



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA**

TESIS DOCTORAL EN AGRONOMÍA

Obtención y evaluación de nuevos materiales de pasto llorón (*Eragrostis curvula* - Schrad. Nees) y desarrollo de protocolos biotecnológicos para su utilización en programas de mejoramiento de la especie.

ING. AGR. CLAUDIA MABELTERENTI ROMERO

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesis presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del CERZOS CONICET durante el período comprendido entre el 2 de noviembre de 2010 y el 22 de diciembre de 2014, bajo la dirección de Dra. Echenique Viviana Profesora Titular de Genética Formal y Molecular y Biotecnología Agrícola. Departamento de Agronomía, UNS (Desde 1 de Julio de 2007). Categoría I Programa de Incentivos a Docentes - Investigadores (Decreto 2427/99). Investigadora Principal (CERZOS, CONICET) de Bahía Blanca.

Terenti Romero, Claudia Mabel



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el.... /.... /....., mereciendo la

Calificación de.... (.....)

Dedicada a mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnología, que posibilitaron mi formación a través de una beca PFDT del PRH (Programa de Recursos Humanos): 75-11 Mejoramiento molecular de gramíneas forrajeras para áreas marginales.

A mi Directora la Dra. Viviana Echenique por permitirme realizar este trabajo en el CERZOS – CONICET, por la paciencia y el apoyo brindado, su disponibilidad para aclarar mis dudas y ayudarme a madurar los conocimientos.

Al CERZOS, por brindarme un lugar de trabajo, equipamiento y todas las facilidades del mismo para realizar las tareas inherentes a mi proyecto de tesis. A todo su personal en especial a Diego, Tony, Manfred, Juan Selva, Juan Rodrigo, Lorena, Yesica, Daniela, Valeria, Bernardo, Mauro, Gaby, Pablo M., Potensky, Ramón, Ana Clara, Camila, Ingrid, Alejandra, Alicia, José, Ricky, Pingüino, Emily, Pablo R., Adelina, Silvia, gracias por todos los buenos momentos compartidos y los aprendizajes intercambiados.

A CONICET, UNS y la ANPCyT quienes, a través de los proyectos que se mencionaran más adelante (Pagina VI) financiaron mi investigación.

A mi familia por su apoyo incondicional.

A todos muchas gracias!!

PUBLICACIONES

1) Artículos breves

Poblaciones de mapeo en pasto llorón - Éxitos y fracasos. Diego Zappacosta¹, Mauro Meier¹, **Claudia Terenti**¹, Viviana Echenique¹. ¹Lab. Biotecnología Vegetal (CERZOS) y Dpto de Agronomía (UNS) CCT-Bahía Blanca, Argentina. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Zavalla, Rosario, Argentina. ISSN N°1853-4333 NÚMERO XX AÑO 12-2012.

Apomixis en *Eragrostis curvula*. Echenique V., Pessino SC., Meier M., Selva JP., Ochogavía A., Zappacosta D., Romero JR., Rodrigo JM., Garbus I., **Terenti C.**, Diaz A. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Zavalla, Rosario, Argentina. ISSN N°1853-4333 NÚMERO XX AÑO 12-2012.

2) Comunicación a congreso

Transformación de *Eragrostis curvula* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Terenti R. CM**¹, A Diaz¹, A Beznec², A Diaz Paleo², V Echenique¹.¹CERZOS-CONICET-UNS Bahía Blanca Pcia. de Bs. As. Argentina, ²Instituto Favret INTA Castelar Pcia. Bs. As. Argentina. GMV 37. XV Congreso Latinoamericano de Genética, XLI Congreso Argentino de Genética, XLV Congreso de la Sociedad de Genética de Chile y II Reunión Regional SAG-Litoral, organizado conjuntamente por la Asociación Latinoamericana de Genética, la Sociedad Argentina de Genética y la Sociedad de Genética de Chile. 28 al 31 de Octubre de 2012. Rosario, Argentina. ISSN: 1852-6233. VOL XXIII Suppl 2012.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada gracias a una Beca INTA – Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Programa de Formación de Doctorados en Áreas Tecnológicas Prioritarias (PFDT). Código y título de PRH (Programa de Recursos Humanos): 75-11 Mejoramiento molecular de gramíneas forrajeras para áreas marginales. Institución Beneficiaria del PRH: Estación Experimental Agropecuaria Villa Mercedes (San Luis), dependiente del Centro Regional La Pampa - San Luis.

FSAgrobio03. FONARSEC. Desarrollo de Pasturas transgénicas comerciales con tolerancia a estreses bióticos y abióticos. 2011-2015. Investigador Responsable: Dr. Pablo Cerdán. Módulo: pasto llorón. Investigador responsable: Dra. Viviana Echenique.

Identificación de factores genéticos y epigenéticos que controlan la apomixis diplospórica en *Eragrostis curvula*. PGI / SECyT UNS (2013- 2015). 24/A199. Investigadora Responsable: Dra. Viviana Echenique.

Identificación de factores genéticos y epigenéticos que controlan la apomixis diplospórica en *Eragrostis curvula*. 2012/2014). PIP CONICET 11220110100767. IR. V. Echenique.

Proyecto PAMSL – 1282206: Gestión de la innovación para el desarrollo territorial del sur de San Luis. EEASL INTA 2014.

RESUMEN

E. curvula (Schrad.) Nees “pasto llorón”, es una gramínea perenne que constituye un importante recurso forrajero para regiones semiáridas. El objetivo general de este trabajo de tesis fue contribuir al mejoramiento del pasto llorón a partir de dos estrategias. La primera consistió en la obtención de nuevos materiales híbridos a partir de cruzamientos entre materiales sexuales y apomícticos y evaluar sus características moleculares y agronómicas. Por otro lado, se intentó poner a punto un protocolo de transformación genética, basado en *Agrobacterium tumefaciens*, que permita contribuir al mejoramiento de la calidad del forraje por regulación negativa de la biosíntesis de lignina y que sea una herramienta para la validación de genes relacionados con el modo reproductivo.

En este trabajo se realizaron 15 cruzamientos entre OTA-S USDA y Tanganyika USDA, ambos tetraploides, siendo el primero sexual y el segundo apomíctico. De estas cruza se obtuvo un total de 2063 semillas de las cuales solo germinó el 39,31% y de este, solo se obtuvo un 15,85% de plantas normales. Se extrajo ADN de las plantas normales a fin de proceder a determinar la naturaleza híbrida de las mismas. Se utilizaron AFLPs y EST-SSR. Se obtuvieron 691 marcadores de AFLP de los cuales 317 fueron polimórficos. Con estos análisis se determinó que de las 232 plantas analizadas, solo seis resultaron de origen híbrido, es decir que portaban bandas paternas. El resto de las plantas obtenidas provenían de autofecundación del progenitor femenino OTA USDA por efecto mentor del polen del material apomíctico. Esto fue un resultado inesperado, dada la autoincompatibilidad de este genotipo.

El segundo análisis con marcadores moleculares, fue realizado con el objetivo de buscar variabilidad dentro del complejo de plantas no híbridas obtenidas. En este caso se analizaron seis combinaciones de primers de marcadores de AFLPs, con los cuales se obtuvieron 376 marcadores en total, de los cuales 46 resultaron ser polimórficos. Se observó variabilidad a nivel molecular y en caracteres morfológicos y agronómicos; el progenitor masculino se diferenció a ambos niveles de las demás plantas; las plantas hijas fueron más similares a la madre aunque algunas la superaron en caracteres de interés. La distancia genética observada entre el progenitor femenino y el masculino pudo haber afectado la obtención de plantas híbridas. El bajo porcentaje de germinación (39%)

observado y la elevada mortalidad de plántulas, podría también atribuirse a este factor, correspondiendo las semillas no germinadas y las plantas anómalas a híbridos no viables.

Por último, se realizaron 23 ensayos para la transformación de pasto llorón utilizando dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que difieren en su capacidad de virulencia, AGL0 y AGL1, ambas conteniendo el vector binario (Ppzp201BUGI). Se inoculó un total de 8428 semillas maduras bajo diferentes condiciones experimentales. Se obtuvo un protocolo de transformación transiente para pasto llorón a partir de semillas maduras. Deberán ajustarse algunas variables a fin de obtener un protocolo de transformación estable.

ABSTRACT

E. curvula (Schrad.) Nees "weeping lovegrass", is a perennial grass that is an important forage resource for semiarid regions. The overall objective of this thesis was to contribute to the improvement of weeping lovegrass from two strategies. The first involved the development of new hybrid materials from crosses between sexual and apomictic materials and to assess its molecular and agronomic characteristics. On the other hand, we tried to develop a protocol for genetic transformation, based on *Agrobacterium tumefaciens*, that could contribute to improve forage quality through downregulation of lignin biosynthesis and as a tool for validation of genes related to the reproductive mode.

In this work 15 crosses between OTA-S and Tanganyika, both apomictic tetraploid materials, were performed and 2063 seeds were obtained. After two months only the 39.31% of these seeds germinated and 15.85% of these seeds gave origin to viable plants. DNA of these plants was isolated in order to assess the hybrid origin of these plants and also to analyze the variability present in the obtained plant population. EST-SSR and AFLP markers were used with this purpose and 691 AFLP markers were amplified, of which 317 were polymorphic. With these markers it could be established that from 232 analyzed plants, only six were true hybrids. This would indicate that the remaining plants were obtained by self-fertilization of the female parent OTA-S. This was an unexpected result, given the self-incompatibility of this genotype.

The second analysis was performed in order to assess the variability within the obtained plant population. Six AFLPs primer combinations allowed to amplify 376 markers of which 46 were polymorphic. A high level of variation was observed at molecular, morphological

and agronomic traits; the male parent differed significantly from the other plants at all levels being the offspring plants very variable and similar to the maternal plant and, in some instances superior to this plant in different interesting traits.

These results also allowed to assess that the genetic distance between the female and the male parents may have affected the production of hybrid plants. The low percentage of germination (39%) and the high seedlings mortality could also be attributed to this factor..

Finally, 23 transformation assays were performed in order to establish a plant transformation protocol for weeping lovegrass using two *Agrobacterium tumefaciens* strains differing in its virulence (AGL1 and AGL0) and containing the binary vector Ppzp201BUGI. A total of 8428 mature seeds were inoculated and different treatments were performed changing different parameters in order to establish the best conditions for inoculation and plant regeneration. It was not possible to obtain a protocol for stable transformation but a transient transformation protocol was obtained from mature seeds. Some variables should be adjusted in order to obtain a stable and reliable transformation protocol for weeping lovegrass.

INDICE GENERAL	PÁGINAS
PREFACIO.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
PUBLICACIONES.....	5
FINANCIAMIENTO.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
INDICE.....	11
INTRODUCCIÓN.....	21
La apomixis.....	22
El mejoramiento de especies apomícticas.....	23
Desarrollo de cultivares apomícticos.....	26
Aportes de la biotecnología.....	28
La especie objeto de este estudio, <i>Eragrostis curvula</i> (Schra.) Nees o pasto llorón.....	34
Tipos morfológicos.....	37
Distribución geográfica.....	38
Importancia.....	40
Antecedentes acerca del mejoramiento.....	43
Calidad del forraje	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
CAPITULO 1 :	53
Obtención de nuevos materiales de pasto llorón por cruzamientos entre genotipos sexuales y apomícticos	
INTRODUCCIÓN	54
OBJETIVO GENERAL Y HIPOTESIS	69

MATERIALES Y MÉTODOS	70
1. Primera Etapa. Obtención de Híbridos.	71
Material vegetal.	
Cruzamientos.	
Colección de semilla y trillado.	
Germinación <i>in vitro</i> .	
Rusticación en cuarto de cultivo.	
2. Segunda Etapa.	74
2.1. Caracterización genotípica.	
2.1.1. Extracción de ADN	
2.2. Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	
2.3. Secuencias Simples Repetidas obtenidas a partir de Etiquetas de Secuencias Expresadas (ESTs- SSRs)	
3. Tercer Etapa. Rusticación Invernáculo.	79
3.1. Establecimiento de las plantas en invernáculo.	
3.2. Evaluación fenotípica en condiciones de invernáculo.	
4. Cuarta Etapa. Campo.	80
4.1. Establecimiento de las plantas seleccionadas a campo.	
4. 2. Evaluación fenotípica en condiciones de Campo.	
5. Análisis estadísticos	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
Primera etapa. Obtención de híbridos.	
Segunda etapa. Caracterización genotípica.	
Tercera etapa. Evaluación en Invernáculo.	

Cuarta etapa. Evaluación a campo.	
CONCLUSIONES	113
CAPITULO 2:	115
Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en <i>Eragrostis curvula</i> (Schrad.) Nees “pasto llorón”.	
INTRODUCCIÓN	116
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	137
MATERIALES Y MÉTODOS	138
A.Material vegetal	
B.Cultivo de tejidos	
1.Explantos	
2.Esterilización	
3.Inducción de callos	
4.Regeneración de plantas	
5.Determinación de la mínima concentración inhibitoria del agente selectivo	
C. <i>Agrobacterium</i>	
D.Transformación de <i>A. tumefaciens</i> por choque térmico (freeze-thaw)	
E.Transformación de <i>Eragrostis curvula</i>	
1.Crecimiento de las cepas de <i>Agrobacterium</i>	
2.Tratamiento de los explantos	
3.Inoculación y co-cultivo	
4. Ensayo histoquímico de Gus	
5. Cultivo <i>in vitro</i> de los tejidos inoculados	
6. Selección	
F.Análisis de plantas resistentes al agente selectivo	
1.Extracción de ADN	
2.Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
3.Southern Blot	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	150
Transformación de <i>Agrobacterium</i>	
Tranformación de <i>Eragrostis curvula</i> utilizando las cepas transformadas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
Selección	
Poliembrionía	
TABLAS	158
CONCLUSIONES	169
CONSIDERACIONES FINALES	170
BIBLIOGRAFIA	172

LISTADO DE TABLAS INTRODUCCION

Tabla 1. Comparación entre especies C ₃ y C ₄ en cuanto a eficiencia fotosintética, eficiencia en el uso del agua y de nitrógeno.	42
Tabla 2. Genotipos de pasto llorón disponibles en la colección del CERZOS (2014).	46

LISTADO DE TABLAS CAPITULO 1

Tabla 1. Principales aplicaciones de los marcadores moleculares en el mejoramiento vegetal (Beckmann, 1991, modificada y ampliada).	61
Tabla 2. Análisis comparativo entre de los marcadores moleculares utilizados en esta tesis, AFLPs y SSRs (Ferreira y Gratrapaglia, 1998).	64
Tabla 3. Cruzamientos de pasto llorón realizados entre el progenitor femenino OTA-S USDA, de reproducción sexual, y el progenitor masculino Tanganyika, de reproducción apomíctica, ambos tetraploides.	72
Tabla 4. Componentes de la mezcla de digestión con <i>MseI-PstI</i> .	76
Tabla 5. Componentes de mezcla de ligación de marcadores moleculares AFLP.	77
Tabla 6. Secuencias y combinación de cebadores para AFLP.	78
Tabla 7. Secuencias de cebadores de SSR de pasto llorón.	78

Tabla 8. Variables morfológicas evaluadas en la progenie del cruzamiento de <i>E. curvula</i> , OTA USDA x Tanganyika USDA, en condiciones de invernáculo.	80
Tabla 9. Variables morfológicas evaluadas en 50 genotipos de <i>E. curvula</i> provenientes del cruzamiento OTA USDA x Tanganyika USDA, más los progenitores, creciendo en condiciones de campo.	82
Tabla 10. Semillas obtenidas en cada uno de los cruzamientos de pasto llorón realizados entre el progenitor femenino OTA-S USDA, de reproducción sexual, y el progenitor masculino Tanganyika USDA, de reproducción apomíctica, ambos tetraploides.	85
Tabla 11. Coeficiente de correlación de Pearson entre los datos tomados a campo y en condiciones de invernáculo para cuatro variables morfológicas (NMR= número de macollos reproductivos, NMV= número de macollos vegetativos, NP= número de panojas y DC= diámetro de corona) (Infostat, Di Rienzo et al., 2013).	100
Tabla 12. Coeficiente de variación para 11 caracteres morfológicos de pasto llorón registrados en condiciones de campo. El número de individuos analizados fue de 95 (Infostat, Di Rienzo et al., 2013).	101
Tabla 13. Análisis de correlación entre variables morfológicas en las plantas evaluadas para las dos primeras componentes principales (coeficiente de correlación cofenética= 0,978).	105

LISTADO DE TABLAS CAPITULO 2

Tabla 1. Comparación de técnicas de transformación más utilizadas en plantas (Diaz. et al., 2010).	123
Tabla 2. Condiciones experimentales de los ensayos de transformación utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, Para la inoculación se utilizó un medio de crecimiento bacteriano común.	144
Tabla 3. Condiciones experimentales de los ensayos de transformación utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, Para la inoculación se utilizó un medio de crecimiento bacteriano fresco.	145
Tabla 4. Condiciones experimentales de los ensayos de transformación utilizando la cepa AGL0 pPZP201-BUGI. Para la inoculación se utilizó un medio de crecimiento bacteriano fresco.	145

Tabla 5. Componentes de la PCR para primers específico para los genes <i>uidA</i> y <i>bar</i> .	148
Tabla 6. Secuencias de primers correspondientes a los genes <i>bar</i> y <i>uid A</i> .	148
Tabla 7. Transgénesis utilizando la cepa AGL0 pPZP201-BUGI y callos embriogénicos de los cvs. Tanganyika y Kromdraai como explantos	158
Tabla 8. Transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y callos embriogénicos de los cvs Tanganyika y Kromdraai como explantos	158
Tabla 9. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y embriones de los cvs. Tanganyika y Kromdraai como explantos	159
Tabla 10. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL0 pPZP201-BUGI y semillas maduras heridas de los cvs. Tanganyika y Kromdraai como explantos	159
Tabla 11. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras heridas de los cvs. Tanganyika, Kromdraai y Morpa como explantos.	160
Tabla 12. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras germinadas, del cv. Tanganyika como explanto.	160
Tabla 13. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras sonicadas del cv Tanganyika como explantos	161
Tabla 14. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras sin herir + Glads Beads, cv Tanganyika.como explantos.	161
Tabla 15. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras heridas + Glads Beads, cvTanganyika. como explantos	161
Tabla 16. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI semillas maduras sin herir + Glads Beads, cv Tanganyika como explantos	162
Tabla 17. Selección de plantas regeneradas <i>in vitro</i> con el agente selectivo fosfinotricina en tres rondas de selección.	163
Tabla 18. Selección de plantas regeneradas <i>in vitro</i> con el agente selectivo fosfinotricina en tres rondas de selección.	164
Tabla 19. Selección de plantas regeneradas <i>in vitro</i> con el agente selectivo fosfinotricina en tres rondas de selección.	164

LISTADO DE FIGURAS INTRODUCCION

Figura 1. Comparación de los mecanismos de reproducción sexual y apomíctica (diplosporía, aposporia y embriogénesis adventicia en plantas, Adaptado de Koltunow, 1993).	22
--	-----------

Figura 2. Esquema de un protocolo para el desarrollo de cultivares de especies apomícticas (Adaptada de Brown et al., 2014).	27
Figura 3. Detalles de la planta e inflorescencia de <i>E. curvula</i> . A, parte basal de la planta, B, inflorescencias; C, espiguilla; D, gluma inferior; E, gluma superior, F, antecio, G, lemma vista ventral; H-I, pálea; J, cariopsis, vista dorsal; K, cariopses, vista lateral (Nicora, 1998).	36
Figura 4. El área sombreada agregada al mapa de Burgos (1963), que representa el clima de las Regiones Áridas en la República Argentina, corresponde a la región de mayor difusión del pasto llorón en el país (Tomado de Covas, 1991).	39
Figura 5. Regiones de Argentina donde se muestran las zonas de adaptación y distribución de las principales especies megatérmicas.	39
Figura 6. Isohietas (mm de lluvias promedio anual) e Isotermas (°C promedio del mes más frío y anual) de la República Argentina.	40

LISTADO DE FIGURAS CAPITULO 1

Figura 1. Esquema de trabajo para la obtención de híbridos en pasto llorón.	70
Figura 2. Etapas de la obtención de probables híbridos de pasto llorón por cruzamientos entre materiales sexuales y apomicticos.	71
Figura 3. Esquema de la disposición del ensayo de <i>E. curvula</i> en bloques completamente aleatorizados en el campo experimental situado en el Centro Científico Tecnológico CONICET – Bahía Blanca.	81
Figura 4. Germinación <i>in vitro</i> a lo largo del tiempo (días). Los datos se tomaron a los 15, 30, 45 y 60 días, discriminado en las plantas normales y anormales (sin raíz, sin tallo, necróticas sin clorofila).	86
Figura 5. Valores totales de germinación <i>in vitro</i> acumulados a los 60 días luego de la siembra <i>in vitro</i> .	87
Figura 6. Semillas germinando <i>in vitro</i> . A, B y C plantas anormales (sin raíz, sin tallo, necróticas (sin clorofila); D) planta normal.	87
Figura 7. Microsatélites (EST-SSRs) obtenidos con el cebador E19, se muestran las bandas amplificadas en la F1 y en los progenitores, masculino Tanganyika USDA (T) y femenino OTA USDA (O). Las flechas señalan a aquellas plantas híbridas que presentan marcadores paternos.	89

