callos embriogénicos respecto del número total de callos) de un 18, 20 y 31% en los cvs. *Kromdraai*, *Tanganyika* y *Don Pablo*, respectivamente (Luciani et al, resultados no publicados). Estos resultados indican que existe un potencial natural de regeneración en el cv. *Tanganyika* que puede incrementarse modificando las concentraciones de dicamba y BAP para promover la formación de los callos embriogénicos a partir del epicótilo y favorecer la elongación de la semilla para poder seleccionar estos callos y descartar aquellos que se forman en la base de la semilla y en las primeras hojas.

Hasta el momento, sólo existen algunos estudios preliminares sobre la expresión de transgenes en pasto llorón. Experimentos de expresión transiente indicaron que los mayores niveles de expresión se obtuvieron con el uso de los promotores *ubi1* y *act1* (de ubiquitina de maíz y actina de arroz, respectivamente) y sus respectivos intrones (17). Recientemente, estos promotores mostraron niveles similares de expresión en callos provenientes de inflorescencias del cultivar *Kromdraai*, mientras que la expresión fue mínima en los callos del cultivar *Don Pablo* (Díaz et al.,

resultados no publicados). En el año 2006, Díaz obtuvo plantas del cv. *Kromdraai* que expresaban en cierto grado resistencia a higromicina. Sin embargo, no se encontró resistencia en progenies de estas plantas. Ncanana et al. (29) informaron la integración y expresión del gen *hsp12* de *Saccharomyces cerevisiae* en plantas del cultivar *Ermelo*. Sin embargo, la proteína transgénica no pudo ser detectada y, probablemente, estas plantas hubieran sido descartadas durante el cultivo *in vitro* si se hubiera empleado algún agente selectivo como la higromicina, la paramomicina o el glifosato. El desarrollo de un sistema de selección efectivo es otro de los factores críticos involucrados en la obtención de plantas transgénicas de pasto llorón y es el paso a seguir para establecer un protocolo robusto de transformación estable que nos permita validar aquellas secuencias genómicas candidatas a intervenir en la regulación de la apomixis y la biosíntesis de lignina.

10. Conclusiones y perspectivas

En el contexto del futuro cambio climático global las gramíneas C₄ o especies megatérmicas tendrán un rol fundamental en la producción animal. El pasto llorón es la forrajera más cultivada de la zona semiárida templada del país y representa un aporte económico de magnitud para la producción agropecuaria de la región. La información obtenida por nuestro grupo permitirá realizar avances en el mejoramiento de su calidad como forraje a través de herramientas moleculares. El conocimiento del modo reproductivo permitirá avanzar en este aspecto. Por otro lado, el tipo de apomixis que presenta, donde no hay modificación de la relación de ploidía embrión/endosperma (2x:3x), respectivamente), sería interesante para la transferencia a otras especies, como los cereales, que son sumamente sensibles en este aspecto. Si bien estamos aún lejos de poder transmitir el carácter, este aspecto debe tenerse en cuenta.