- Figura 8.** Marcadores AFLP (polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados), amplificados en los progenitores masculino (T) Tanganyika, femenino (O) OTA y en la progenie obtenida. Las flechas señalan a aquellas plantas híbridas que presentan marcadores paternos. **90**
- Figura 9.** Marcadores de AFLPs amplificados en la progenie y progenitores (C51, Tanganyika USDA y C52, OTA USDA) correspondiente a la combinación de cebadores P40-M43. Las flechas indican la presencia de polimorfismos. **91**
- Figura 10.** Marcadores de AFLPs amplificados en la progenie y progenitores (C51, Tanganyika USDA y C52, OTA USDA) correspondiente a la combinación de cebadores P37-M43. Las flechas indican la presencia de polimorfismos. **92**
- Figura 11.** Diagrama de Venn correspondiente al análisis de bandas de AFLPs de pasto llorón (progenitores y progenie no híbrida) polimórficas obtenidas con cuatro combinaciones de primers (P37-M43; P40-M38; P40-M43; P40-M45), haciendo uso del programa estadístico GenAEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006). **94**
- Figura 12.** Análisis de coordenadas principales a partir de datos moleculares obtenidos de la lectura de productos de amplificación AFLPs de pasto llorón (progenitores y progenie) con algunas de las combinaciones de primers ensayadas (P37-M43; P40-M38; P40-M43; P40-M45), haciendo uso del programa estadístico GenAEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006). **95**
- Figura 13.** Dendrograma UPGMA generado a partir de la matriz de distancia genética binaria utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013) con las plantas progenitoras y la progenie de pasto llorón y utilizando los marcadores de AFLPs polimórficos. Se observa la formación de cinco grupos. **97**
- Figura 14.** Análisis de componentes principales para los individuos parentales (51=Tanganyika y 52=OTA-S) y su progenie utilizando 9 variables morfológicas (Infostat, Di Rienzo et al., 2013). **104**
- Figura 15.** Dendrograma que muestra el análisis de agrupamiento basado en UPGMA a partir de la distancia euclídea (correlación cofenética 0,891) basado en datos morfológicos. Se utilizó el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013). **107**
- Figura 16.** Correlación entre matrices de distancia genética y morfológica (Test de Mantel, $r=0,017$ y $P=0,338$, programa estadístico GenAEx 6.4, Peakall y Smouse, 2006). **108**

Figura 17. Distribución de la frecuencia del coeficiente de correlación “r” obtenidas por permutaciones aleatorias (999), se marca en rojo el valor de correlación observado a partir de las matrices originales. Usando del programa estadístico GenAlEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006). **109**

LISTADO DE FIGURAS CAPITULO 2

- Figura 1.** Área cultivada con cultivos GM Biotech en 2013, por país, superficie en el mundo sembrada 175,2 millones de hectáreas. Fuente: ISAAA. **117**
- Figura 2.** Esquema de las diferentes etapas necesarias para la obtención de una plantas transgénicas (Modificado Brasileiro y Carneiro, 1998). **122**
- Figura 3.** Micrografía electrónica de barrido de células de *A. tumefaciens* dispuestas sobre una superficie vegetal con diferentes amplificaciones (A y B). **127**
- Figura 4.** Tumores de *Agrobacterium* en los tallos. **128**
- Figura 5.** Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (modificado de Tzfira, 2004). **132**
- Figura 6.** Esquema de trabajo para transgénesis. **138**
- Figura 7.** Cassette de expresión de los genes *gus* y *bar* en el plásmido pPZP201-BUGI. **141**
- Figura 8.** PCR de *A. tumefaciens* cepa AGL0 transformada con vector binario pPZP201BUGI, utilizando primers específicos para fragmentos internos del gen *uidA*. 1- control positivo, 2- control negativo, 3- AGL0 transformada que contiene el pPZP201BUGI, 4 y 5- no transformadas. **150**
- Figura 9.** Ensayo histoquímico de GUS se muestra A)y B) Gus positivo en el cultivar Morpa. **152**
- Figura 10.** Ensayo 10 de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, se muestra en A).callos a partir de semillas maduras heridas, B). regeneración. **154**
- Figura 11.** Ensayo 10 de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, se muestra la selección con 3,5mgr/l de fosfinotricina . **156**
- Figura 12.** Embriones de pasto llorón cultivar Tanganyika, A) embrión normal uniembrionado, B) Embrión múltiple o poliembrionía. **157**
- Figura 13.** Curva de respuesta al agente selectivo fosfinotricina en *E. curvula* var. Tanganyika a los A.10 días, B.20 días, C.30 días porcentaje de supervivencia en control 0mgr/lit y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/lit, 1,00 mgr/lit, 2,00 mgr/lit, 2,50 mgr/lit, **159**

3,50 mgr/lt, 4,00 mgr/lt, 6,00 mgr/lt y 8,00 mgr/lt. **165**

Figura 14. Curva de respuesta al agente selectivo fosfotricina en *E. curvula* var. Tanganyika a los D. 40 días, E. 50 días, F. 60 días porcentaje de supervivencia en control 0mgr/lt y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/lt, 1,00 mgr/lt, 2,00 mgr/lt, 2,50 mgr/lt, 3,50 mgr/lt, 4,00 mgr/lt, 6,00 mgr/lt y 8,00 mgr/lt. **166**

Figura 15. Curva de sensibilidad al agente selectivo fosfotricina en *E. curvula* var. Kromdraai a los A.10 días, B.20 días, C.30 días, porcentaje de supervivencia en control 0mgr/lt y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/lt, 1,00 mgr/lt, 2,00 mgr/lt, 2,50 mgr/lt, 3,50 mgr/lt, 4,00 mgr/lt, 6,00 mgr/lt y 8,00 mgr/lt. **167**

Figura 16. Curva de sensibilidad al agente selectivo fosfotricina en *E. curvula* var. Kromdraai a los D.40 días, E.50 días, F.60 días, porcentaje de supervivencia en control 0mgr/lt y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/lt, 1,00 mgr/lt, 2,00 mgr/lt, 2,50 mgr/lt, 3,50 mgr/lt, 4,00 mgr/lt, 6,00 mgr/lt y 8,00 mgr/lt. **168**

INTRODUCCIÓN

Las pasturas forrajeras contribuyen a sostener los sistemas agrícolas que representan la base de la mayoría de las economías mundiales. En este sentido, estas pasturas son consideradas como commodities, ya que su valor es medido en forma indirecta a través del costo de la producción ganadera. De esta forma, el mejoramiento de estas pasturas se encuentra enfocado en la alimentación del ganado e incluye como objetivos el aumento de la producción de biomasa y de diferentes parámetros forrajeros (Wilkins y Humphreys, 2003; Wang et al., 2001). Muchas de estas pasturas se reproducen por apomixis, donde la producción de semillas ocurre sin fusión de gametos, resultando por generaciones, en descendencia que genéticamente, es copia fiel del progenitor materno. Este tipo de propagación asexual representa un interesante mecanismo para la explotación directa de la heterosis. La apomixis es relativamente común entre las gramíneas C4 de la subfamilia Panicoideae, incluidas varias gramíneas tropicales de importancia económica como forrajeras. Entre los géneros en que se encuentra este tipo de reproducción podemos mencionar a *Bothriochloa*, *Bouteloua*, *Brachiaria*, *Callipedium*, *Cenchrus*, *Dischantium*, *Eragrostis*, *Hyparrhenia*, *Melinis*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Tripsacum*, *Chloris* y *Urochloa*, entre otras (Quero Carrillo et al. 2010). Desde hace varias décadas, ha habido interés en el mejoramiento genético de especies forrajeras apomícticas. Sin embargo, la hibridación y recombinación genética se ha visto dificultada por la reproducción apomíctica y por las diferencias de ploidía que normalmente se observan en los complejos apomícticos. Casi todos los cultivares existentes en las especies mencionadas son "líneas" apomícticas (clones) seleccionadas sin modificación genética alguna a partir de colecciones de germoplasma natural. Donde existe la reproducción sexual en una especie apomíctica o en una especie cercana, el fitomejoramiento se vuelve más factible. Es común encontrar en una especie o en un grupo de especies cercanas, reproducción sexual en biotipos diploides y reproducción apomíctica en los poliploides. El control genético del tipo de reproducción es monofactorial y, en principio, fácil de manipular, si bien en los últimos años se ha encontrado un componente epigenético que podría, en cierta medida presentar algunas dificultades. Los esquemas convencionales de fitomejoramiento, desarrollados para especies de reproducción sexual, tienen que ser modificados para aprovechar las ventajas naturales que ofrece la apomixis. Los esquemas de fitomejoramiento para especies apomícticas tienen que lograr dos objetivos básicos: i)

acumular ganancias genéticas a través de generaciones y ii) aumentar, con ciclos de selección, la expresión de la heterosis en "líneas" apomícticas mejoradas.

La apomixis

A fin modo introductorio haremos una breve descripción de este peculiar modo reproductivo que incide en el mejoramiento de estas especies. Apomixis (Apo: sin; mixis: mezcla), es la reproducción clonal a partir de semillas que perpetúa la composición genética de una planta o de grupos de individuos (Nogler, 1994). Este tipo de reproducción ha aparecido en la naturaleza de diferentes formas, cuyos mecanismos se comparan con los involucrados en la reproducción sexual en la **Fig. 1**.

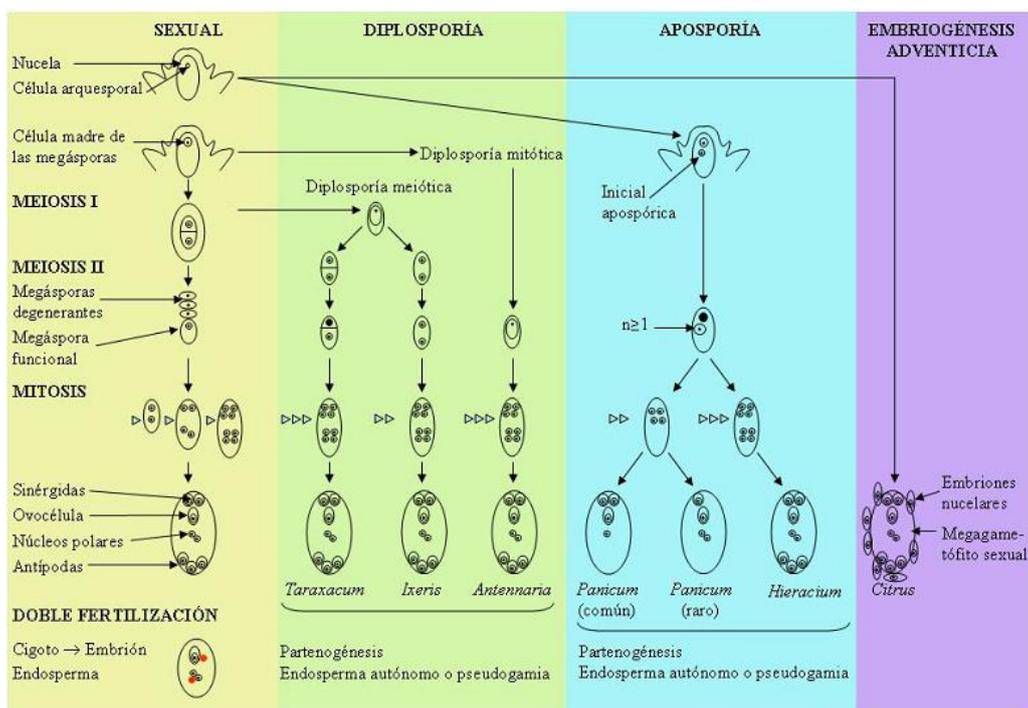


Figura 1. Comparación de los mecanismos de reproducción sexual y apomíctica (diplosporía, aposporía y embriogénesis adventicia en plantas, Adaptado de Koltunow, 1993).

La apomixis gametofítica se desencadena tempranamente en relación al proceso de desarrollo del óvulo, formándose un saco embrionario sin reducir a partir del cual se origina

el embrión (Nogler, 1984; Koltunov, 1993). La embrionía adventicia se inicia tardíamente en relación al desarrollo del óvulo y el embrión se genera a partir de una célula externa al gametofito. No hay en este caso alternancia de generaciones, por lo que a este tipo de apomixis se la denomina esporofítica (Nogler, 1984; Asker y Jerling, 1992). En la apomixis diplospórica el saco embrionario se forma a partir de una célula madre de las megásporas, no reducida, como ocurre en los géneros *Paspalum*, *Tripsacum*, *Eragrostis*, *Elymus*, etc., a diferencia de la apomixis apospórica, donde el saco embrionario se forma a partir de una célula somática de la nucela, como ocurre en *Panicum*, *Paspalum*, *Brachiaria*, *Bouteloua*, *Cenchrus*, *Pennisetum*, etc.

En ninguno de esos casos ocurre meiosis ni fecundación, lo cual da origen a verdaderos embriones somáticos, de manera que la progenie de una planta apomíctica será de constitución genética idéntica a la de la planta madre (Koltunow et al., 1995). Pese a que en la apomixis la formación del embrión ocurre sin fecundación, el desarrollo del endosperma puede ser autónomo o no. La pseudogamia, es decir la necesidad de polinización para el desarrollo del endosperma, es predominante entre las Poáceas, mientras que el desarrollo autónomo del endosperma lo es en las Compuestas (Richards, 1986).

La apomixis gametofítica está relacionada con la poliploidía y aparece en complejos agámicos, donde hay genotipos de bajos niveles de ploidía (usualmente diploides) que se reproducen por sexualidad y otros, de mayores niveles de ploidía (tri, tetra, pentaploides, etc.), que se reproducen por apomixis (Ortiz y Pessino, 2002; Ortiz et al., 2004).

El mejoramiento de especies apomícticas

La heterosis resulta de la interacción positiva interalélica en un organismo híbrido (heterocigoto), dando una productividad del híbrido mayor que la de los parentales. La heterosis es un fenómeno biológico que el ser humano ha explotado deliberadamente para aumentar la productividad de sus actividades agrícolas y pecuarias desde hace más de un siglo (Darwin, 1875; Shull 1909). Sin embargo, el vigor y la uniformidad de los híbridos se pierde en las generaciones siguientes de reproducción sexual. La reproducción asexual en cambio, da como resultado la propagación sin modificación de cualquier genotipo, aunque sea altamente heterocigoto. Esta propiedad de la propagación asexual sugiere que sería

un mecanismo muy apropiado para la explotación directa de la heterosis, resultado de genotipos altamente heterocigotos, sin necesidad del mantenimiento de líneas parentales y la formación cada año de semilla híbrida por polinización cruzada, como ocurre en especies propagadas sexualmente [por ej., el maíz (*Zea mays* L.)].

La apomixis representa una herramienta valiosa para la selección de individuos ampliamente adaptados a condiciones ambientales dinámicas y como promotora de la perpetuación y dominancia de los genotipos híbridos de mayor aptitud a dichas condiciones. La dinámica evolutiva es muy activa en los centros de origen de especie, donde se ha demostrado un intenso flujo genético entre los diversos niveles de ploidía (Savidan y Pernés, 1982; de Wet, 1968). En los centros de origen de las especies se encuentran individuos diploides, euploides, siendo el tetraploide el de mayor abundancia, e individuos aneuploides resultado de la dinámica del flujo genético. Esta dinámica reproductiva ocurre mediante la presencia cíclica de cruzamientos entre individuos con diferentes niveles de ploidía (Harlan y de Wet, 1975; de Wet, 1968; de Wet y Stalker , 1974). Estas formas de recombinar de las plantas apomícticas, mediante ciclos diploide-tetraploide-diploide, e identificados inicialmente en *Botriochloa* (de Wet , 1968) y posteriormente en *Panicum máximum* Jacq. (Savidan y Pernés, 1982), ha sido informada en géneros como *Brachiaria* (de Wet, 1986). En los centros de origen también se produce la conformación de complejos agámicos (CA), muchas especies apomícticas consideradas como diferentes y aisladas reproductivamente, se integran en un CA, en donde la única barrera para lograr hibridación es la presencia de apomixis y poliploidía. Al superar estas barreras mediante estrategias reconocidas, es posible ampliar la base genética para la producción de híbridos que responden a las necesidades detectadas. En este sentido la hibridación intergenérica entre géneros de diversas especies es una alternativa viable dado que estos géneros funcionan como “puentes” para lograr la hibridación.

En las especies apomícticas, las plantas sexuales se encuentran en baja frecuencia y normalmente poseen menor vigor que los individuos apomícticos (Hanna y Bashaw, 1987). Esta asociación de poliploidia y vigor, confiere a estas especies mayor aptitud para sobrevivir y producir en condiciones ambientales limitantes (Quero Carrillo et al., 2010).

La producción de híbridos de especies apomícticas no es un proceso costoso, ni difícil y permite la obtención de recursos genéticos adecuados para la producción de híbridos

destacados para la producción en pastoreo respetuosa del ecosistema (Quero Carrillo et al., 2010). Sin embargo, muchas veces sucede que cuando se encuentra sexualidad en especies predominantemente apomícticas, hay por lo general una diferencia en ploidía entre las plantas sexuales (normalmente diploides) y las apomícticas (poliploides), lo cual hace imposible la generación de híbridos fértiles (por ej. Hacker, 1988). De hecho, casi todos los cultivares existentes en las especies apomícticas son "líneas" (clones) apomícticas seleccionadas directamente y sin modificación a partir de colecciones de germoplasma natural. Sin embargo, la apomixis nunca es del todo obligada, aún en especies donde predomina (Savidan, 2000). Un patrón muy común es encontrar en un grupo de especies cercanas (el llamado "complejo agámico") la reproducción sexual en las especies diploides y reproducción apomíctica en las poliploides. De hecho, en la naturaleza hay fuertes evidencias de recombinación genética entre los diferentes niveles de ploidía (Savidan y Pernès 1982). La apomixis no es, como se creía anteriormente, "un callejón sin salida de la evolución" (Darlington, 1939). La tarea resultaba ser entonces, el descubrir – o crear – plantas sexuales con el mismo número cromosómico que las plantas apomícticas, en la misma especie o en especies filogenéticamente cercanas.

Para los pastos bahía, guinea y las braquiarias, se crearon plantas sexuales tetraploidizadas artificialmente a partir de germoplasma diploide sexual natural (Bahía: Forbes y Burton 1961; guinea: Savidan, 1975; braquiaria: Swenne et al. 1981). Para el búfel, el germoplasma tetraploide sexual probablemente derivó del clon B-1s, una planta "fuera de tipo" originalmente estudiada por Bashaw y colaboradores (Bashaw, 1962). Mediante inspección citológica se identificaron cinco clones tetraploides y totalmente sexuales (Sherwood et al. 1994).

Comenzando con las investigaciones de Savidan en los años '70s, sobre la herencia de apomixis en el pasto guinea se empezaron a aplicar metodologías citológicas al estudio de la genética de la apomixis en las gramíneas forrajeras tropicales, lo que fue fundamental para corregir algunos resultados erróneos publicados anteriormente, basados en la determinación del tipo de reproducción por pruebas de progenie. Hasta la fecha, se puede concluir que la apomixis en todas las gramíneas forrajeras tropicales de mayor importancia económica es controlada por un solo factor mendeliano dominante (bahía: Martínez et al. 2001; búfel: Sherwood et al. 1994; guinea: Savidan 1983; *B. decumbens* y *B. brizantha*: Valle y Savidan, 1996; *B. humidicola*: Valle et al., 2008). Este resultado es de suma

importancia en el planteo de trabajos de mejora genética en estas especies de gramíneas C4, ya que permite manipular, de manera ordenada y predecible, el modo reproductivo, tanto la sexualidad (para lograr la recombinación de caracteres) como la apomixis (para fijarlos) (Miles y Valle, 1996; Savidan, 2000; Miles, 2007). No obstante ello, el sistema de apomixis parece ser más complejo de lo que se creía, teniendo un fuerte componente epigenético (Olmedo – Monfil et al., 2011).

Los pasos básicos de un programa de mejoramiento genético para especies apomícticas son:

- a) Recolección de materiales genéticos, preferentemente si se encuentran disponibles en el centro de origen de especie.
- b) Caracterización morfológica y citológica de las poblaciones (identificación de individuos diploides y poliploides).
- c) Determinación del modo reproductivo de los individuos de la colección.
- d) Identificación de individuos sexuales poliploides.
- e) Realización de cruzamientos con objetivos bien definidos.
- f) Evaluación agronómica de los materiales obtenidos.

Desarrollo de cultivares apomícticos

A través de la apomixis obligada es posible desarrollar cultivares clonales (por ej., como con *Cenchrus ciliaris*) y en general suele haber una relación positiva entre la productividad de un clon y su nivel de heterocigosis. Por lo tanto, es deseable desarrollar fuentes de variabilidad genética para maximizar la productividad dentro de la población y este es un desafío continuo para los mejoradores de cultivos apomícticos. Sin embargo, el medio más común para producir variación genética y/o aumento de la heterocigosis es a través de la reproducción sexual o hibridación. En el desarrollo de cultivares apomícticos es importante que algunas semillas puedan ser producidas por vía sexual para que este tipo de variación pueda ser explotado.

Hay básicamente dos métodos de producción de cultivares apomícticos:

- 1) La autofecundación de un clon sexual puede producir un segregante S1 (altamente heterocigótico) y la progenie obtenida puede ser “sexual” o “apomíctica”; si es apomíctico obligado tiene potencial para ser cultivar clonal.
- 2) Realizar un cruzamiento entre un clon sexual con un clon apomíctico, que puede producir una “F1”. La progenie segregante puede resultar en clones sexuales o apomícticos; seleccionando los apomícticos obligados tendremos nuevos potenciales cultivares.

En método se ilustra en la **Fig. 2**. Naturalmente un esquema de mejoramiento puede usar una combinación de ambos métodos de autofecundación y cruzamientos. En muchos casos se han desarrollado clones por autofecundación para lograr algún grado de consanguinidad. Esto tiene como objetivo reducir la frecuencia de alelos deletéreos. A continuación el cruzamiento de líneas endogámicas parciales permite el desarrollo de cultivares apomícticos.

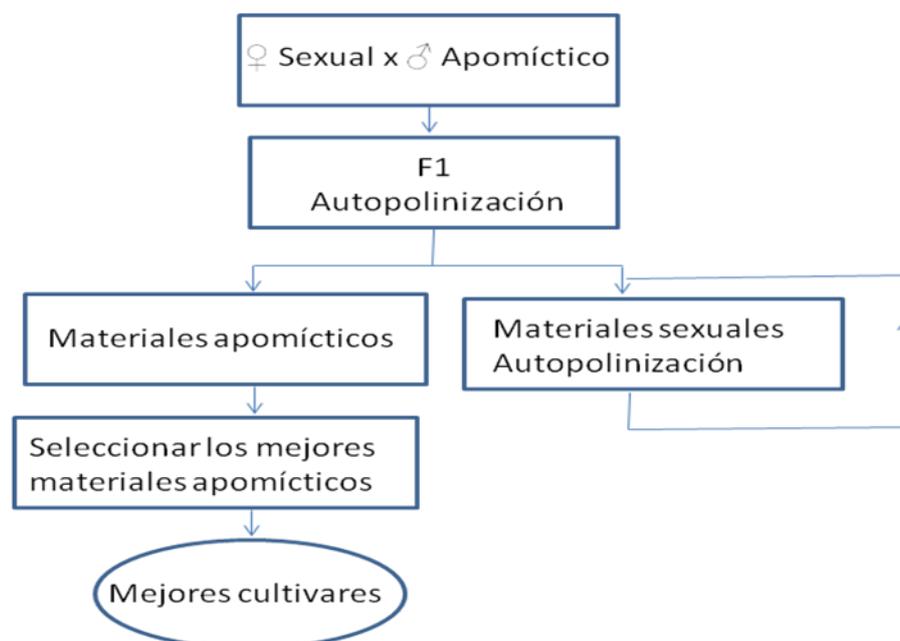


Figura 2. Esquema de un protocolo para el desarrollo de cultivares de especies apomícticas (Adaptada de Brown et al., 2014).

Una vez identificados los materiales apomícticos deben seleccionarse las líneas más adaptadas a través de repetidas rondas de evaluación en diferentes años y ambientes (Brown et al., 2014).

El hallazgo de genotipos sexuales ha posibilitado el desarrollo de estrategias para la manipulación de la apomixis a través de la hibridación en especies apomícticas. En *Cenchrus ciliaris*, el descubrimiento de una planta sexual hizo posible el desarrollo de un programa de mejoramiento con cruzamientos y dilucidación del tipo de herencia de la apomixis en esta especie (Taliaferro y Bashaw, 1966). En el CA *Cenchrus-Pennisetum* el vigor de los híbridos $2n+n$ recuperados fue muy bueno (Bashaw y Hignight, 1990; Hussey et al., 1993). Otro ejemplo lo constituyen los híbridos $2n + n$ de *Dischanthium annulatum* (Forssk.) Stapf. y *Botriochloa* (Harlan et al., 1975; Harlan et al., 1964). En *Paspalum notatum* Flugge, la progenie de cruza entre individuos sexuales y apomícticos obligados o facultativos mostró una proporción de 4:1 apomíctico (facultativo + apomictico obligado) y sexual, mientras que los cruzamientos entre materiales sexuales y apomícticos facultativos solamente mostraron una proporción de 8:1 (sexual + apomíctico facultativo) y apomíctico obligado (Acuña et al, 2009). Los híbridos heteróticos tetraploides presentaron una proporción de 4,6:1 de híbridos apomicticos y sexuales. Solamente el 3% de la progenie fue clasificada como altamente apomíctica (Acuña et al., 2011).

En *Panicum maximun* Jacq., el cruzamiento de híbridos apomíctico x apomíctico ambos tetraploides facultativos (40%), segregaron en una proporción 1:3 (siendo los híbridos apomícticos 3 veces más numerosos que los sexuales), (Savidan, 1985).

Aportes de la biotecnología

Si bien las técnicas convencionales han contribuido sustancialmente al mejoramiento de las especies forrajeras, la aplicación de diferentes biotecnologías en los últimos años ha redundado en importantes progresos, especialmente en lo que se refiere a calidad de forraje (Díaz, 2006). Metodologías tales como el cultivo de tejidos *per se*, la variación somaclonal, la hibridación somática y la transformación han permitido ampliar la variabilidad genética, los marcadores moleculares han demostrado ser de utilidad para seleccionar caracteres agronómicos complejos y, más recientemente, la genómica ha significado un gran avance hacia la identificación de genes de interés para los cultivos

forrajeros. La conjunción de estas biotecnologías, fundamentalmente la tecnología génica, los marcadores moleculares, la genómica y la bioinformática han revolucionado el mejoramiento genético vegetal dando origen a lo que se denomina mejoramiento molecular, conduciendo al desarrollo de nuevos y promisorios cultivares (Spangenberg et al., 2010).

Especialmente para especies apomícticas estas herramientas son muy atractivas, pudiendo complementar las metodologías convencionales mencionadas más arriba. En especies forrajeras la biotecnología ha complementado programas de mejoramiento, especialmente en lo referido al incremento de la calidad del forraje, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y manipulación del crecimiento y desarrollo.

Se han desarrollado sistemas eficientes de regeneración de plantas a partir de órganos, tejidos y células para un amplio rango de especies forrajeras. Esto brinda la posibilidad de aplicación a otros procesos biotecnológicos, como la micropropagación, la obtención de variantes somaclonales, de plantas transgénicas y de plantas haploides duplicadas. En general, los embriones, semillas e inflorescencias son muy utilizados para la inducción de callo. Las dos primeras fuentes de explanto tienen la ventaja de encontrarse disponibles durante todo el año, pero tanto estos como las inflorescencias de especies de reproducción sexual segregan y no son clones de individuos destacados. 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 utilizado 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). En pasto llorón Díaz (2006) analizó cuatro fuentes diferentes de explanto de pasto llorón (inflorescencias inmaduras, embriones, semillas y base de hojas), en tres genotipos, dos cultivares apomícticos obligados (Morpa y Don Pablo) y uno apomíctico facultativo (Kromdraai). Se pudo determinar que las inflorescencias representan el mejor explanto para inducir la formación de callos embriogénicos en los tres cultivares. A partir de callos del cv. Kromdraai se iniciaron suspensiones celulares a las que se les analizó el potencial morfogénico a lo largo de los subcultivos, observándose una disminución del mismo luego de los cuatro meses de comenzado el cultivo. Debido a esto y, considerando que el cultivo

de suspensiones celulares resulta costoso, demanda mucho tiempo y que períodos prolongados de cultivo *in vitro* pueden generar cambios genéticos se propuso al cultivo inflorescencias y a los callos obtenidos a partir de las mismas como tejido blanco para los experimentos de transformación por el método biolístico.

Estos métodos de cultivo *in vitro* han permitido explotar la variación somaclonal como método para generar variabilidad. La misma puede surgir de la variación preexistente en las células del explanto o inducirse durante el proceso de cultivo (Larkin y Scowcroft, 1981; Kaeppler et al., 2000). Esta variación se manifiesta a varios niveles, citológico, bioquímico, molecular, morfológico y fenológico. 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-Molenaar et al., 1988) y *Festuca pratense* (Vallés et al., 1993), cambios en la morfología de 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 propios 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). A partir de esta técnica pudieron registrarse tres materiales de pasto llorón descritos por primera vez por Polci (2000).

Los protocolos de cultivo de tejidos también dieron base a los primeros métodos de 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* (Boisson-Dernier et al., 2001; Kim et al., 2001) representan los métodos más utilizados en gramíneas y leguminosas, respectivamente. Sin embargo, actualmente es posible transformar establemente gramíneas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como *Festuca* (Gao et al., 2009; Gao et al. 2008; Wang y Ge, 2005; Dong y Qu, 2005; Bettany et al., 2003); *Hordeum vulgare* (Holme et al., 2008; Barlett et al., 2008; Fang et al., 2002; Trifonova et al., 2001; Matthews et al., 2001; Wang et al., 2001; Wu et al., 1998; Tingay et al., 1997); *Lolium* (Ge et al., 2007; Wu et al., 2007; Bajaj et al., 2006; Sato y Takamizo, 2006; Wu et al., 2005;

Bettany et al., 2003); *Sorgo* (Kumar et al. 2011; Nguyen et al., 2007; Howe et al., 2006; Gao et al., 2005; Zhao et al., 2000); *Poa* (Zhang et al., 2010); Trigo (He et al., 2010; Ding et al., 2009; Zale et al., 2009; Wu et al., 2008; Cheng et al., 2003; Wu et al., 2003; Hu et al., 2003; Sparks et al., 2003; Khanna y Daggard 2003; Sawahel y Hassan 2002; Weir et al., 2001; Cheng et al., 1997); *Panicum virgatum* (Xi et al., 2009; Someleva, 2002); Maíz (Du et al., 2010; Huang y Wei, 2005; Frame et al., 2002; Gordon-Kamm et al., 2002; Zhao et al., 2001; Cheng y Fry 2000; Negrotto et al., 2000; Ishida et al., 1996); *Secale cereale* (Popelka y Alpeter, 2003); *Cynodon* (Li et al., 2005; Hu et al., 2005; Salehi et al., 2005; Wang y Ge 2005); Zoysiagrass (Ge et al., 2006; Toyama et al., 2003); *Agrostis* (Fu et al., 2005; Han et al., 2005; Wang y Ge 2005; Chai et al., 2004; Luo et al., 2004; Yu et al., 2000).

Entre los caracteres “blanco” para el mejoramiento a través de esta tecnología se incluyen la calidad de forraje, la resistencia a plagas, enfermedades y estreses abióticos y la manipulación del crecimiento y desarrollo.

En cuanto a los marcadores moleculares, los polimorfismos amplificados al azar (RAPDs) fueron los primeros utilizados en forrajeras (Williams et al., 1990). Hace aproximadamente 20 años los más usados fueron los polimorfismos basados en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) y los polimorfismos en las secuencias simples repetidas (SSRPs) (Vos et al., 1995). Sin embargo, en la actualidad, han adquirido gran difusión los marcadores basados en el polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs). Entre los objetivos para su utilización se encuentran 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 (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 (Balfourier et al., 2000), para establecer relaciones filogenéticas en alfalfa (Campbell, 2000) y para 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 una 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., 2000; Kaló et al., 2000). Se mapearon varios genes y loci de caracteres cuantitativos (QTLs), 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 la apomixis (Pessino et al., 1999), respecto al mapeo comparativo específico de las especies apomícticas, los estudios de sintenia demostraron que la región determinante de la aposporia muestra homología en *Cenchrus ciliaris* con una región del grupo de ligamiento D de sorgo (Burrow et al., 2001), en *Brachiaria* sp. con el brazo corto del cromosoma 5 de maíz y 2 de arroz (Pessino et al., 1997 y 1998) y en *Paspalum simplex* con la región telomérica de los brazos largos de los cromosomas 2 y 12 de arroz (Pupilli et al., 2001 y 2004). Asimismo, por mapeo comparativo usando marcadores de RFLP se determinó la conservación de la región determinante de la aposporia en tres especies apomícticas de *Paspalum* (*P. simplex*, *P. notatum* y *P. malacophyllum*) (Pupilli et al., 2004). Un mapa genético completo a nivel diploide (citotipos sexuales), que comprende los 10 grupos de ligamiento básicos de *Paspalum notatum* ha sido generado con marcadores de RAPD, RFLP y AFLP (Ortiz et al., 2001). Asimismo, en *Cenchrus ciliaris* tetraploide apospórico se desarrolló una mapa genético preliminar basado en marcadores de RFLP (utilizando sondas homólogas y heterólogas) (Burrow et al., 2001), en *Panicum maximum* tetraploide apospórico se desarrolló un mapa en base a marcadores de RAPD y AFLP (Ebina et al., 2005).

Siendo la apomixis 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 ADN complementario (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).

Actualmente, las nuevas herramientas de genómica de gramíneas con la secuenciación de varias especies a través del genoma y transcriptoma. En *Paspalum dilatatum* Poir, se secuenció el transcriptoma utilizando plataformas de de secuenciación de segunda generación, se obtuvieron un total de 324.695 secuencias correspondientes a c. 102Mbp. Las secuencias fueron ensambladas generando 20.169 contigs con una longitud combinada de 9.336.138 nucleotidos. Estos estudios son importantes ya que el desarrollo de recursos genéticos y genómicos contribuirán al descubrimiento de genes y a estudios de expresión de los mismos; la asociación de genes con características agronómicas contribuirá significativamente al mejoramiento molecular (Giordano et al., 2014).

En *Eragrostis curvula*, de un total de 8.884 unigenes secuenciados a partir de bibliotecas derivados de inflorescencias , 112 (1,26%) mostraron expresión diferencial significativa en individuos con niveles de ploidia diferentes y/o modo reproductivo variable (Cervigni, 2008a); un total de 12.295 EST de elevada calidad se agruparon y ensamblaron, haciendo 8.864 unigenes, de los análisis realizados resultaron 254 EST-SSRs, 190 SNPs siendo recursos valiosos para la identificación de genes, mapeo genético, identificación de cultivares, análisis de diversidad genética, mapeo fenotípico y selección asistida por marcadores moleculares (Cervigni et al., 2008b). Estos SSR fueron adaptados para estudios de diversidad en *Panicum coloratum* (Armando, 2014).

Actualmente se utilizó la plataforma 454 de Roche para realizar un transcriptoma floral de referencia de pasto llorón. Las muestras fueron secuenciadas en el INDEAR (Instituto de Agrobiotecnología de Rosario, Rosario, Argentina). El número total de lecturas (reads) fue de 2.617.197, con un número total de 952.693.285 bp. La longitud promedio de las lecturas fue de 364,01 bp y se obtuvo un total de 49,568 contigs y 133.782 singletons. (Garbus et al., 2014). Se continúa trabajando con estos genes a fin de buscar diferencias por modo reproductivo y también buscar genes asociados a distintas vías metabólicas involucradas en calidad de forraje.

En otros aspectos el grupo de trabajo del CERZOS/UNS, en 1996 se estableció un protocolo de cultivo *in vitro* de pasto llorón a partir de inflorescencias (Echenique et al., 1996; Echenique et al., 2001). Utilizando este sistema se propuso incrementar la variabilidad genética del germoplasma de pasto llorón, lográndose avances mediante la obtención de variantes somaclonales Polci (2000). Se trabajó con varios cultivares de esta

gramínea apomíctica y luego de la evaluación de gran número de plantas (más de 600) se seleccionaron los siguientes materiales vegetales registrados:

1. Registro de Cultivares INASE. Pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees). Material: UNST1122 (Victoria) Establecimiento Creador: UNS – ACA. Investigadores creadores: Echenique, Viviana; Polci, Pablo; Cardone, Susana; Selva, Juan Pablo. RC9192. 2006-2026
2. Registro de Cultivares INASE. Pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees). Material: UNST1131 (Bahense). Establecimiento Creador: UNS – ACA. Investigadores creadores: Echenique, Viviana; Polci, Pablo; Cardone, Susana; Selva, Juan Pablo. RC9193. 2006-2026
3. Registro de Cultivares. INASE. Pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees). Material: UNST9446 (cv. Don Luis). Establecimiento Creador: UNS – ACA. Investigadores creadores: Polci, Pablo; Echenique, Viviana; Cardone, Susana; Selva, Juan Pablo, Zappacosta, Diego. RC9191. 2006-2026.

Los primeros dos fueron descritos por Cardone et al (2006) y utilizados para la identificación y caracterización de genes relacionados con la apomixis y los cambios de plodía (Mecchia et al., 2007; Cervigni et al., 2008 a y b; Ochogavía et al., 2009; Meier et al., 2011; Selva et al., 2012 y Zappacosta et al., 2014). A partir de las genotecas de cDNA de estas plantas se aislaron genes relacionados con calidad del forraje que podrán ser utilizados para manipular la cantidad o calidad de lignina en la especie (Díaz et al., 2010).

La especie objeto de este estudio, *Eragrostis curvula* (Schra.) Nees o pasto llorón

Eragrostis fue fundado como género por Wolf, siendo el más representado en las Eragrostideae, una tribu compuesta por 80 géneros y alrededor de 1000 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales y templado-cálidas de todo el mundo. El género *Eragrostis*, consta de más de 350 especies distribuidas especialmente en África, lo cual sugiere que ha tenido su origen en dicho continente, se tratan de plantas anuales o perennes, cespitosas, rara vez estoloníferas. La tribu no posee una agrupación natural sino que fue armada por conveniencia y *Eragrostis* en sí mismo es un grupo polifilético. La

naturaleza polifilética de *Eragrostis* fue confirmada por análisis de secuencias conservadas, ITS y trnL-F (Roodt-Wilding y Spies, 2006).

Entre las características del género se encuentra la presencia de inflorescencias en panojas amplias o contraídas, con espiguillas multifloras, rara vez unifloras, basítonas, con compresión lateral neta o poco evidente, cuyas glumas son caducas o persistentes, menores que el antecio basal, uninervadas (excepcionalmente trinervadas); la raquilla es articulada o tenaz y las lemmas son múticas, trinervadas; las flores tienen 1, 2, o más frecuentemente 3 estambres y el pistilo posee 2 estilos con estigmas plumosos; el cariopse tiene o no surco ventral y el escudete (relieve del embrión) es mayor que el tercio del largo de aquél, en tanto que el hilo es punctiforme.

Todas las especies de *Eragrostis*, excepto *E. walteri* (Voigt et al., 2004), poseen anatomía foliar con estructura Kranz características de las plantas con proceso fotosintético tipo Carbono 4, que es característica de varias especies de plantas herbáceas tropicales. La mayor concentración de especies se produce en Sudáfrica, de donde proviene el pasto llorón.

Existen varias especies de interés económico entre las que cabe mencionar a *E. tef* (Zucc.) Trotter “teff” especie originaria de Etiopía donde se la cultiva como cereal para la alimentación humana y forrajera. Su rápido crecimiento provee forraje más temprano. Otras especies que integran pastizales son *E. chloromelas* Steud. (“krulblaar o boer lovegrass”) y *E. lehmanniana* Nees. (“krietjiesgras o lehmann lovegrass”). Estas últimas son difíciles de separar de *E. curvula* debido a la existencia de híbridos con características intermedias. *E. curvula* (Schrad.) Nees. “pasto llorón o weeping lovegrass” es una especie forrajera que se destaca por su extraordinaria rusticidad, su capacidad para prosperar en suelos pobres en fertilidad y su aptitud para consolidar suelos erosionables, aún medanos (Covas, 1991).

La posición taxonómica del pasto llorón de acuerdo a la clasificación de Cronquist (1981) es la siguiente (Departamento de Agronomía de los Estados Unidos (<http://www.usda.gov>):

Reino Plantae (plantas)

Subreino Tracheobionta (plantas vasculares)

Superdivisión Spermatophyta (plantas con semilla)

Filo Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase Liliopsida (monocotiledóneas)

Subclase Commelinidae

Orden Cyperales

Familia Poaceae

Subfamilia Chloridoideae

Tribu Eragrostideae

Género *Eragrostis* von Wolf

Especie *Eragrostis curvula* (Schrader) Nees (weeping lovegrass) **Fig. 3.**



Figura 3. Detalles de la planta e inflorescencia de *E. curvula*. A, parte basal de la planta, B, inflorescencias; C, espiguilla; D, gluma inferior; E, gluma superior, F, antecio, G, lemma vista ventral; H-I, pálea; J, cariopsis, vista dorsal; K, cariopses, vista lateral (Nicora, 1998).

En Argentina se utiliza la clasificación de Engler y Diels (1936), donde la posición

Taxonómica del pasto llorón es la siguiente:

División Spermatophyta

Subdivisión Angiospermae

Clase Monocotyledonae

Orden Glumiflorales

Familia Poaceae (Gramineae)

Tribu Eragrostideae

Género *Eragrostis* von Wolf

Especie *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees (pasto llorón).