11. Bibliografía

1. Altpeter, F. and Positano, M. 2005. Efficient plant regeneration from mature seed derived embryogenic callus of turf-type bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). *Int. Turfgrass Soc. Res. J.* 10: 479-484.
2. Ayele, M., Tefera, H., Assefa, K. and Nguyen, H.T. 1999. Genetic characterization of two *Eragrostis* species using AFLP and morphological traits. *Hereditas* 130: 33-40.
3. Boudet, A. 2000. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 81-96.
4. Brix, K. 1974. Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schrud.) Nees. *Z. Pflanzenzucht* 71:25-32
5. Cardone, S., Olmos, S. y Echenique, V. 2004. Variación Somaclonal. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds). Editorial de INTA. Parte III, Capítulo 1. Págs. 83-96.
6. Cardone, S., Polci, P., Selva, J.P., Mecchia, M., Pessino, S., Hermann, P., Cambi, V., Voigt, P., Spangenberg, G. and Echenique, V. 2006. Novel genotypes of the subtropical grass *Eragrostis curvula* for the study of apomixis (diplospory). *Euphytica*, 151:263-272.
7. Carman, J., Crane, C. and Riera-Lizarazu, O. 1991. Comparative histology of cell walls during meiotic and apomictic megasporogenesis into hexaploid australasian *Elymus* species. *Crop Science*, 31: 1527-32.
8. Cervigni, G., Paniago, N., Pessino, S., Selva, J.P., Díaz, M., Spangenberg, G. and Echenique, V. 2008. Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Mol. Biol.* 67: 11-23.
9. Cervigni, G., Paniago, N., Díaz, M., Selva, J.P., Zappacosta, D., Zanazzi, D., Landerreche, I., Felitti, S., Pessino, S., Spangenberg, G. and Echenique, V. 2008. Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Mol. Biol.* 67: 1-10.
10. Collard, B., Jahufer, M., Brouwer, J.B. and Pang, E. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
11. Covas, G. 1991a. Introducción del pasto llorón en la República Argentina. *In: El pasto llorón, su Biología y Manejo*. Ed. Fernández, O., Bredan, R. y Gargano, A. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina, págs. 1-6.
12. Covas, G. 1991b. Taxonomía y morfología del pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrud.) Nees), con referencia sobre otras especies cultivadas de *Eragrostis*. *In: El pasto llorón, su Biología y Manejo*. Ed. Fernández, O., Bredan, R. y Gargano, A. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina, págs. 7-17.
13. Covas, G. y Cairnie, A. 1985. El pasto llorón (*Eragrostis curvula*). Manual con información básica y normas para su cultivo y utilización. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 76 págs.
14. Crane, C. 2001. Classification of apomictic mechanisms. *In: The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Ed. Savidan, Y., Carman, J. y Dresselhaus, T., Mexico D.F., CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 243 pag., Cap. 3, pag. 25-43.
15. Cullis, C. 2005. Mechanisms and Control of Rapid Genomic Changes in Flax. *Annals of Botany*, 95:201-206.
16. Díaz, M., Garbus, I., Cervigni, G y Echenique, V. 2008. Estudio de un gen clave en la síntesis de lignina en *Eragrostis curvula*. XXXVII Congreso Argentino de Genética. Pág. 152.
17. Díaz, M. 2006. Biotecnología para el mejoramiento de la calidad nutritiva en pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrud.) Nees. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Sur. 248 págs.
18. Echenique, V., Schrauf, G. y Selva, J.P. 2004. Genómica. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds). Editorial de INTA. Parte VII, Capítulo 1. Págs. 213-228.
19. Echenique, V., Díaz, M., Polci, P. and Mroginski, L. 2001. Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (Schrud.) Nees. *Biocell* 25: 131-138.
20. Echenique, V., Polci, P. and Mroginski, L. 1996. Plant regeneration in weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*) through inflorescence culture. *Plant, Cell, Tiss. and Organ Cult.* 46: 123-130.
21. Fornalé, S., Sombol, F.H., Maes, T., Capellades, M., Puigdomenech, P., Rigau, J. and Caparros-Ruiz, D. 2006. Down-regulation of the maize and Arabidopsis thaliana caffeic acid O-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors. *Plant Mol. Biol.* 62: 809-823.
22. Frayssinet, N., Cardone, S., Polci, P., Mroginski, L. and Echenique, V. 1999. Cytological Alterations in *Eragrostis* Regenerants. *Cytologia* 64: 129-135.