Tipos morfológicos

Cuando se piensa en *E. curvula* generalmente se lo asocia a cultivares tipo curvula “Ermelo” “Morpa” y “Tanganyika” (aludiendo a su carácter “llorón”). El tipo curvula es sólo una de las formas reconocibles dentro de un vasto conjunto de variantes morfológicas. Leigh (1961) fue el primero en proponer que *E. curvula* fuese agrupado en cinco tipos principales. Desde entonces se han sugerido tipos adicionales. En este trabajo se considerarán los tipos conferta y curvula, dado que se trabajará con materiales pertenecientes a estos tipos. Otros tipos que se describen y no han sido discutidos en este trabajo son robusta, lehman y chloromelas.

Conferta: se trata de plantas relativamente bajas (generalmente de 0,7 a 1 m de altura) con predominancia de hojas basales y panojas relativamente pequeñas y compactas. El tipo está representado por cultivares tales como A-84 y Catalina, en EE. UU. y Consol, en Australia. El tipo conferta ha sido reconocido como una variedad botánica, *E. curvula* var. Conferta Nees, y contiene tanto formas diploides ($2n=2x=20$) como tetraploides ($2n=4X=40$). Asumiendo que el mayormente poliploide complejo *E. curvula* deriva de progenitores diploides, pareciera que *E. curvula* var. Conferta representa uno de los fundadores del complejo. De esta forma, el tipo conferta parece tener cierta validez biológica. Los pastos tipo conferta pueden constituir una excelente fuente de persistencia y tolerancia a sequía, tanto en plántula como en planta adulta. La falta de adecuada resistencia a frío es un problema potencial del germoplasma conferta (Voigt, 1991).

Curvula: está constituido por plantas más altas que las del tipo conferta (1 a 1,5 m de altura), que poseen mayor cantidad de hojas que tallos. Las hojas son largas y angostas, dando a las plantas maduras la típica apariencia “llorona”. El tipo está representando por cultivares tales como Ermelo, Morpa y A-67. Los recuentos cromosómicos sugieren que el tipo curvula típico es tetraploide ($2n=4X=40$). Tanganyika es el genotipo más vigoroso y resistente a frío. Sin embargo, es menos resistente a sequía (Voigt, 1991).

Distribución geográfica

El pasto llorón se ha distribuido en todo el mundo por sus características como forrajera, fijadora de médanos en ambientes áridos y con suelos arenosos. A pesar de que es una forrajera originaria de Sudáfrica, las primeras introducciones en la Argentina tuvieron lugar desde los E.E. U.U., entre los años 1930 y 1941, cultivándose en las regiones semiáridas del centro de nuestro país. De acuerdo a Covas (1991) el área potencial de expansión del cultivo estimada para Argentina es de no menos de 5.000.000 de has., predominando los cultivares Tanganyika, Ermelo y, en menor medida, Don Pablo INTA. Si bien existen parcelas cultivadas con pasto llorón en las regiones semiáridas del país, que se extienden desde Jujuy hasta Rio Negro, el área de mayor concentración del cultivo corresponde al sector sombreado en el mapa de la **Fig. 4**, abarcando la casi totalidad de la provincia de San Luis, sur de la provincia de Córdoba, este de la provincia de La Pampa, y oeste de la provincia de Buenos Aires, correspondiendo a la Región 3 Centro Sur de Argentina; de acuerdo al Censo Nacional Agropecuario (INDEC; 2002) el área implantada en la Argentina es de 786.749 hectáreas, siendo cinco provincias las que presentaron mayor superficie implantada, La Pampa (300.708,5 Has), San Luis (274.401,3 Has), Buenos Aires (136.571,2 Has), Córdoba (71.503,5 Has), Jujuy (2.448,2 Has) y las provincias que presentaron menor superficie Chubut, La Rioja, Neuquen, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca, Salta, Santa Fé, Rio Negro y Mendoza la superficie oscilo entre 0,5 - 425 Has implantadas de pasto llorón. Su adaptación y distribución junto con otras pasturas tropicales como *Digitaria eriantha*, *Panicum coloratum* y *Anthehora pubecens* se muestra en la **Fig. 5**. Corresponde a la Región 3, la pampa subhúmeda/semiárida que se caracteriza por el clima templado, suelos arenosos y sueltos, y una precipitación inferior a los 800 mm (**Fig. 6**). Cabe señalar, asimismo, que el pasto llorón se ha naturalizado en el centro de la Argentina, siendo frecuente a la vera de caminos y en las adyacencias de cultivos (Covas, 1991; Stritzler et al., 1996; Gargano et al., 2001).

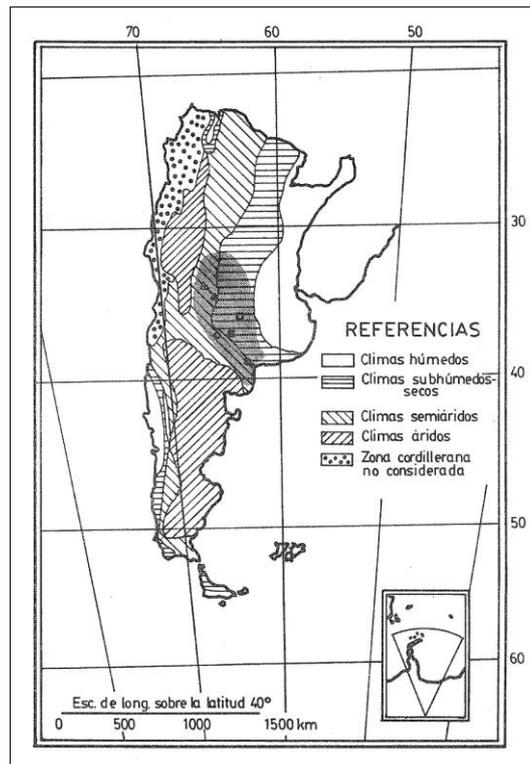


Figura 4. El área sombreada agregada al mapa de Burgos (1963), que representa el clima de las Regiones Áridas en la República Argentina, corresponde a la región de mayor difusión del pasto llorón en el país (Tomado de Covas, 1991).

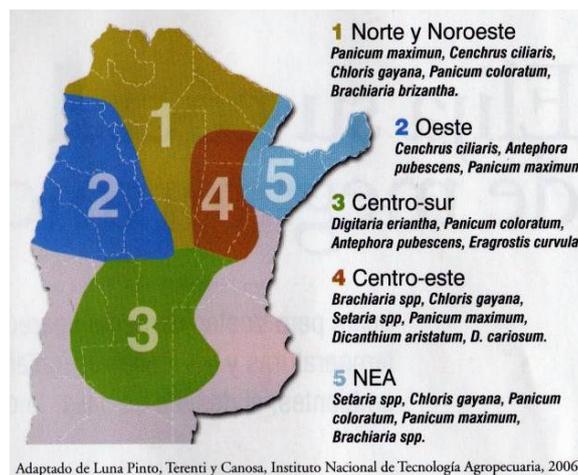


Figura 5. Regiones de Argentina donde se muestran las zonas de adaptación y distribución de las principales especies megatérmicas.

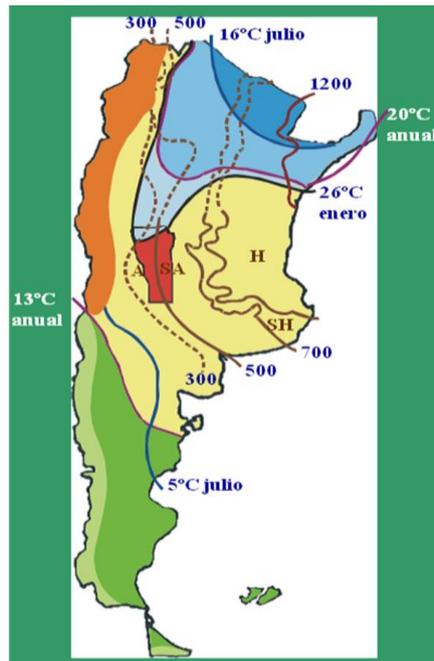


Figura 6. Isohietas (mm de lluvias promedio anual) e Isotermas (°C promedio del mes más frío y anual) de la República Argentina

Importancia

Es una pastura eficiente en la fotosíntesis y fijación de dióxido de carbono gracias a su metabolismo C4, lo cual se traduce en un uso más eficiente de los recursos si se compara con las especies C3 (**Tabla 1**). Se ha demostrado que incorpora considerable cantidad de materia orgánica y mejora la estructura del suelo. Es esencialmente estival y crece vigorosamente en forma cespitosa, aún con escasa humedad. Debido a su mayor eficiencia en el uso del agua le permite un mayor crecimiento y producción de biomasa durante su ciclo vegetativo, que duplica por lo menos la producción de una buena pastura natural, aumentando de esa forma la receptividad del campo, de manera que se podría afirmar que hay una relación directamente proporcional entre la superficie de pasto llorón de un campo y el incremento de la carga animal. Además, posee una rápida respuesta a la fertilización con nitrógeno, principalmente en las etapas tempranas del crecimiento vegetativo, adaptación a un amplio rango de suelos poco fértiles con un amplio rango de

pH, tolerancia a condiciones de sequía y temperaturas extremas, dada por una combinación de adaptaciones morfológicas y respuestas fisiológicas sumado a que soporta muy bien el pastoreo. Representa, por lo tanto, un aporte económico de magnitud para la producción agropecuaria. Puede sostener la producción del ganado en la región semiárida pampeana, ya que puede usarse como forraje no sólo en el verano sino también durante el invierno, gracias a su eficiente producción de biomasa. Si bien su crecimiento se reduce durante el invierno, su tolerancia a las bajas temperaturas y su hábito erecto de crecimiento sigue permitiendo su aprovechamiento por parte del ganado. Estas principales cualidades ha inducido a numerosos productores agropecuarios a utilizarlo en sus explotaciones, habiendo demostrado su valor no sólo para vacas de cría sino también para recría e invernada. Se lo utiliza para encierre nocturno de novillos que pastorean verdeos invernales y se corta para enfardar, especialmente en Estados Unidos de América y Sudáfrica. Es de buen valor nutritivo durante el rebrote y receptividad alta comparada con campos naturales de la región semiárida pampeana. Su gran agresividad le permite competir y controlar importantes malezas, como cebollín, sunchillo, gramón, abrepuño amarillo, roseta y flor amarilla. Siendo realmente importante el control de malezas durante la implantación debido a que el pasto llorón es de lento crecimiento inicial, en contraposición a las malezas anuales (Gargano, 1991).

Tabla 1. Comparación entre especies C₃ y C₄ en cuanto a eficiencia fotosintética, eficiencia en el uso del agua y de nitrógeno.

	C ₃	C ₄
Primer producto de la carboxiliación	Ácido fosfoglicérico	Ácido oxalacético
Enzima	RUBISCO	PEP-carboxilasa
Saturación de la luz (w.m ⁻²)	50-150	>500
Fotosíntesis	Se satura al 50% de la radiación solar	No muestra saturación
Apertura de estomas a la luz	Grande	Pequeña
Tasa de respiración	Alta	Baja
Fotorrespiración	15 - 30% del C fijado	Ausente
Efectos del O ₂	Inhibe la fijación de CO ₂	No hay inhibición
Temperatura óptima (°C)	15 – 20	30 – 47
Fotosíntesis máxima (mgCO ₂ .dm ₂ .h)	10 – 30	50 – 70
Punto de compensación fotosintética (ppm CO ₂)	30 – 70	0 – 10
Producción fotosintética (g/m ² .día)	20 – 30	40 – 50
Producción de MS (kg/ha)	22 ± 3	38 ± 17
Eficiencia en el uso del agua (kgH ₂ O ₂ /kgN)	20	50
Eficiencia en el uso del agua (kgH ₂ O ₂ /kgMS)	600	300

Entre las principales limitaciones del pasto llorón se encuentra su inaptitud como fuente de forraje invernal y su mediana calidad forrajera. Aún así hay variedades que se destacan por su resistencia al frío, conservando buena parte de sus cualidades durante en invierno, Sin embargo, la calidad forrajera al ser baja no cubre los requerimientos mínimos para el desarrollo normal del ganado (Covas, 1979; Covas, 1991; Stritzler et al., 1996; Gargano et al., 2001), ya que provee sólo el 50% del requerimiento diario para asegurar un desarrollo normal tanto en ganado de invernada como de cría. Por lo tanto, es necesario incorporar suplementos proteicos para asegurar los niveles necesarios para el desarrollo normal del ganado durante el invierno.

Antecedentes acerca del mejoramiento

El género *Eragrostis* se caracteriza por un número básico de $X=10$ cromosomas (Carnahan y Hill, 1961; Gould, 1968; Streetman, 1970; Christopher y Abraham, 1974; Jones et al., 1978). En el complejo *E. curvula* se han encontrado complementos cromosómicos que van desde el nivel diploide ($2n=2X=20$) hasta el octaploide ($2n=8X=80$) (Poverene y Curvetto, 1991). También se ha encontrado aneuploidía en el complejo, es decir, números cromosómicos que no son múltiplos del número básico, números anómalos: $2n= 41, 42, 62, 63, 69$ (De Winter, 1955; Pienaar, 1955; Leigh, 1960; Voigt y Burson, 1983).

Los diploides son infrecuentes y no se encuentran en todas los tipos de *Eragrostis curvula*. (Poverene y Voigt, 1997). Los diploides son siempre sexuales y auto-incompatibles (necesitan de polinización cruzada), mientras que los poliploides se reproducen por apomixis diplospórica y son auto-compatibles. Aunque muchas de las colecciones de Sudáfrica son totalmente apomícticas, algunas de las últimas colecciones fueron descritas como facultativas (Vorster y Liebenberg, 1977). El único informe de triploidía en el complejo de *E. curvula* proviene de Leigh (1960), para una planta que pertenece al tipo robusta. Luego, Vorster y Liebenberg (1977) informaron la existencia de una planta pentaploide. Mientras que el nivel heptaploide ($2n = 7x = 70$) es más frecuente, los números pares de poliploidía parecen ser más abundantes que los tipos de poliplodía impares en el complejo (Poverene, 1988). Es evidente que la persistencia de los poliploides debe ser debido a la reproducción apomíctica, pero la inestabilidad meiótica que les caracteriza representa necesariamente una desventaja adaptativa (Poverene y Curvetto, 1991). Varios estudios han encontrado aneuploides y la propagación de tales citotipos también es posible debido a la apomixis (De Winter, 1955; Leigh, 1960; Jones et al., 1978).

Poverene (1988) y Cardone et al., (2006) informaron la presencia de cromosomas sub-metacéntricos y metacéntricos con un tamaño promedio de 2 a 3 μm en *E. curvula*. Cromosomas meióticos examinados en anteras muestran principalmente bivalentes, pero polivalentes y univalentes también son comunes. Dentro de los polivalentes, tetravalentes eran las configuraciones más comunes. Plantas del cv. Tanganyika (tipo *curvula* $2n = 4x = 40$) mostraron una frecuencia alta de configuraciones múltiples. Las irregularidades fueron

mayores en las accesiones de niveles de ploidía más altos (Streetman, 1970; Vorster y Liebenberg, 1977). Poverene, (1988), en base a sus observaciones en el cv. Tanganyika (elevada frecuencia de configuraciones múltiples, presencia de puentes cromatínicos y frecuencia de cuadrivalentes en forma de anillo) postula la hipótesis de que se trata de un autopoliploide. Más recientemente, Cardone et al., (2006) analizando la meiosis de una planta tetraploide obtenida por duplicación cromosómica de un diploide -derivado de Tanganyika por cultivo *in vitro* de inflorescencias-, obtuvieron un promedio de 12.2 bivalentes, 3.1 cuadrivalentes, 0.8 trivalentes y 0.8 univalentes. Estos resultados apoyarían la hipótesis del origen autopoliploide del cv. Tanganyika. En especies de *Paspalum*, una baja frecuencia de tetravalentes en citotipos tetraploides ha sido considerado como el resultado de aloploidia segmentada (Quarin et al., 1996). Las alteraciones estructurales que se encuentran en *Eragrostis* también se consideran ser una indicación de aloploidia segmentada (Vorster y Liebenberg, 1977).

La viabilidad del polen evaluado en diferentes materiales vegetales y niveles de ploidia es elevada, con al menos 50% de granos de polen viables (Poverene 1988; Echenique y Polci 1994; Polci 2000). Este valor es típico de pastos pseudogamos y garantiza una producción de semillas normal. Las estimaciones de la viabilidad del polen confirmaron que ninguna de las accesiones fueron altamente estériles, a pesar de la alta frecuencia de anomalías meióticas observadas. Varios autores han intentado relacionar el número de cromosomas y las especies o tipos morfológicos que componen el complejo, pero los datos no son concluyentes. Cada una de las especies o tipos morfológicos incluye un número de diferentes citotipos. La variación intraespecífica en el número de cromosomas es muy común en pasturas (Quarin et al., 1982; Poverene, 1988; Keeler, 2004).

Todas las características mencionadas, fundamentalmente la apomixis y la poliploidía han determinado que el mejoramiento genético del pasto llorón se viera limitado, hasta hace poco años, a una selección dentro de ecotipos que aparecen espontáneamente en la naturaleza, ya que el tipo de reproducción representa una barrera para los métodos que involucran cruzamientos y obtención de descendencia por vía sexual. Sin embargo, estos cruzamientos ocurren naturalmente, aunque con baja frecuencia, lo cual explica los numerosos tipos intermedios encontrados dentro del complejo.

En consecuencia, la clasificación botánica de los materiales que componen el grupo ha sido dificultosa, lo que ha derivado en una considerable confusión entre cultivares y líneas que se hallan actualmente a disposición de productores, técnicos y mejoradores de pasto llorón. La apomixis puede conservar la variabilidad genética siempre y cuando se preserven las fuentes de germoplasma. Esta variación genética puede ser liberada a través de la utilización de formas sexuales y de la hibridación (Voigt, 1991). Como mencionara más arriba, el mayor potencial agronómico de la apomixis es la posibilidad de perpetuación y multiplicación de combinaciones híbridas por semillas, así como la fijación y mantenimiento de híbridos intergenéricos y/o interespecíficos que no sobrevivirían por esterilidad (Ortiz et al, 2005). El desarrollo de esquemas de hibridación entre plantas sexuales y algunos genotipos apomícticos fue un paso importante en el mejoramiento tradicional de características tales como producción, resistencia a sequía y frío, establecimiento, digestibilidad y otros rasgos agronómicamente deseables (Voigt et al., 1977).

Como mencionara más arriba, el grupo del CERZOS ha desarrollado tres materiales vegetales de pasto llorón utilizando variación somaclonal. Esto indica que es posible generar nuevos materiales utilizando herramientas biotecnológicas y también utilizando cruza convencionales. La conjunción de ambas metodologías se presenta como una alternativa válida para el mejoramiento de especies apomícticas.

Actualmente, los materiales disponibles en Argentina para mejoramiento se encuentran representados en una colección disponible en el CERZOS. La **Tabla 2** muestra los materiales disponibles actualmente, así como sus principales características. El banco de germoplasma de pasto llorón de INTA, ubicado en la localidad de Anguil, no se encuentra activo actualmente, ni tampoco el programa de mejoramiento.

Tabla 2. Genotipos de pasto llorón disponibles en la colección del CERZOS (2014).

Cultivar	Tipo Agronómico	Nivel de Ploidía	Modo Reproductivo
Tanganyika (2)	curvula	tetraploide	apomítico facultativo
Tanganyika (1, 4)	curvula	tetraploide	apomítico obligado
Ermelo (1, 5)	curvula	tetraploide	apomítico
Ermelo (2)	curvula	tetraploide	apomítico
Morpa (1, 7)	curvula	tetraploide	apomítico
Morpa (2)	curvula	tetraploide	apomítico
UNST1131 (3)	curvula	tetraploide	sexual
UNST1112 (3)	curvula	tetraploide	sexual
OTA-S (1, 6)	conferta	tetraploide	sexual
UNST1122 (3)	conferta (*)	diploide	sexual
Catalina	conferta	diploide, tetraploide	apomítico
Kromdraai	variable	variable (8)	apomítico
Don Walter (2)	conferta	tetraploide	apomítico
Don Pablo (2)	robusta azul	heptaploide	apomítico
Don Eduardo (2)	robusta verde	hexaploide	apomítico
Don Juan (2)	variable (9)	octoploide	apomítico

(*) El genotipo UNST1122 posee características morfológicas de tipo robusta y moleculares de tipo conferta (Zappacosta et al., 2011). (1) Enviado por USDA. (2) Enviado por INTA. (3) Del CERZOS-CONICET. (4) PI 234217. (5) PI 234217. (6) PI 57 4506. (7) PI 591632. (8) Nivel de ploidia variable tetraploide, hexaploide, heptaploide, octoploide (Poverene M. 1988). (9) Tipo Agronómico variable chloromelas, robusta o pilosa.

Como se mencionara previamente, el pasto llorón es un importante recurso para conservación de suelos y forraje en regiones semiáridas, ya que presenta estrategias de conservación de agua, tales como cera epicuticular y enrollamiento foliar, en respuesta a la sequía (Echenique et al., 1986a y b; Colom y Vazzana, 2002), mostrando buena capacidad de producir forraje en estas condiciones (Ruiz et al., 2008). Por otro lado, su capacidad de crecimiento foliar es relativamente insensible al desecamiento del suelo (Puliga et al., 1996). Sin embargo, las diferentes respuestas de estrés hídrico se han detectado entre otros tipos dentro del complejo incluyendo boer lovegrass (cv. Consol) y robusta, que son más resistentes que el tipo curvula (cv. Ermelo) (Colom y Vazzana, 2003). Estos autores informaron que durante la sequia el contenido relativo de agua (RWC) disminuyó un 65% en el cv. Ermelo y que el estrés causado por la sequía produjo disminuciones severas en las tasas fotosintéticas, mientras que el cv. Consol mostró baja variación de estos parámetros en las mismas condiciones. Echenique y Curvetto, (1986) encontraron resultados similares en materiales procedentes de Argentina. Por otro lado, Bálsamo et al.,

(2006) informaron una correlación entre tolerancia a la sequía de tres especies de *Eragrostis* y las propiedades de extensibilidad de las hojas (comportamiento durante el estrés mecánico). *E. curvula* (tolerante a la sequía) tuvo valores de resistencia a la tracción superiores a *E. tef* (moderadamente tolerante a la sequia) y *E. capensis* (no tolerante a la sequía). *E. curvula* tolera varias condiciones de suelo que son perjudiciales para otras especies, incluyendo pH extremos. Crece bien en suelos ácidos y lodos de minas a pH 4.0, así como en los suelos calcáreos con pH cercanos a 8.0. Se ha utilizado para la consolidación de suelos erosionables a través de la incorporación de materia orgánica (Taliaferro et al., 1975; Busso y Brevedan, 1991).

Gherbin et al., (2007) compararon 23 pasturas no-nativas junto con festuca alta (*Festuca arundinacea*, un pasto nativo en ambientes mediterráneos) por su capacidad de adaptación a las llanuras costeras del sur de Italia en términos de su productividad y la calidad nutricional. En el segundo año después del establecimiento, *E. curvula*, pastura perenne de clima cálido mostró los valores más elevados de producción de materia seca anual (21.1tha^{-1} MS). En Argentina, *E. curvula* es la pastura perenne que presenta mayor superficie cultivada (más de 700.000 hs), con un área potencial de cultivo estimada en más de 5 millones de hectáreas (Covas y Cairnie, 1985). El pasto llorón tiene una notable capacidad para la producción de forraje en ambientes no adecuados para la mayoría de las otras especies usadas para la alimentación de ganado. Esto podría atribuirse a las características mencionadas anteriormente, como su resistencia a la sequia, su capacidad para producir en suelos sueltos de baja fertilidad y su tolerancia al manejo escaso. Además, tiene excelente longevidad potencial que permite a la pastura ser considerada permanente (Covas, 1991).

En función de todo lo expuesto surge que los estreses abióticos ni los bióticos son la principal limitante para este pasto, sino que lo es la calidad de su forraje. Por ello este es el blanco que se debería considerar en programas de mejora.

Calidad del forraje

La calidad del forraje puede definirse en términos del rendimiento relativo que logran los animales cuando lo consumen *ad libitum* y depende de factores tales como su contenido de nutrientes, su consumo o tasa de consumo, su digestibilidad y de la distribución de los productos metabolizados dentro del animal (Buxton y Mertens, 1995). La digestibilidad de la materia seca representa la fracción del alimento ingerido que no se recobra en heces y que se asume utilizado por el animal para el mantenimiento de sus funciones vitales y productivas. Se estima *in vitro* por métodos químicos por la limitante, en costo y tiempo, que significa la utilización de animales. Varía entre especies y entre las distintas partes de la planta y está afectada por la edad de la misma y su estado fisiológico, por la fertilidad del suelo y por el ambiente en que la planta crece.

Las forrajeras de crecimiento estival, como *Eragrostis curvula*, son plantas de alta producción de pasto si se las compara con las forrajeras de clima templado. No obstante, la producción animal resulta inferior a lo esperado, debido a que, en general, las forrajeras de crecimiento estival presentan altos contenidos de fibra y bajos contenidos de proteína en sus tejidos cuando se las compara con forrajeras de clima templado. Esto se traduce en una disminución de la digestibilidad y en un rendimiento animal bajo (Wilson y Minson, 1980). En particular, en pasto llorón, se produce una brusca declinación de la digestibilidad a medida que se alcanza el estado reproductivo (encañazón), tendencia que no se modifica en rebrotes posteriores (Laborde, 1991). Del 35 al 80 % de la materia orgánica de los tejidos vegetales está contenida en las paredes celulares. Sin embargo, los rumiantes que dependen exclusivamente de las plantas consumidas en libre pastoreo obtienen sólo de un 30 a un 40 % de la energía disponible en la porción digestible de las mismas (Jung y Allen, 1995).

Las paredes celulares están compuestas principalmente por hemicelulosa, pectina, celulosa y lignina. Representan la fuente de energía para más de 1,4 billones de rumiantes. Estos producen el 70% de la proteína animal total consumida en el mundo y el 10% de las fibras naturales utilizadas por el hombre (Minson, 1990). Maximizar la energía obtenida de las paredes celulares de los forrajes resulta esencial para lograr una elevada producción animal.

La ganancia de peso o la producción de leche requieren de un elevado consumo de forraje y de una alta digestibilidad del mismo. A esto se suma la necesidad de una efectiva trituración por masticado y ruminación de las fibras y de una rápida digestión de las paredes celulares por parte de los microorganismos del rumen para dar pequeñas partículas que pasen rápidamente a través del mismo y sean efectivamente absorbidas. La pared celular está compuesta principalmente por polisacáridos de estructura y composición variable como xilosa, celulosa y hemicelulosa, lignina y proteína. Las ligninas de diferentes plantas, y aún aquellas provenientes de diferentes tejidos de una misma planta, pueden diferir en gran medida en el contenido y composición de los monolignoles que la constituyen (Halpin et al., 1994). Esta variabilidad está determinada y regulada, probablemente, por las diferentes actividades y afinidades de sustrato de las enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina de diferente origen (Higuchi, 1985), por las proporciones relativas de los tres constituyentes monoméricos, por los distintos tipos de uniones y por la ocurrencia de unidades fenólicas no convencionales dentro del polímero (Lapierre, 1993; Monties, 1985).

La organización estructural de los tejidos de las plantas o la anatomía de los órganos de las mismas afectan la absorción de los nutrientes debido a la mayor o menor facilidad con que permiten su ruptura en pequeñas partículas, a la naturaleza de estas y a la velocidad a la cual pasan a través del rumen. La anatomía foliar del pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees) corresponde a la de las forrajeras de origen subtropical (Leigh, 1960). Como tal presenta una baja proporción de mesófilo (tejido fácilmente digestible) y una elevada proporción de tejido vascular y epidérmico. Esta proporción aumenta a medida que la planta madura. Las vainas que envuelven a los haces, características de las plantas con alta tasa de fotosíntesis, son numerosas y altamente indigestibles en esta gramínea.

Desde los años 1950, se sabe que existen mutaciones que afectan la digestibilidad de ciertas especies vegetales. Las más conocidas son las *brown midrib (bmr)*, que provocan reducciones en el contenido y/o la calidad de la lignina en maíz, sorgo y mijo perla (Cherney et al., 1991). Se ha demostrado que una de estas mutaciones (*bm3*) se produce en el gen que codifica para la *o*-metil-transferasa (OMT), enzima involucrada en la vía biosintética de la lignina (Vignols et al., 1995). Por ello, una mayor digestibilidad ha sido asociada con un menor contenido de lignina. No obstante ello, existen evidencias de que la composición química de la lignina puede ser más importante que la cantidad en la

determinación de la digestibilidad de un forraje y que las diferencias en la composición química pueden explicar por qué la concentración de lignina no está correlacionada estrechamente con la digestibilidad en algunas especies (Gordon, 1975; Reeves, 1985 a y b). Por ello, en algunos casos, la concentración total de lignina no ha resultado ser un predictor muy confiable de la digestibilidad de la materia seca (Wilson, 1994).

Estudios previos en el laboratorio del CERZOS estuvieron dirigidos a aportar elementos para mejorar la calidad del forraje del pasto llorón, para lo cual inicialmente se abordó el estudio de algunos de los factores que se señalan como importantes para la digestibilidad de las forrajeras, como son la lignina y la sílice (Díaz, 2006). Este estudio permitió observar que, si bien ambos resultan relevantes, ninguno puede explicar por sí solo las diferencias en la digestibilidad de los genotipos analizados. A partir de los antecedentes existentes en la manipulación de la lignina en otras especies de forrajeras como *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* y *Medicago sativa*, se construyeron y analizaron genotecas de cDNA en las que se pudieron identificar tres de las enzimas involucradas en la biosíntesis de este polímero.

Dos de estas enzimas, la O-metiltransferasa del ácido cafeico (COMT) y la cafeoil CoA O-metiltransferasa (CCOMT), son consideradas clave para la manipulación tanto de la cantidad como de la calidad de la lignina. Los clones que portaban los fragmentos correspondientes a los genes para estas enzimas fueron separados y los fragmentos secuenciados completamente (Díaz et al., 2010). Estas secuencias se utilizaron para compararlas y establecer su homología con otras depositadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las mismas se utilizarán en el futuro en experimentos tendientes a manipular la vía de biosíntesis de lignina. Por ello, poner a punto un sistema de transformación de pasto llorón es clave para poder manipular el contenido o la calidad de la lignina del pasto llorón y mejorar así la calidad de su forraje.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de tesis fue contribuir al mejoramiento del pasto llorón a partir de dos estrategias. La primera consistió en la obtención de nuevos materiales híbridos a partir de cruzamientos entre materiales sexuales y apomícticos y evaluar sus características moleculares y agronómicas. Por otro lado, se intentó poner a punto un protocolo de transformación genética, basado en *Agrobacterium tumefaciens*, que permita contribuir al mejoramiento de la calidad del forraje por regulación negativa de la biosíntesis de lignina y que sea una herramienta para la validación de genes relacionados con el modo reproductivo.

HIPÓTESIS 1

El cruzamiento entre materiales sexuales y apomícticos de pasto llorón permitirá la obtención de híbridos con características interesantes desde el punto de vista del mejoramiento genético y permitirá la construcción de poblaciones de mapeo destinadas a la localización de genes y regiones genómicas que controlan la apomixis.

OBJETIVO 1.1

Obtener híbridos de pasto llorón a partir de cruzamientos entre progenitores sexuales y apomicticos a nivel tetraploide.

OBJETIVO 1.2

Evaluar caracteres morfológicos de importancia agronómica para seleccionar nuevos materiales a introducir en programas de mejora.

OBJETIVO 1.3

Determinar el nivel de variabilidad presente en la población de nuevas plantas generadas, se analizó utilizando marcadores moleculares de tipo AFLP.

HIPÓTESIS 2

Es posible transformar pasto llorón utilizando *Agrobacterium tumefaciens* a fin de incorporar nuevos caracteres, suprimir funciones o validar genes de interés.

OBJETIVO 2

Desarrollar un protocolo de transformación de pasto llorón mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para disponer de una herramienta para introducir o reprimir genes y también para validar genes, específicamente los relacionados con modo reproductivo.

CAPITULO 1

Obtención de nuevos materiales de pasto llorón por cruzamientos entre genotipos sexuales y apomícticos

INTRODUCCIÓN

El hombre ha manipulado los recursos genéticos de plantas y animales por miles de años, pero la ciencia de la genética y el mejoramiento de especies forrajeras por hibridación se desarrollaron recién a partir del siglo XX. En este contexto, y a fin de buscar soluciones para problemas relacionados con la producción, se han ido obteniendo nuevas variantes genéticas mediante cruces, dando origen a las variedades actuales. En el campo de las especies forrajeras, estos esfuerzos iniciales resultaron en el desarrollo de cultivares muy exitosos, tanto de leguminosas como de gramíneas para distintas regiones (Vogel y Sleper, 1994).

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, en las especies forrajeras los progresos han sido significativamente menores, especialmente en lo referido al rendimiento. 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 (Spangenberg et al., 2010).

A comienzos de 2009, en un informe que presentó el Secretario General de las Naciones Unidas a la Comisión de Población y Desarrollo durante su 42º período de sesiones, se expresa una opinión pormenorizada acerca de la relación entre población, desarrollo, emisiones de gases de efecto invernadero y cambio climático. El informe, preparado por la División de Población, vincula el rápido crecimiento de la población mundial en el siglo XX con un crecimiento aún más rápido de las poblaciones urbanas, la producción, las tierras cultivadas, el uso de agua y el consumo de energía. El informe indica que esas tendencias, “en su conjunto, están teniendo efectos sin precedentes sobre el medio ambiente, causando el cambio climático, la degradación de los suelos y la pérdida de diversidad biológica”. La población de individuos que conforman una especie vegetal está bajo una continua interacción dinámica de adaptación con los factores bióticos y abióticos en los que crece. Ante esta situación, contar con nuevas variantes dentro de una especie es crucial, dado que se pueden dar soluciones a problemas generados por estos cambios a los que están sujetos los ecosistemas. Diferentes escenarios se han obtenido del modelado de

datos existentes acerca del cambio climático. El peor escenario predice incrementos de temperatura y cambios en las precipitaciones para el 2030. En este contexto se prevee un cambio en las pasturas de C3 a C4 y por lo tanto las gramíneas que poseen este tipo de morfología se verán beneficiadas e incrementarán la superficie sembrada. Contar con variabilidad en la misma es importante.

Existen diferentes fuentes de variabilidad, como son la variabilidad producida durante los procesos evolutivos de especiación, la producida por la dispersión artificial ejercida por el hombre y aquella que es producto de la dinámica de inducción-selección de nuevas variantes por medio de la hibridación (Hernández Villarreal, 2013). Contar con variantes es de suma importancia para el mejoramiento genético, brindando alternativas para obtener forrajeras para los nuevos escenarios climáticos mundiales.

En términos generales, los objetivos primarios de la mayoría de los programas de mejoramiento de especies forrajeras han sido el incremento de la productividad, ya sea en términos de producción total y/o distribución estacional y de la persistencia. Más recientemente se han dedicado mayores esfuerzos al mejoramiento de la calidad del forraje y a la resistencia a factores bióticos y abióticos (Andrés, 2005). En el futuro, es probable que estos últimos aspectos reciban aún mayor atención, pero adicionalmente existirá una demanda por generar cultivares forrajeros como fuente de nuevos productos y procesos.

En Argentina, el INTA ha sido la principal fuente de cultivares forrajeros nacionales. Las actividades realizadas por diversas Estaciones Experimentales desde 1945 hasta la actualidad permitieron la incorporación de más de 10.000 accesiones, entre géneros, especies y cultivares de todo el mundo, además de ecotipos y poblaciones locales. Muchos de estos materiales fueron la base del germoplasma de numerosos programas de mejoramiento que contemplaron la obtención de cultivares adaptados a las zonas templada húmeda y subhúmeda de la región. Entre 1960 y 2004 el INTA obtuvo y difundió más de 50 cultivares de 28 especies, consideradas muchas de ellas, entre las más exitosas en el mercado nacional de semillas forrajeras hasta la actualidad.

Si bien la evolución del mercado de variedades forrajeras en los últimos años fue afectado por la disminución de la demanda de semillas debido a los procesos de expansión agrícola y a las crisis económicas de nivel nacional y sectorial, en la actualidad la introducción de

variedades desarrolladas en el exterior se ha incrementado notablemente. Las tendencias a futuro contemplan un aumento de la actividad fitomejoradora nacional, una mayor proporción de variedades protegidas en el mercado y también una mejora sustancial en la producción de semilla forrajera de mayor calidad (Andrés, 2005).

La medida final del éxito del mejoramiento de especies forrajeras debe ser expresado en términos de cantidad y calidad de leche y carne. La producción animal puede relacionarse con diferencias en la digestibilidad del forraje en términos de requerimientos de energía metabolizable (EM). Una diferencia del 13 % en la digestibilidad de la materia seca orgánica de gramíneas puede producir una diferencia de 2 MJ EM kg⁻¹. Se estima que esto puede resultar en una diferencia de hasta 9 kg (45 %) en rendimiento de leche diaria, 0.5 kg (67 %) en ganancia diaria de carne vacuna y 100 g (50 %) en ganancia diaria de corderos. Si bien la digestibilidad es de importancia central, no es el único factor de calidad que gobierna el producto animal. El valor nutritivo del forraje depende de sus constituyentes químicos y la implementación de estrategias de selección para mejorar la calidad solo se logra si se comprende el rol de cada constituyente celular en la nutrición animal. Existen numerosas evidencias que indican que hay suficiente variación genética como para realizar progresos significativos utilizando técnicas convencionales o moleculares de mejoramiento genético. La modificación del momento de madurez o fecha de floración, la modificación de la relación hoja/tallo, alterar las tasas de digestión de la pared celular, incrementar el flujo de proteína pasante y mejorar el balance de aminoácidos para maximizar la síntesis de proteína bacteriana, son algunos de los ejemplos del potencial genético para lograr dicho objetivo.

El mejoramiento de forrajes para mayor digestibilidad utilizando métodos indirectos se ha basado en la selección de plantas con alta proporción de hojas con relación a tallos, lo cual se fundamenta en que las hojas tienen una mayor digestibilidad y consumo que los tallos debido a una tasa de pasaje más rápida (Poppi et al, 1980).

El progreso realizado por el mejoramiento genético de gramíneas y leguminosas forrajeras, principalmente para áreas templado húmeda de nuestro país ha sido importante. Sin embargo en los últimos años, en esta región se produjo una importante expansión agrícola, basada en la utilización de tecnologías de cultivos como la siembra directa, que permitió ocupar los suelos de mayor valor en la región. Este aumento de la superficie agrícola determinó la coexistencia de escenarios productivos contrastantes, que exigen por un lado

la intensificación en la utilización de los recursos forrajeros, y por otro lado, la necesidad de ofrecer tecnologías específicas para la producción de pasturas en condiciones marginales.

Estos nuevos escenarios han determinado nuevos desafíos por abordar desde la genética, tales como el mejoramiento de la calidad nutricional del forraje para sistemas de alta producción de carne y leche y el desarrollo de cultivares genéticamente diversos para áreas marginales de la Argentina.

Si bien en Argentina ha habido numerosos estudios relacionados con distintos aspectos de la botánica, fisiología, ecología, manejo y genética del pasto llorón, desde los primeros de Covas en La Pampa hasta los de los grupos de la UNS y el CERZOS, el mejoramiento tradicional no ha sido priorizado y no se han realizado avances desde la época en que trabajaba el Ing. Guillermo Covas en Anguil. Si bien el INTA lo ha mencionado en numerosas oportunidades como prioritario, no ha habido acciones en este sentido. En el año 2006 el grupo del CERZOS registró tres materiales, como se mencionara anteriormente en esta tesis, pero se obtuvieron por cultivo *in vitro*.

Hasta principios de los años 60' (1960) poco era conocido acerca del modo reproductivo del pasto llorón y la posibilidad de obtener híbridos era remota. En ese tiempo ni siquiera estaban en claro los problemas que podían presentarse. Se había informado acerca de la naturaleza apomíctica de la reproducción en *E. curvula* (Streetman, 1963) pero no era algo ampliamente conocido, dado que el informe se publicó en una revista botánica de escasa difusión. En esos años, Paul Voigt describió el primer germoplasma diploide sexual, perteneciente a la var. *conferta* (Voigt, 1971). Posteriormente, este mismo investigador encontró plantas tetraploides sexuales en la línea PI299929 (*E. curvula* var. *conferta*). La mayoría de las plantas de PI299929 producían progenies uniformes, sin embargo, plantas ocasionales produjeron progenie variable. El análisis citológico de tales plantas no mostró indicios de apomixis (Voigt y Bashaw, 1976; Voigt, 1976). Es difícil de asegurar si esas plantas se originaron por mutación o por una ocasional reproducción sexual entre plantas de PI299929. Esto último parece más probable, ya que la reproducción sexual se encontró en más de una planta. En contraste, solamente se ha encontrado una única planta sexual de buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) y se cree que resultó de una mutación (Bashaw, 1969).

La planta 40-9-69FQ, una selección de pasto llorón tetraploide sexual, fue identificada como un ejemplar fuera de tipo en una hilera de progenie uniforme de PI299929. En 1969 se recolectó semilla obtenida por polinización abierta de esa planta y en 1970 la progenie fue transplantada a una parcela en el campo. Hacia fines del verano de 1970 la variabilidad de la progenie era evidente. Los diversos tipos de plantas que rodeaban a la 40-9-69FQ habían aportado aparentemente el polen para la producción de estos “primeros” híbridos. La variación entre la progenie de 40-9-69FQ presentaba un dramático contraste con la uniformidad que se había observado en las anteriores evaluaciones de progenie. Esto proporcionó el primer indicio de la gran cantidad de variación que podía ser obtenida a través de la hibridación.