23. Laborde, H. 1991. Calidad y valor nutritivo. *In*: El pasto llorón, su Biología y Manejo. Ed. Fernández, O.A.; R.E Brevedan y A.O. Gargano. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina, pag. 325-347.
24. Larkin, P. and Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures from plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
25. Leigh, J.H. 1960. Some aspects of anatomy, ecology and physiology of *Eragrostis*. Ph.D. Thesis. Univ. of Witwatersrand, Johannesburg. South Africa. 259 pp.
26. Lolle, S., Victor, J., Young, J. and Pruitt, R. 2005. Genome-wide non-mendelian inheritance of extra-genomic information in *Arabidopsis*. *Nature* 434: 505-509.
27. Mecchia, M., Ochogavía, A., Selva, J.P., Lasplina, N., Felitti, S., Martelotto, L., Spangenberg, G., Echenique, V. and Pessino, S. 2007. Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*) *Journal of Plant Physiology* 164:1051-1061.
28. Meier, M., Zappacosta, D. y Echenique, V. 2007. Evaluación del test de deposición de calosa para el fenotipado de una población de mapeo para la región de la diplosporía en pasto llorón. REDBIO 2007, VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria, Viña del Mar, Chile, 22 al 26 de Octubre.
29. Ncanana, S., Brandt, W., Lindsey, G. and Farrant, J. 2005. Development of plant regeneration and transformation protocols for the desiccation-sensitive weeping lovegrass *Eragrostis curvula*. *Plant Cell Rep.* 24: 335-340.
30. Paniago, N., Heinz, R., Fernández, P., Lew, S. y Hopp, E. 2004. Análisis informático de secuencias moleculares. *In*: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds). Editorial de INTA. Parte, VII, Capítulo 3. Págs.239-254.
31. Pessino, S. y Martelotto, L. 2004. Métodos para el estudio de la expresión de genes *In*: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (eds). Editorial de INTA, Parte VII, Capítulo 2. Págs. 229-238.
32. Polci, P. 2000. Cultivo de tejidos para la obtención de variantes somaclonales de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Sur. 234 pp.
33. Poverene, M. 1988. Contribución Citogenética y Quimiosistemática a la Taxonomía del Pasto Llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.), Nees. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Sur. 218 pp.
34. Poverene, M. and Voigt, P. 1995. Identification of apomictic and sexual *Eragrostis curvula* (Schrad) Nees hybrids by isozyme analysis. *Mendeliana* 11: 29-36.
35. Poverene, M., Di Renzo, M. y Curvetto, N. 1988. Diferenciación de cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, mediante electroforesis de isoenzimas en Argentina. *Turrialba*. 38: 173-178.
36. Rastogi, S. and Dwivedi, U. 2008. Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. *Plant Science*, 174: 264-277.
37. Song, K., P., Lu, Tang, K. and Osborn T. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7719-7723.
38. Streetman, L. 1963. Reproduction of the lovegrass, the genus *Eragrostis*-I. *E. chlorome-las* Steud., *E. curvula* (Schrad.) Nees, *E. Lehmanniana* Nees and *E. superba* Peyr. *Wrightia*, 3:41-51.
39. Stupar, R., Bhaskar, P., Yandell, B., Rensink, W., Hart, A., Ouyang, S., Veilleux, R., Busse, J., Erhardt, R., Buell, C. and Jiang, J. 2007. Phenotypic and Transcriptomic Changes Associated With Potato Autopolyploidization *Genetics*, 176: 2055-2067.
40. Varshney, R., Graner, A. and Sorrells, M. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications *Trends in Biotechnology* 23: 48-55.
41. Voigt, P. and Bashaw, E. 1972. Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Sci.* 12: 843-847.
42. Voigt, P. and Burson, B. 1983. Breeding of apomictic *Eragrostis curvula*. *Proc. XIV Intern. Grassl. Congr. J.A. Smith and V.W. Hays* (eds.) West-view Press, U.S.A.
43. Voigt, P., Rethman, N. and Poverene, M. 2004. Lovegrass. *In*: Warm-Season (C4) grasses, *Agronomy Monograph* N° 45, American Society of Agronomy, Crop Science of America and Soil Science of America, USA, Cap. 32, pag. 1027-56.
44. Vorster, T. and Liebenberg, H. 1977. Cytogenetic studies in the *Eragrostis curvula* complex. *Bothalia* 12: 215-221.

45. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
46. Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. and Tingey, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531-5.
47. Wilson, J.R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *J. Agric. Sci.* 122: 173-182.
48. Zappacosta, D., Carrera, A., Pacheco, G., Cardone, S. y Echenique, V. 2008. Diferenciación varietal de pasto llorón por marcadores moleculares. *Boletín INASE*, en prensa.