Los primeros híbridos artificiales obtenidos, utilizando polinización controlada, fueron sembrados en 1971. La semilla fue producida en 1970 por el procedimiento de cañas cortadas. Cañas de plantas sexuales se colocaron en botellas de agua junto con cañas de pasto llorón común (A-67) como proveedoras de polen. Las plantas sexuales eran de *E. curvula* var. *conferta* y tenían la pequeña panoja contraída y la base del tallo verde, típicas de ese tipo. Los híbridos se identificaron por sus panojas intermedias a grandes, base del tallo rojo y crecimiento más vigoroso que sus progenitores femeninos.

Originalmente se había asumido que la apomixis en *E. curvula* era obligada (Voigt y Bashaw, 1972). Sin embargo, pruebas de progenie de los híbridos de pasto llorón, iniciadas en 1972 (Voigt y Bashaw, 1976) y los trabajos de otros (Brix, 1974) demostraron que esta presunción era incorrecta. A pesar de la uniformidad observada en la mayor parte de las colecciones, *E. curvula* es una especie apomictica facultativa. Los recientes estudios de Rodrigo (2014) indican que existe una gran plasticidad en este carácter, incrementando el nivel de sexualidad cuando las plantas se encuentran sometidas a condiciones de estreses exógenos (como la sequía y el cultivo de tejidos) y endógenos (cambios de plodía e hibridación). No obstante ello, existe al menos un material donde nunca fue posible observar sacos sexuales, por lo cual la apomixis obligada dentro de la especie también existe.

Estudios posteriores del grupo norteamericano indicaron claramente que, a pesar de las mayores dificultades asociadas con el mejoramiento de una especie apomictica facultativa, era posible desarrollar un esquema de trabajo para el mejoramiento de *E. curvula* (Voigt y

Burson, 1983; Voigt, 1991). Este mismo autor (Voigt, 1991) señala que el potencial híbrido de *E. curvula* depende de la variación encontrada entre los progenitores, de los problemas que surgen en la hibridación, de la heredabilidad de características importantes, interrelaciones entre caracteres, fertilidad de los híbridos, etc.

Ya que se conoce poco acerca de los híbridos de *E. curvula* y su valor para la agricultura, vale la pena estudiar el germoplasma existente de modo que los progenitores para hibridación puedan ser elegidos cuidadosamente. Afortunadamente, la reproducción apomíctica ha mantenido la diversidad genética en las colecciones. Si la semilla de *E. curvula* se formara sexualmente luego de polinización cruzada (en lugar de hacerlo por apomixis) gran parte del valor genético de las colecciones actuales se habría perdido a través de inter cruzamientos, mientras las plantas se mantienen en viveros o en campos de multiplicación de semilla. De esta forma, la apomixis ha preservado la diversidad genética.

En pasto llorón, la progenie de cruza entre tetraploides sexuales y apomícticos obligados o facultativos produjo una proporción de 1:1 de genotipos sexuales y apomícticos respectivamente, así como algunos apomícticos facultativos (Voigt y Burson, 1983). El desarrollo de esquemas de hibridación entre plantas sexuales y apomícticas de pasto llorón es un paso importante en el mejoramiento de la especie, ya que conduciría a la recombinación de características deseables de los diferentes tipos de esta gramínea (Poverene y Voigt, 1995; Voigt et al., 1977). Un programa de mejoramiento desarrollado en el Grassland, Soil and Water Reserch Laboratory (USDA, ARS, Temple, Texas, EEUU), basado en el cruzamiento entre genotipos sexuales x apomícticos tetraploides generó una progenie híbrida donde los híbridos apomícticos más promisorios fueron evaluados como potenciales nuevos cultivares, mientras que las plantas sexuales se utilizaron para nuevas hibridaciones (Poverene y Voigt, 1995).

Como mencionara más arriba, no existen actualmente programas de mejoramiento enfocados en el aumento del rendimiento y/o de la calidad forrajera del pasto llorón en Argentina. Sin embargo, se observó que algunos parámetros vegetativos asociados al rendimiento tales como diámetro de corona, largo de hoja y materia seca mostraron altos valores de repetibilidad (Di Renzo et al., 2000). Estudios posteriores indicaron que estas características mostraban gran variabilidad al ser evaluadas en tres localidades diferentes durante dos años sucesivos y la interacción genotipo x ambiente era significativa (Ibañez et

al., 2001). Esta interacción afecta directamente las respuestas de los genotipos y el rendimiento. Por lo tanto, trabajos más recientes se enfocaron en evaluar la eficiencia de la selección indirecta de 18 híbridos que fueron escogidos al azar provenientes del cruzamiento entre el 4x sexual (♀) y 4x apomíctico (♂), en la cual se midieron producción de biomasa aérea, longitud de hojas, diámetro de corona, número y longitud de panojas (Di Renzo et al., 2003).

Tradicionalmente, el progreso en el mejoramiento se ha basado exclusivamente en el análisis de fenotipos. El éxito de este análisis, entre otros factores, depende de la heredabilidad del carácter. Así por ejemplo, las herencias poligénicas, dominancias parciales o incompletas, la influencia del ambiente y el tiempo necesario para la evaluación fenotípica en cultivos perennes, son factores que frecuentemente limitan la eficacia de este análisis.

Muchas de las complicaciones del análisis fenotípico pueden ser mitigadas a través de la identificación directa del genotipo. Para este fin, puede utilizarse un sistema de diagnóstico basado en marcadores moleculares para el análisis de diversidad y relaciones filogenéticas en germoplasma. Las tecnologías de análisis molecular de la variabilidad del ADN permiten determinar puntos de referencia en los cromosomas, técnicamente denominados "marcadores moleculares". Se define como marcador molecular a todo y cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN (correspondientes a a regiones expresadas o no del genoma). La secuencia de nucleótidos y la función de un marcador molecular pueden o no ser conocidas, y por lo general, son desconocidas. Cuando se verifica su comportamiento de acuerdo a las leyes básicas de la herencia Mendeliana, se define a un marcador molecular como marcador genético. Esto se comprueba, por ej., mediante el estudio del comportamiento del marcador de una población segregante. Diversas técnicas de biología molecular están disponibles hoy para la detección de la variabilidad del polimorfismo genético. Estas técnicas permiten la obtención de un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cubriendo todo el genoma del organismo. Tales marcadores pueden ser utilizados para las más diversas aplicaciones, como se indica en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Principales aplicaciones de los marcadores moleculares en el mejoramiento vegetal (Beckmann, 1991, modificada y ampliada).

MEJORAMIENTO CLASICO

Aplicaciones a corto plazo

- Determinación de origen y tests de paternidad.
- Identificación y protección de variedades y/o clones patentados.
- Atribución de líneas a grupos heteróticos.
- Certificación de pureza genética de líneas e híbridos.
- Control de fecundación cruzada y autofecundación de plantaciones forestales obtenidas de semillas.
- Evaluación de germoplasma y poblaciones de mejoramiento (variabilidad, diversidad, clasificación, distancia genética y filogenia).
- Construcción de colecciones núcleo (“core collections”) en bancos de germoplasma a partir de estudios sobre diversidad y distancia genética.

Aplicaciones a medio y largo plazo

- Construcción de mapas genéticos.
- Mapeo de QTL y/o ELT (Quantitative y Economic Trait Loci).
- Análisis de la arquitectura de características cuantitativas (número, posición, acción genética, magnitud de efecto e interacciones de QTLs).
- Detección de loci homólogos en otras especies o géneros a través de mapas comparativos (“Comparative” o Synteny mapping”).
- Introgresión de características por retrocruzamiento asistido por marcadores.
- Selección y recombinación de genotipos superiores.
- Selección de líneas endógamas.
- Predicción de fenotipos esperados.
- Selección indirecta para características de difícil evaluación (resistencia a factores bióticos y abióticos, o para características industriales)
- Selección precoz en cultivos perennes.

MEJORAMIENTO POR TRANSGÉNESIS

- Clonado posicional, mapas físicos (“Positional cloning” o “Map-based cloning”).
-

A corto plazo incluyen, básicamente, la identificación y discriminación de genotipos. En las aplicaciones analíticas de medio y largo plazo, los marcadores permiten cuantificar la variabilidad genética existente a nivel de secuencia de ADN y correlacionarla con la expresión fenotípica en procedimientos de mapeo genético. La información generada por estos marcadores puede ser integrada a las metodologías de selección y recombinación de

genotipos como una herramienta adicional para promover el avance genético. Los marcadores moleculares se han tornado herramientas fundamentales en la construcción de mapas genéticos de genomas eucariotas, y han permitido la clonación de genes que pueden ser utilizados en el mejoramiento mediante transformación genética (Ferreira y Gratrapaglia, 1998). También son de gran utilidad para el análisis de la variabilidad en poblaciones de plantas.

El objetivo del mejoramiento vegetal es seleccionar genotipos superiores a partir de la identificación de fenotipos superiores. El grado de éxito en este proceso depende de: i) el número de genes involucrados en el control genético del carácter (herencia monogénica o poligénica) y las relaciones interalélicas (dominancia o aditividad) y ii) la influencia del ambiente, que se mide normalmente a través del parámetro heredabilidad. El proceso de caracterización y/o selección se vuelve más eficiente a través del uso de marcadores genéticos, definidos como caracteres que presentan polimorfismo o variabilidad experimentalmente detectable en individuos de una población segregante y un tipo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Esta variación puede considerarse a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos (marcador morfológico) hasta la variación de un solo nucleótido de ADN (marcador molecular). El marcador ideal debería ser altamente polimórfico (dentro y entre especies), de herencia mendeliana no epistática, insensible a los efectos ambientales, codominante (capaz de diferenciar individuos heterocigotas de homocigotas), de rápida identificación y simple análisis, y de detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta (Martínez et al., 2010). En la actualidad existe una gran variedad de marcadores genéticos que han sido desarrollados y están siendo utilizados en análisis genómicos, tales como morfológicos, isoenzimas, proteínas, Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción -RFLPs (Beckmann y Soller, 1986), Polimorfismos de ADN Amplificado Aleatoriamente - RAPDs (Williams et al., 1990), Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados - AFLPs (Vos et al., 1995), Numero Variable de Repeticiones en Tandem - VNTRs o minisatélites (Jeffreys et al., 1985), Secuencias Simples Repetidas - SSRs o microsátélites (McCouch et al., 1997), Polimorfismos de Secuencias Cortadas Amplificadas - CAPS (Konieczny y Ausubel, 1993), Secuencia de Regiones Amplificadas Caracterizadas - SCARs (Paran y Michelmore, 1993), Etiquetas de Secuencias Expresadas - ESTs (Adams et al., 1991), Secuencias Ortólogas Conservadas - COS

(Fulton et al., 2002), Polimorfismos de Nucleótido Simple - SNPs y Marcadores de Inserción-Delección - InDels (Landegren et al., 1998).

En este trabajo se utilizaron AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) y SSR (Secuencias Simples Repetidas o microsatelites), por lo cual en la **Tabla 2** solo se hace referencia a los mismos y se indican las diferencias entre ellos. Los microsatélites se localizan tanto en secuencias que se expresan como en intergénicas. Los denominados SSRs génicos (EST-SSRs) presentan un nivel menor de polimorfismo que los microsatélites de regiones no codificantes, pero por otro lado tienen una mayor probabilidad de transferencia entre especies o materiales distantes genéticamente (Varshney et al., 2005).

Tabla 2. Análisis comparativo entre de los marcadores moleculares utilizados en esta tesis, AFLPs y SSRs (Ferreira y Gratrapaglia, 1998).

Variable	Microsatélites	AFLP
Modo de observación del polimorfismo	Amplificación específica vía PCR previa digestión del ADN con enzimas	Segmento amplificado vía PCR previa digestión del ADN con enzimas
Expresión genética	Codominante	Dominante
Número de alelos/locus	Altamente multialélico	Dos alelos, binario
Disponibilidad de marcadores en el genoma	prácticamente ilimitada	prácticamente ilimitada
Distribución en el genoma	+/- al azar	+/- al azar
Transferencia de ocurrencia de marcadores	intraespecífica; baja para especies próximas	intrapoblacional y media intraespecífica
Pasos para la detección	extracción de ADN (centena de nanogramos); amplificación específica vía PCR; electroforesis en poliacrilamida o agarosa; autorradiografía o coloración con EtBr	extracción de ADN (centena de nanogramos); digestión con endonucleasas; ligación de adaptadores; amplificación vía PCR; electroforesis (alta resolución); autorradiografía
Información y/o desarrollo previo necesario	construcción de biblioteca; selección de clones con microsatélites adecuados; secuenciación de ADN; ingeniería de primers; construcción de primers; test de polimorfismos adecuado	Selección de combinaciones de enzimas y primers con bases arbitrarias adecuadas
Eficiencia de obtención de datos puntos genotípicos	baja en la producción de batería de marcadores; alta en rutina	muy alta en rutina
Accesibilidad tecnológica en el ámbito de mejoramiento	muy baja	media
Costo de establecimiento/costo de operación rutinaria	muy alto/medio	bajo/bajo
Adecuación para diferentes aplicaciones en análisis genético		
Identificación de genotipos	muy alta	muy alta
Evaluación de germoplasma	Alta	muy alta
Mapeo genético	muy alta	alta
Mapeo direccionado a regiones específicas	Media	muy alta
Mapeo comparativo	Alta	baja
Genética de autógamias	muy alta	muy alta
Genética de alógamas	muy alta	muy alta
Análisis filogenética	Alta	media

Los microsatélites son regiones hipervariables del genoma que contienen arreglos de secuencias simples en tandem de mono, di, tri, tetra o pentanucleótidos que se repiten entre 10 y 100 veces. Los marcadores microsatélites, también denominados Simple

Sequence Length Polymorphism (SSLP), SimpleSequence Repeat Polymorphism (SSRP), Simple Sequence Repeats (SSR) o SequenceTagged Microsatellite Sites (STMS) se encuentran distribuidos por todo el genoma de la mayoría de las especies eucariotas (Litt y Luty, 1989; Martínez et al., 2010).

Las secuencias sencillas repetidas (SSR), consisten en pequeñas secuencias (“Sequence motif”) de 1 a 4 nucleótidos adyacentes repetidos lado a lado; son amplificadas individualmente a través de PCR a partir de un par de “primers” específicos (de 20 a 30 bases) complementarias a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Los segmentos amplificados a partir de estos sitios, casi invariablemente presentan un extenso polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos. Así, cada microsatélite, independiente del elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constituye un *locus* genético altamente variable, multialélico, de gran contenido informativo.

Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo *locus*. La detección de secuencias SSR vía PCR se realiza en geles de poliacrilamida o agarosa de alta resolución, ya que es necesario un gel adecuado para la separación de segmentos que difieren en pocos pares de bases, dependiendo del número de nucleótidos del elemento repetido en el microsatélite. La visualización de las bandas puede hacerse directamente por coloración de bromuro de etidio o nitrato de plata.

Cada *locus* de microsatélite es analizado individualmente al utilizarse el par de “primers” construido específicamente para su amplificación. Los *loci* SSR parecen ser somáticamente estables, poseen expresión codominante, es decir, ambos alelos de un individuo heterocigótico son visualizados y son altamente multialélicos, en una población donde potencialmente todos los alelos de aquel locus pueden ser detectados y discriminados. Teniendo en cuenta la expresión codominante y el multialelismo, los marcadores SSR son los que poseen el más elevado contenido de información de polimorfismo. Por esta razón, esencialmente toda y cualquier población segregante puede ser utilizada como población de referencia para estudios de ligamiento y mapeo genético.

Los SSR son muy frecuentes y están distribuidos al azar, permitiendo la más completa cobertura de cualquier genoma eucariota. La mayor limitación de estos marcadores es la gran cantidad de trabajo necesario para el desarrollo previo (Ferreira y Gratrapaglia, 1998).

Los SSR utilizados en este trabajo de tesis son EST-SSR, desarrollados en un trabajo previo del grupo del CERZOS (Cervigni et al., 2008) y por lo tanto se encuentran en regiones codificantes del genoma. Los mismos se desarrollaron a partir de genotecas de cDNA de inflorescencias y hojas de pasto llorón.

Los polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados, constituyen una herramienta poderosa de análisis del genoma dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar. Desde su desarrollo y divulgación esta técnica se utiliza ampliamente en el análisis de plantas (Martínez et al., 2010).

El análisis de AFLP consta esencialmente de cuatro etapas. En la primera etapa, el ADN genómico total del individuo es cortado con dos enzimas de restricción, esta etapa de digestión se realiza con una enzima de corte raro combinada con una enzima de corte frecuente. Las enzimas de corte raro reconocen de 6 a 8 pares de bases o una secuencia rara de bases (ej.: *ECO RI*, *NotI*, *PstI*) y las de corte frecuente reconocen 4 pares de bases (ejemplo: *MseI*, *RsaI*). Las reacciones se realizan separadamente, tratando primero el ADN con la enzima de corte raro y después con la de corte frecuente. Con esta digestión secuencial se generan tres clases de fragmentos que difieren en cuanto a las extremidades; fragmentos grandes resultantes de la digestión por la enzima rara en ambos extremos; fragmentos pequeños resultantes del corte con la enzima frecuente en ambos extremos; fragmentos de tamaños intermedios resultantes del corte combinado de ambas enzimas, rara/frecuente.

En la segunda etapa, se incorporan adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática. Por ej., los adaptadores *ECO RI* específicos se unen a los extremos “adhesivos” producidos por la *ECO RI*, mientras que los adaptadores *MseI* se unen específicamente a los extremos resultantes del

corte con la enzima *MseI*. Los adaptadores poseen de 20 a 30 pares de bases cuyas secuencias son diferentes en cada uno de ellos. En este paso podría ser amplificado un gran número de fragmentos mediante una PCR dirigida con “primers” específicos a partir de la secuencia de los adaptadores. Sin embargo, sería este número sería excesivamente grande para obtener una buena definición de fragmentos individuales, inclusive en geles de alta resolución. Por lo tanto, son necesarias algunas etapas de selección de una subpoblación de fragmentos hasta llegar a un número tal que sea posible visualizarlos convenientemente en un gel.

En la tercera etapa, una fracción de los fragmentos generados es amplificada selectivamente vía PCR utilizando “primers” específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores. Esta se realiza mediante una estrategia basada esencialmente en el concepto de los polimorfismos RAPD, o sea, la utilización de “primers” de secuencias arbitrarias. Los “primers” utilizados para dirigir la PCR están contruidos de tal forma que, además de la secuencia específica de 20 a 25 nucleótidos complementarios a la secuencia de los adaptadores, contienen de 1 a 3 nucleótidos adicionales de secuencia arbitraria en su extremo 3'. La especificidad en esta extremidad es crucial, dado que justamente este sitio es donde se inicia la polimerización. Con esto, los “primers” hibridarán solamente con aquellos fragmentos que poseen la secuencia complementaria a su secuencia arbitraria adicional. Por lo tanto, se produce una acción selectiva en el momento en que es realizada la PCR y solamente una subpoblación de fragmentos es amplificada y en la cuarta etapa, la subpoblación de fragmentos amplificados es separada en geles de poliacrilamida de alta resolución.

La ventaja que más destaca esta tecnología de las demás es indiscutiblemente el gran número de fragmentos que se originan y revelan en un único gel y el gran poder de detección e variabilidad genética. Ya que explora simultáneamente el polimorfismo de presencia y ausencia de sitios de restricción y la existencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias. Con lo que se consigue una flexibilidad significativa en la obtención de marcadores polimórficos. No requiere información previa de la secuencia de ADN. Una vez preparados los fragmentos amplificables, pueden obtenerse rápidamente un gran número de bandas potencialmente polimórficas. Esta tecnología de AFLP tiene elevada

robustez, esto se debe básicamente a que se utilizan “primers” más largos en la etapa de PCR, lo que aumenta significativamente la especificidad de la amplificación.

Entre las principales limitaciones de los AFLP se encuentran, en primer lugar el bajo contenido de información por locus, ya que sólo se detecta un alelo, o sea, el fragmento que se amplifica. Las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como un alelo nulo. Son por lo tanto marcadores dominantes y los datos tienen naturaleza binaria, es decir que no pueden discriminarse los genomas heterocigotas de los homocigotas. Por otro lado se necesitan más reactivos (enzimas de restricción, adaptadores y “primers” específicos) y más equipamiento. El ADN necesario debe ser de alto nivel de pureza, lo que demanda métodos de extracción más elaborados. Son necesarias etapas de digestión enzimática y de unión de adaptadores. La electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida, todos estos factores hacen que este marcador AFLP sea menos accesible (Ferreira y Gratrapaglia, 1998).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este capítulo fue realizar cruzamientos entre el único material completamente sexual a nivel tetraploide de que se dispone (OTA-S) y un material apomíctico tetraploide, de amplio uso en Argentina, como es el cultivar Tanganyika, a fin de obtener nuevos materiales para mejoramiento. Por otro lado se propone determinar el nivel de variabilidad obtenida a nivel molecular, utilizando marcadores moleculares de tipo AFLP y SSR, y el nivel de variación fenotípica para características de interés agronómico.

HIPÓTESIS 1

La obtención de una población de plantas híbridas, que surge del cruzamiento de progenitores tetraploides contrastantes en su modo reproductivo, será de utilidad para el mejoramiento de la especie y para el mapeo de genes relacionado con la apomixis.

OBJETIVO 1.1

Obtener híbridos de pasto llorón a partir de cruzamientos entre progenitores sexuales y apomicticos a nivel tetraploide.

OBJETIVO 1.2

Determinar la naturaleza híbrida de los nuevos materiales obtenidos y la variabilidad presente en la población de plantas generada utilizando marcadores moleculares de tipo AFLP y SSR.

OBJETIVO 1.3

Evaluar caracteres morfológicos de importancia agronómica para seleccionar nuevos materiales a introducir en programas de mejora.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro Científico Tecnológico CONICET- Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires. Las investigaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y en el campo experimental del CERZOS (centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida). En la **Fig. 1** y **2**, se muestra el esquema general del trabajo para la obtención de híbridos en pasto llorón.

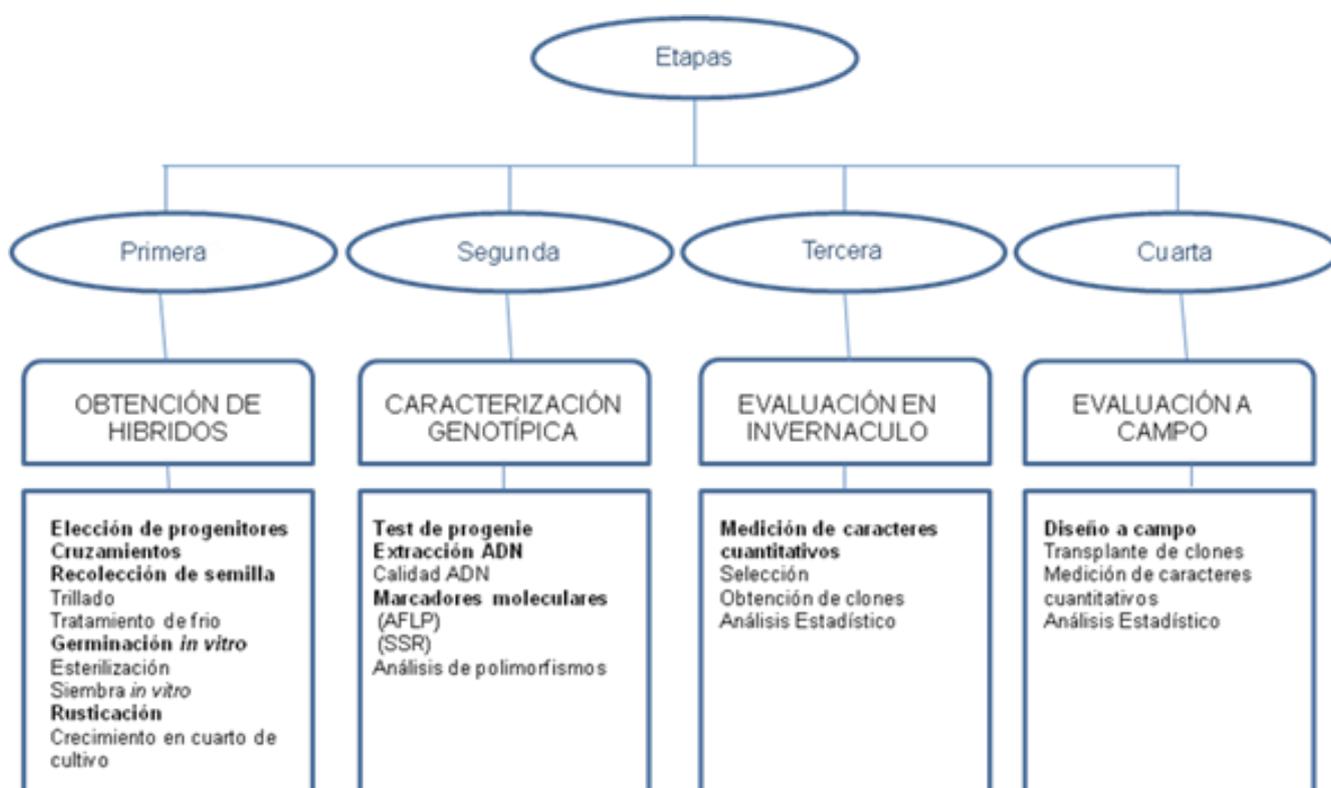


Figura 1. Esquema de trabajo para la obtención de híbridos en pasto llorón.

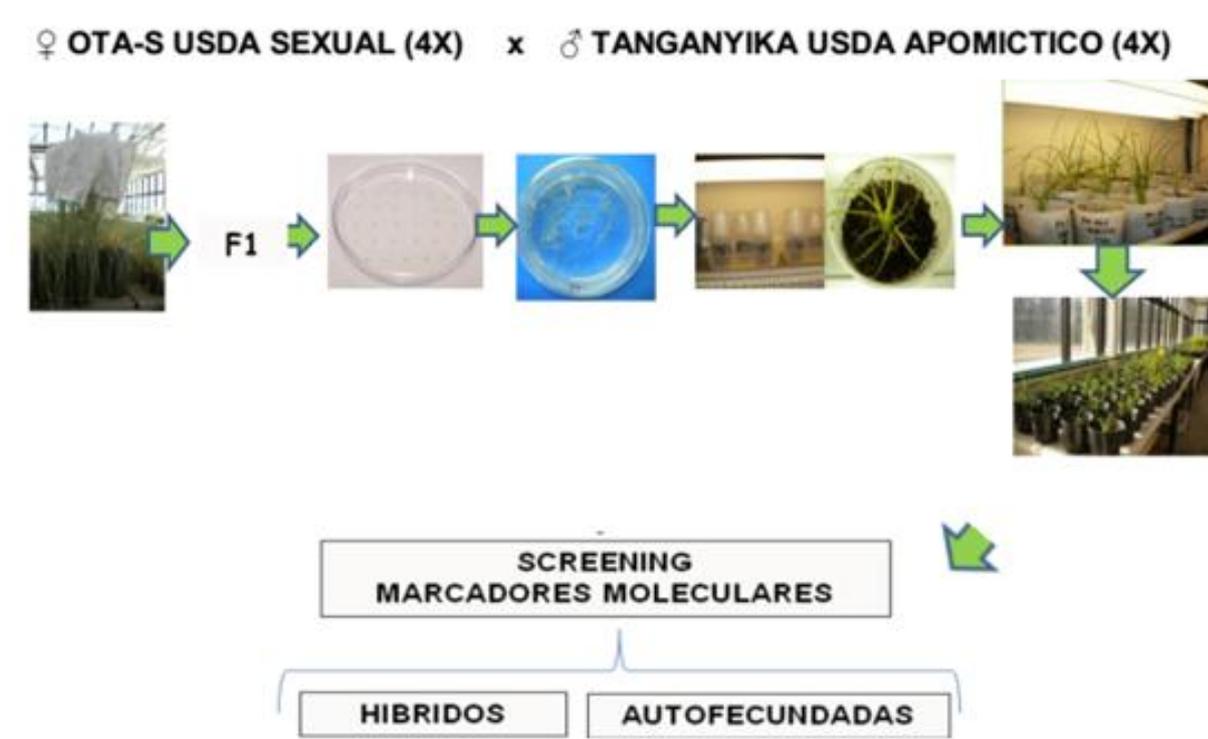


Figura 2. Etapas de la obtención de probables híbridos de pasto llorón por cruzamientos entre materiales sexuales y apomicticos.

1. Primera Etapa. Obtención de Híbridos.

1.6. Material vegetal.

Para este estudio se utilizaron dos accesiones provenientes del USDA (United States Department of Agronomy, Western Regional PI Station, Washington State University, Pullman, Estado Unidos) de *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, nombre vulgar “pasto llorón” que se detallan a continuación:

- PI574506 (OTA-S): Tetraploide, sexual, tipo conferta. Material desarrollado por mejoramiento en Texas, Estados Unidos.
- PI234217 (cv. Tanganyika): Tetraploide, apomictico, tipo curvula. Colectado en Provincia del Cabo, Sudáfrica.

1.7. Cruzamientos.

Se realizaron un total de 15 cruzamientos en el periodo de floración de la especie en estudio, desde septiembre 2009 a marzo de 2010, indicados en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cruzamientos de pasto llorón realizados entre el progenitor femenino OTA-S USDA, de reproducción sexual, y el progenitor masculino Tanganyika, de reproducción apomíctica, ambos tetraploides.

Cruzamiento N°	Fecha
1	20/09/2009
2	9/10/2009
3	23/10/2009
4	27/10/2009
5	27/10/2009
6	9/11/2009
7	20/11/2009
8	21/11/2009
9	26/11/2009
10	10/01/2010
11	10/01/2010
12	10/01/2010
13	3/02/2010
14	18/02/2010
15	1/03/2010

Estos cruzamientos entre OTA-S USDA (tetraploide ($2n=4X=40$) sexual como progenitor femenino) y Tanganyika (tetraploide ($2n=4X=40$) apomítico, como progenitor masculino se realizaron aislando pares de panojas, colocando una de cada progenitor en un sobre de papel al comienzo de la floración, para evitar cruzamientos no deseados y se los mantuvo ensobrados durante 30 días, aproximadamente. Luego de este período se procedió a cosechar la semilla en cada uno de los cruzamientos realizados.

1.8. Colección de semilla y trillado.

Luego del período de llenado del grano y maduración de las semillas se colectaron las panojas del progenitor femenino OTA y se procedió al trillado manual de las mismas, y al conteo de las semilla obtenidas en cada cruzamiento. Estas se colocaron a baja temperatura (4°C) durante 2 semanas, siendo este un pre-tratamiento de frío necesario para romper la dormición y acumular las horas de frío necesarias para su germinación. Si bien se trata de un pasto africano, crece en altura donde las condiciones son más frías, por ello el requerimiento de vernalización.

1.9. Germinación *in vitro*.

Al principio las semillas se germinaban en almácigos con sustrato comercial dentro del invernáculo, pero, debido al bajo poder germinativo de las mismas se decidió germinarlas *in vitro* utilizando un medio MS (Murashigue y Skoog, 1962). Previamente, las semillas se esterilizaron superficialmente por tratamiento con etanol 70% durante 5 minutos, en NaOCl al 50% (solución comercial) durante 10 minutos, al final de los cuales se enjuagó con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron de a 20 en cajas de petri conteniendo medio de Murashigue y Skoog (MS) cuya composición es: sales MS 4,34gr/lit, sulfato de cobre 100ul/lit, sacarosa 30gr/lit y vitaminas de MS 1000x, pH 5.8. El medio se solidificó utilizando 2gr/lit de fitagel. Una vez realizada la siembra, las cajas se incubaron en cámara de crecimiento a 25°C durante 15 días, en oscuridad. Transcurrido ese período se las colocó en una cámara de incubación a 27°C , con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad y una humedad del 40% durante dos meses. Los repiques a un medio de cultivo nuevo se realizaron cada 15 días.

1.10. Rusticación en cuarto de cultivo.

Una vez que las plantas lograban una superficie radical considerable, elemento crucial para que la aclimatación sea exitosa, se procedía a realizar el transplante. Para ello se lavaron las raíces cuidadosamente, quitándoles todo residuo del medio nutritivo a fin de evitar posibles contaminaciones por hongos y bacterias del suelo que provocan daños y mortandad a las plantas. Luego se colocaron en vasos de plástico conteniendo sustrato comercial Grow Mix Multipro Terrafertil, compuesto por turba de musgo Shagnum de fibras medias, perlita, compost de corteza, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes, materia orgánica de 85 – 90%, y una conductividad eléctrica de 0.3 – 0.45 mmhos/cm. A continuación, se las cubrió con una botella de plástico, quedando bien selladas, a fin de evitar una excesiva evapotranspiración y deshidratación, y se las colocó en el cuarto de cultivo con una temperatura de 25- 27°C, y un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad.

2. Segunda Etapa.

2.1. Caracterización genotípica.

La progenie obtenida que sobrevivió a este proceso (232 plantas) se analizó con marcadores moleculares AFLPs y EST-SSR. Los EST-SSR de pasto llorón fueron desarrollados por el grupo del CERZOS (Cervigni et al., 2008). El objetivo de esto fue detectar las plantas híbridas verdaderas y estudiar la segregación de la progenie para el modo reproductivo.

2.1.1. Extracción de ADN

Para la extracción se partió de material fresco (aprox. 100 ug) de plantas de aproximadamente tres meses de edad. Se cortaron hojas en pequeñas porciones y se colocaron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron. El producto obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 700 microlitros de solución tamponada de extracción (50 mM Tris-HCl 1M pH 8, 10 mM EDTA 0,5 M pH8, 100 mM ClNa 5 M, 10% SDS y 10 mM beta-mercaptoetanol) y se incubó durante 20 min a 65 °C con agitación lenta (estufa con agitador vertical). Posteriormente se agregaron 200 microlitros de acetato de

potasio 5 M y se incubó en hielo durante 20 min. Pasado ese tiempo se centrifugaron los tubos en una centrífuga Eppendorf (20 min. a 13.000 rpm) para eliminar restos de tejido. El paso anterior se repitió para lograr un sobrenadante más limpio.

El mismo se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 700 microlitros de isopropanol para precipitar el ADN. Los tubos se incubaron durante 10 min. a -20 °C. El ADN se precipitó por centrifugación a 13.000 rpm durante 4 min. El precipitado se lavó con 600 microlitros de alcohol 70% y se centrifugó durante 4 min. a 13.000 rpm. Este lavado se repitió una segunda vez. Luego el pellet se secó en flujo laminar durante aproximadamente 30 min., luego de lo cual se resuspendió en 100 microlitros de solución TE 1X. La concentración y calidad del ADN se determinó mediante geles de agarosa al 1%, la concentración se estimó mediante el uso de un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300-Merck), utilizando la siguiente fórmula ($[C]=A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50\mu\text{g/ml}$), donde, A_{260} es el valor de absorbancia a esa longitud de onda y la constante $50\mu\text{g/ml}$ es la concentración de ADN doble cadena que genera un valor de absorbancia = 1.

2.2. Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Para llevar a cabo el estudio con AFLP se utilizó la técnica descrita por Vos et al. (1995) con algunas modificaciones. El análisis de AFLP consta esencialmente de cuatro etapas, consistentes en:

- **Digestión o restricción**

La digestión del ADN (500 ng) se realizó utilizando simultáneamente dos enzimas de restricción, *PstI* y *MseI*, lo cual requirió de un buffer en el cual ambas puedan tener una alta eficiencia. Antes de realizar la digestión se seleccionó el buffer NEB2 5X (Tris-HCl Ph: 7,5 50mM, MgAc 50mM, KAc 250mM, DTT 25mM, BSA 250ng/ul y agua destilada), el cual es compatible tanto para las enzimas de digestión como para la T4 DNA ligasa. La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20ul conteniendo la mezcla de la reacción que se indica en la **Tabla 4**. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, incubando 2hs a 37°C y 10 minutos a 70°C a fin de inactivar las enzimas de restricción. Una vez

terminado este paso se realizó el monitoreo de la digestión en un gel de agarosa al 1%, se visualiza un chorreado en el gel que indicaría que la restricción se realizó.

Tabla 4. Componentes de la mezcla de digestión con *MseI-PstI*.

	1X
Buffer NEB2	2ul
MseI	0,4ul
PstI	0,24ul
BSA	0,8ul
ADN (100ng/ul)	5ul
H2O	11,56ul
	20ul

- **Preparación de los adaptadores**

Los adaptadores utilizados se preparon utilizando oligonucleótidos de cadena simple, para obtener adaptadores de doble cadena. Para ello se mezclaron los oligonucleótidos *PstI* foward 5'-GAC TGC GTA GGT GCA-3' y reverse 5'-CCT ACG CAG TCT ACG AG-3' y por separado los de *MseI* foward 5'- GACGAT GAG TCC TGA G-3' y reverse 5'- ATG AGT CCT GAG TA-3'; se incubaron durante 1 minuto a 94°C y 10 minutos a 65°C.

- **Ligación de los adaptadores**

La ligación de los adaptadores a los sitios de restricción generados por las enzimas *PstI* y *MseI* se realizó dentro del mismo tubo donde se llevó a cabo la reacción de digestión. A cada tubo se le agregó la solución de ligación de adaptadores (**Tabla 5**) y se incubaron en el termociclador durante 3hs a 20°C.

Tabla 5. Componentes de mezcla de ligación de marcadores moleculares AFLP.

	1X
Adaptador PstI	4ul
Adaptador MseI	4ul
Buffer T4	4ul
T4 Ligasa	0,4ul
H2O	2,6ul
	15ul

- **Amplificaciones**

Los fragmentos fueron ligados a adaptadores para *PstI* y *MseI* y constituyeron las plantillas para las siguientes amplificaciones. Los cebadores para la preamplificación, para *PstI* (P: 5'-GAC TGC GTA CAT GCA GNNN-3') y para *MseI* (M: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ANNN-3'), contenían un nucleótido selectivo, P+A y M+A respectivamente. Los productos de la pre-amplificación fueron diluidos (1:6) en 10 mM Tris y 0,1 mM EDTA y fueron usados como plantillas para la segunda ronda de amplificación, donde se utilizaron seis combinaciones de cebadores (**Tabla 6**) para ambos adaptadores conteniendo tres nucleótidos selectivos, P+3 y M+3, respectivamente.

Se compararon los patrones de AFLPs de parentales y progenies y se analizaron los posibles polimorfismos:

1) Con el objetivo de detectar híbridos se utilizaron seis combinaciones de cebadores 3, 6, 14, 15 18 y 19 (Tabla 6).

2) Con el objetivo de analizar la segregación de la progenie se utilizaron 6 combinaciones de cebadores 8, 9, 10, 12, 14, 15 (**Tabla 6**).

Tabla 6. Secuencias y combinación de cebadores para AFLP.

<i>PestI/MseI</i>	M31: AAA	M38: ACT	M39: AGA	M43: ATA	M45: ATG
P36: ACC	1	2	3	4	5
P37: ACG	6	7	8	9	10
P40: AGC	11	12	13	14	15
P41: ACG	16	17	18	19	20

2.3. Secuencias Simples Repetidas obtenidas a partir de Etiquetas de Secuencias Expresadas (ESTs-SSRs)

Estos marcadores se utilizaron para determinar el origen híbrido de la progenie. Se utilizaron los cebadores E16, E19 y E29, indicados en la **Tabla 7**, diseñados a partir del transcriptoma de inflorescencias y hojas de pasto llorón como se describe en Cervigni et al (2008). Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo: solución tampón 1X, 2,5 mM Cl₂Mg, 0,125 mM (c/u) dNTPs, 10 mM de cebador, 1,6 U *Taq polimerasa* InVitroGen, 50 ng ADN. El programa de amplificación fue tipo Touchdown (la temperatura baja de a 1°C en los primeros ciclos de amplificación): 94°C 4', 18 ciclos de 94°C 30'', 68°C 30'' (-1°C/ciclo), 72°C 1', 30 ciclos de 94°C 30'', 50°C 30'', 72°C 1', 72°C 10', en ciclador MJ Research 100. Los productos de amplificación se separaron en geles de acrilamida al 6% que se tiñeron con plata.

Tabla 7. Secuencias de cebadores de SSR de pasto llorón.

Nombre	Tamaño	Tipo	Left Sequence	Right Sequence
E16	210	Penta	TGCCATCTCTCCAGCAC	TACTCATTCCCAGCCTTATC
E19	377	Penta	CTGTGGATGAGTTTGAGGAG	AGAGAGAGAGAGAAAGCCTGA
E29	309	Tri	TTCCAAGCAGCACTGACT	AACCCATCTTCTTCTTCTCC

3. Tercer Etapa. Rusticación Invernáculo.

3.1. Establecimiento de las plantas en invernáculo.

A los dos meses, se retiró paulatinamente la cubierta plástica de las plantas creciendo en el cuarto de cultivo y las mismas se transfirieron a macetas pequeñas conteniendo sustrato comercial Grow Mix Multipro (Terrafertil S.A., Moreno, Argentina). Un mes más tarde, se trasplantaron a macetas de 3lts con una mezcla 1:1 de sustrato comercial: tierra negra, se fertilizaron con DAP (fosfato diamónico) y se trasladaron a condiciones de invernáculo.

3.2. Evaluación fenotípica en condiciones de invernáculo.

Cuando las plantas obtenidas a partir de los cruzamientos realizados contaban con un año de edad, se realizaron las determinaciones de los caracteres morfológicos en condiciones de invernáculo, que incluyeron las siguientes variables enumeradas en la **Tabla 8**: número de macollos vegetativos, número de macollos reproductivos, número de panojas, diámetro de corona. El objetivo fue seleccionar los materiales que se evaluarían a campo y determinar si los datos medidos en invernáculo se correlacionaban con los datos medidos a campo. Para ello se utilizó el análisis de correlación de Pearson, utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

Este análisis permitió seleccionar los fenotipos superiores para ser evaluados en condiciones de campo. Como criterios de selección se utilizaron el número de macollos vegetativos y reproductivos y el diámetro de la corona y se seleccionaron aquellos fenotipos contrastantes respecto a las variables medidas al azar. Estas plantas seleccionadas con el fin de la obtención de clones, se dividieron en dos, se las dejó crecer y luego se la dividió de nuevo en dos, obteniendo cuatro clones de cada planta para llevar a campo con un diseño de cuatro bloques completamente aleatorizados.

Tabla 8. Variables morfológicas evaluadas en la progenie del cruzamiento de *E. curvula*, OTA USDA x Tanganyika USDA, en condiciones de invernáculo.

Abreviatura	Variables	Descripción
DC	Diámetro de corona (cm).	Se midió el diámetro mayor y el diámetro menor con una regla (en centímetros) y se calculó el promedio.
NMR	Número de macollos reproductivos (Conteo).	Se contó el número de macollos reproductivos por planta.
NMV	Número de macollos vegetativos (Conteo).	Se contó el número de macollos vegetativos por planta.
NP	Número de panojas (Conteo).	Se contó el número de panojas por planta.

4. Cuarta Etapa. Campo.

4.1. Establecimiento de las plantas seleccionadas a campo.

El ensayo fue establecido en el Centro Científico Tecnológico CONICET de Bahía Blanca (Buenos Aires) (38° 39' 53,0'' S; 62° 13' 57,2'' O) y estuvo conformado por 4 clones de 50 genotipos seleccionados en invernáculo, más 4 clones de cada uno de los progenitores Tanganyika USDA y OTA USDA, sumando un total de 204 plantas; las mismas fueron dispuestas en un diseño en bloques aleatorizados simples y completos. La orientación de los bloques en el terreno fue de suroeste a noreste. Las plantas de cada bloque se sembraron distanciadas a un metro unas de otras (**Fig. 3**).

	Bloque 1			Bloque 2				Bloque 3				Bloque 4			
6	16	21	M	29	7	25	34	39	12	33	19	30	24	19	35
26	34	15	48	13	20	1	23	41	3	45	14	50	22	32	42
46	9	5	43	35	49	10	P	21	8	2	29	39	12	47	10
20	1	13	P	3	15	28	36	40	50	31	11	36	41	17	27
28	4	42	45	44	4	43	48	37	35	24	18	2	M	49	31
47	30	24	39	30	50	16	14	34	32	16	25	40	18	46	8
5-0	25	7	11	3	19	11	26	41	23	6	44	17	4	33	29
33	19	22	37	9	22	17	2	P	47	10	7	48	37	6	38
40	27	50	12	24	32	45	40	26	49	43	1	34	21	P	14
38	44	18	2	M	8	5	37	20	13	28	30	45	15	9	23
31	35	41	17	21	39	47	18	22	48	45	42	28	26	43	16
23	14	10	35	42	31	27	33	5	27	M	9	11	1	25	3
29	6	49	32	6	12	45	38	15	35	4	38	20	13	7	44

Figura 3. Esquema de la disposición del ensayo de *E. curvula* en bloques completamente aleatorizados en el campo experimental situado en el Centro Científico Tecnológico CONICET – Bahía Blanca.

4. 2. Evaluación fenotípica en condiciones de Campo.

El ensayo se implantó en un suelo franco arenoso (64% arena, 15% limo, 21% arcilla), bajo riego por goteo, que se efectuaba una vez a la semana, sin fertilización. Se evaluaron 12 variables tales como diámetro de corona, peso seco de tallo, peso seco de hojas, producción de materia seca, relación hoja-tallo, número de macollos reproductivos, número de macollos vegetativos, número de panojas, altura de la planta, canopia, longitud de hojas, ancho de hojas, que corresponden a caracteres morfológicos asociados a producción de forraje y estado reproductivo (**Tabla 9**).

Tabla 9. Variables morfológicas evaluadas en 50 genotipos de *E. curvula* provenientes del cruzamiento OTA USDA x Tanganyika USDA, más los progenitores, creciendo en condiciones de campo.

Abreviatura	Variables	Descripción
DC	Diámetro de corona (cm).	Se midió el diámetro mayor y el diámetro menor con una regla (en centímetros) y se sacó el promedio.
PST	Producción de materia seca (gr).	Se tomó toda la producción debiomasa. se realizó un corte a 15cm de altura, se separaron las hojas y los tallos (considerándose a las inflorescencias en panojas), se secó en estufa a 60 °C durante 72 horas, obteniendo el PSH y PST, la PMS estimada por (PST + PSH).
PSH	Peso seco tallos (gr).	
PMS	Peso seco hojas (gr).	
H-T	Relación hoja-tallo.	
NMR	Número de macollos reproductivos (Conteo).	Se contó el número de macollos reproductivos por planta.
NMV	Número de macollos vegetativos (Conteo).	Se contó el número de macollos vegetativos por planta.
NP	Número de panojas (Conteo).	Se contó el número de panojas por planta.
AP	Altura de la planta (cm).	Se midió la altura, desde el suelo hasta donde llegaban las mayorías de las panojas de la planta.
C	Canopia (cm).	Se midió la altura desde el suelo hasta donde las hojas doblan naturalmente la mayoría de las hojas de la planta.
LH	Longitud de Hoja (cm).	Se midió desde la base de la lígula hasta la punta de la hoja, con una regla, en centímetros, la tercera hoja expandida con repetición de tres macollos vegetativos al azar.
AH	Ancho de hoja (cm).	Se midió en la base de la lígula con una regla, en centímetros, la tercera hoja expandida. Se realizaron tres repeticiones en tres macollos vegetativos elegidos al azar.

Antes de iniciar la evaluación correspondiente se realizó un corte de emparejamiento a una altura de planta de 15 cm. Todas las evaluaciones fenotípicas se realizaron a nivel de planta individual en todos los genotipos seleccionados y en los progenitores de la cruce.

5. Análisis estadísticos

A partir de la lectura de marcadores AFLPs en geles de poliacrilamida (siendo codificado con “0” a la ausencia, “1” a la presencia de bandas) se obtuvo una matriz de distancia genética binaria linealizada de datos moleculares y una matriz de distancia euclídea de variables morfológicas tomadas a campo. La significancia de la correlación entre matrices de distancia (molecular y morfológica) se evaluó utilizando el Test de Mantel, a través del programa estadístico GenAlEx 6.4 (Peakall y Smouse 2006). La significancia estadística se obtuvo a partir de 1000 permutaciones aleatorias. En cuanto al criterio de correlación del estadístico “r” se consideró un alto grado de correlación (alto grado de asociación entre las dos matrices analizadas) cuando los valores dieron cercanos a 1 ó -1.

El análisis de coordenadas principales es una técnica multivariada que permite visualizar la relación entre los elementos de la matriz de distancia genética, con el programa estadístico GenAlEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006).

El resultado de agrupamientos jerárquicos a partir de datos moleculares y morfológicos se muestran en dendrogramas en el que se pueden observar las uniones y/o divisiones que se van realizando en cada nivel del proceso de construcción de conglomerados, siendo especificado de antemano el número de grupos o conglomerados e identificándose con diferentes colores utilizando el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

En la evaluación de los resultados obtenidos a campo, se realizó la estimación de las medidas resumen. Para cada una de las variables morfológicas cuantitativas en condiciones de campo e invernáculo, se estimaron los valores medios, mínimos, máximos, desvíos estándar (D.E.), error estándar (E.E.) y coeficiente de variación (C.V.) en los genotipos evaluados. Luego se estimaron las diferencias entre los genotipos mediante el análisis de varianza (ANOVA). En caso de ser necesario las variables fueron transformadas con Ln o Raíz cuadrada a fin de cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. La comparación de medias fue realizada mediante el método de Mínima Diferencia Significativa (LSD) o Fisher, que al utilizar un α individual para cada par de comparaciones, permite detectar mayor número de diferencias entre los valores medios

de las plantas. Para este análisis se utilizó el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

Para cuatro variables seleccionadas, medidas en condiciones de invernáculo y campo (diámetro de corona, número de panojas, número de macollos vegetativos y número de macollos reproductivos) se calculó el coeficiente de correlación de Pearson,. El coeficiente de correlación muestral es el que representa la covarianza de los valores muestrales estandarizados. Asume valores en el intervalo [-1; 1] y el signo indica la dirección de la asociación. Se tomó el criterio de correlación baja, media o alta si el valor del estadístico “r” se encuentra entre los siguientes valores: Si $r < 0,3$, la correlación es baja (más cercano a cero no hay correlación entre las variables evaluadas); $0,3 < r < 0,6$ correlación media; $0,6 < r < 1$ correlación alta. Para este análisis se utilizó el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

Para describir y analizar observaciones multidimensionales obtenidas a partir de datos tomados en condiciones de campo, en cada una de las plantas seleccionadas y evaluadas en este entorno se utilizó un análisis multivariado. El análisis de componentes principales permite analizar la interdependencia de variables métricas y encontrar una representación gráfica óptima de la variabilidad de los datos de una tabla de “n” observaciones y “p” columnas o variables; tratando de encontrar, con pérdida mínima de información, un nuevo conjunto de variables (componentes principales) no correlacionadas, que expliquen la estructura de variación en las filas de la tabla de datos medidos a campo. Para este análisis se tuvieron en cuenta los genotipos seleccionados como criterio de clasificación y nueve variables medidas, tales como, diámetro de corona, canopia, altura de la planta, número de macollos vegetativos, número de panojas, peso seco de hojas, peso seco de tallos, longitud de hojas y ancho de hojas. Se realizó un dendrograma a partir de la distancia euclídea calculada en base a las variables morfológicas medidas en condiciones de campo. Para ello se utilizó el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa. Obtención de híbridos.

Es necesario aclarar que usualmente en pasto llorón lo que se denomina semilla es en realidad un fruto que recibe el nombre de “cariopse”. No obstante, el término semilla se utiliza en este trabajo debido a que el uso y costumbre ha impuesto dicha designación para identificar los frutos de muchas gramíneas. A partir de los 15 cruzamientos realizados en condiciones de invernáculo entre el progenitor femenino OTA, de reproducción sexual y tetraploide ($2n=4X=40$) y el progenitor masculino Tanganyika, apomíctico y también tetraploide ($2n=4X=40$) y luego del trillado manual de las las panojas se logró obtener un total de 2063 semillas, como se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Semillas obtenidas en cada uno de los cruzamientos de pasto llorón realizados entre el progenitor femenino OTA-S USDA, de reproducción sexual, y el progenitor masculino Tanganyika USDA, de reproducción apomíctica, ambos tetraploides.

Cruzamiento N°	Fecha	N° Semillas
1	20/09/2009	185
2	9/10/2009	45
3	23/10/2009	97
4	27/10/2009	220
5	27/10/2009	28
6	9/11/2009	190
7	20/11/2009	67
8	21/11/2009	160
9	26/11/2009	408
10	10/01/2010	108
11	10/01/2010	174
12	10/01/2010	107
13	3/02/2010	57
14	18/02/2010	37
15	1/03/2010	180
Total semillas obtenidas		2063

Estas semillas, como se especificó en los Materiales y Métodos, se sembraron en condiciones *in vitro* para su posterior germinación, con un seguimiento de dos meses, donde cada 15 días se contaba la cantidad de plantas normales o anormales, considerándose normales a las que presentaban raíz y tallo; las plantas sin raíz, es decir solo con parte aérea; las plantas sin tallo, es decir aquellas que solo tenían raíces; y las plantas necróticas, es decir aquella que no presentaban clorofila y sus hojas carecían de pigmentación verde y eran de color blanco / amarillento. La mayoría de las semillas implantadas germinaron a los 15 días de efectuada la siembra, disminuyendo la misma en los días posteriores, como se ilustra en la **Fig. 4**.

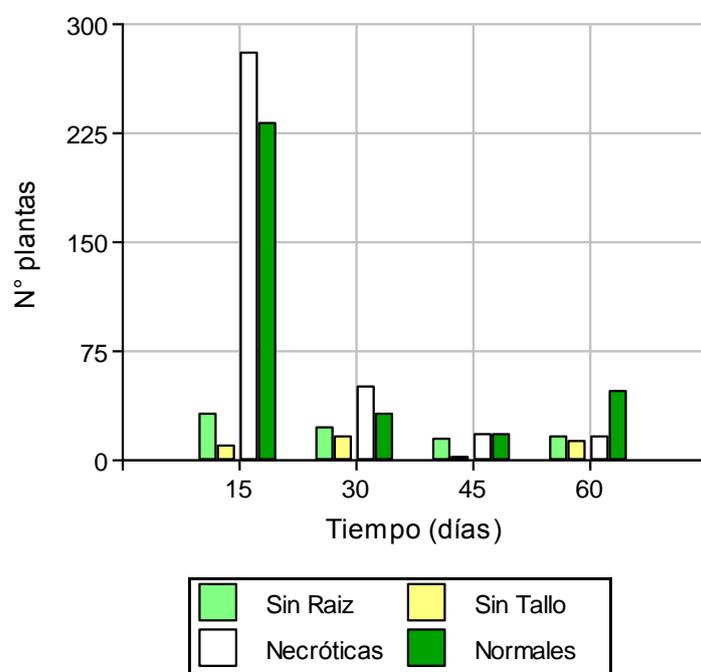


Figura 4. Germinación *in vitro* a lo largo del tiempo (días). Los datos se tomaron a los 15, 30, 45 y 60 días, discriminado en las plantas normales y anormales (sin raíz, sin tallo, necróticas sin clorofila).

Luego de 60 días se calculó el número total de plantas obtenidas, registrándose un porcentaje de germinación del 39,31%, el mismo se compone de 327 plantas normales (15,85%), 362 plantas necróticas sin clorofila (17,55%), 39 plantas sin tallo (1,89%), 83

plantas sin raíz (4,02%). Un total de 1252 semillas no germinaron, lo que hace un promedio de 60,69%, como se muestra en la **Fig. 5 y 6**.

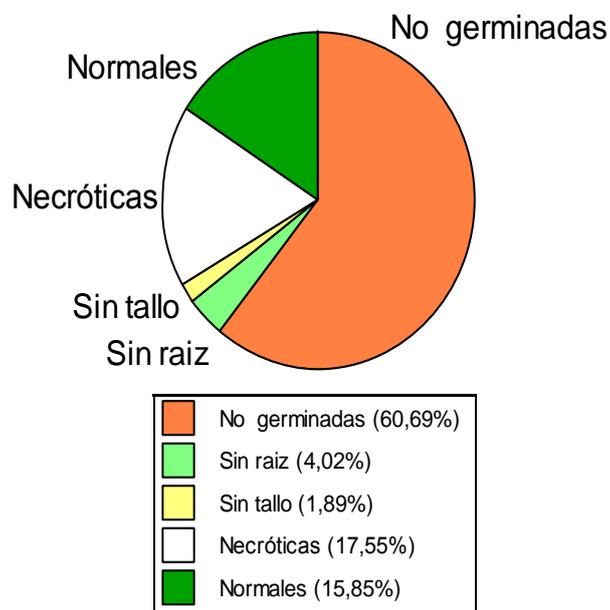


Figura 5. Valores totales de germinación *in vitro* acumulados a los 60 días luego de la siembra *in vitro*.

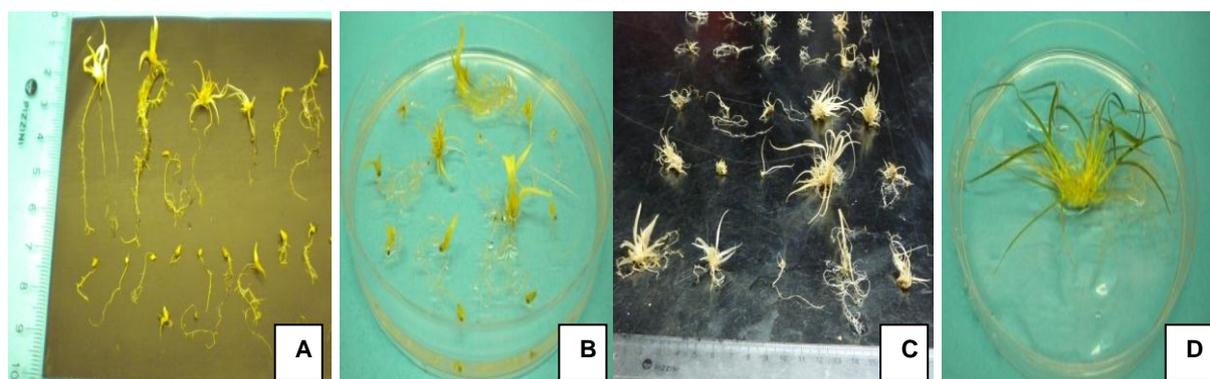


Figura 6. Semillas germinando *in vitro*. A, B y C plantas anormales (sin raíz, sin tallo, necróticas (sin clorofila); D) planta normal.

De aquí en más solo se trabajo con las plantas normales, ya que las anormales no sobrevivieron o fueron desechadas. Estos bajos porcentajes de germinación no son comunes en pasto llorón, al menos en condiciones controladas. El porcentaje de germinación para el cultivar Tanganyika INTA es, normalmente del 98%, de acuerdo a nuestros resultados experimentales.

Existen diferentes explicaciones a los resultados observados luego del cruzamiento entre OTA y Tanganyika.

Existen numerosas interacciones de orden ambiental e intrínsecas de las semillas que pueden afectar su germinación, dependiendo de la temperatura, humedad, luz y edad de las mismas; también puede ocurrir que las semillas sean incapaces de germinar debido a que no se satisfacen los requerimientos mínimos de humedad y temperatura necesarios para dicho proceso o simplemente como es frecuente en el pasto llorón es que las mismas se encuentren en un estado fisiológico de dormición; bajo esta circunstancia no germinaran aún cuando se den en el ambiente las condiciones favorables, ya que el estado de dormición en esta especie puede variar notablemente, conforme al cultivar y edad de la semilla, siendo su desaparición condición previa necesaria para que la germinación ocurra. Las semillas de pasto llorón despiertas, puestas en condiciones ambientales favorables, tienden a germinar a partir de las 48 horas de embebidas en agua (Montani y Fernandez, 1991).

En pasto llorón Polci (2000) encontró elevada mortalidad de plántulas obtenidas de plantas creciendo en invernáculo y con polinización libre. Su hipótesis es que existió necrosis híbrida debida a un incremento en la sexualidad en plantas luego del cultivo in vitro. Esto puede haber generado cruza no totalmente compatibles. En este caso, la explicación más probable es también la incompatibilidad entre los parentales.

Segunda etapa. Caracterización genotípica.

Una vez establecidas, se extrajo ADN de hojas jóvenes de las plantas normales a fin de proceder a determinar la naturaleza híbrida o no de las mismas. Para ello se utilizaron AFLPs y EST-SSR, se obtuvieron 691 marcadores de AFLP, de los cuales 317 fueron polimórficos. Estos se utilizaron en primera instancia para buscar la presencia de

marcadores paternos y analizar la variabilidad en las plantas obtenidas de la cruce. Los EST-SSR, con tres combinaciones de cebadores, se utilizaron para detectar bandas de origen paterno en las plantas hijas.

Con estos análisis pudo determinarse que, de las 232 plantas analizadas, solo seis resultaron de origen híbrido. A modo de ejemplo, en las Figs. 7 y 8 se muestra la amplificación de la banda paterna en dos de las seis plantas F1. Esto se obtuvo utilizando los tres cebadores de EST-SSR E16, E19 y E29. Específicamente en las Fig. 7 la amplificación es con el cebador E19. En la Fig. 8 se muestra similar resultado con AFLPs.

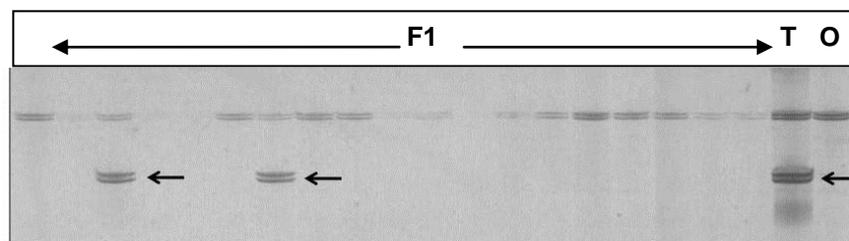


Figura 7. Microsatélites (EST-SSRs) obtenidos con el cebador E19, se muestran las bandas amplificadas en la F1 y en los progenitores, masculino Tanganyika USDA (T) y femenino OTA USDA (O). Las flechas señalan a aquellas plantas híbridas que presentan marcadores paternos.

Esto indicaría que el resto de las plantas se obtuvo por autofecundación del progenitor femenino OTA USDA. Esto fue un resultado inesperado, dada la autoincompatibilidad de este genotipo. Una explicación posible es que el polen masculino, si bien no fecundó a la planta sexual, habría ejercido un efecto mentor que condujo a la autopolinización de OTA.

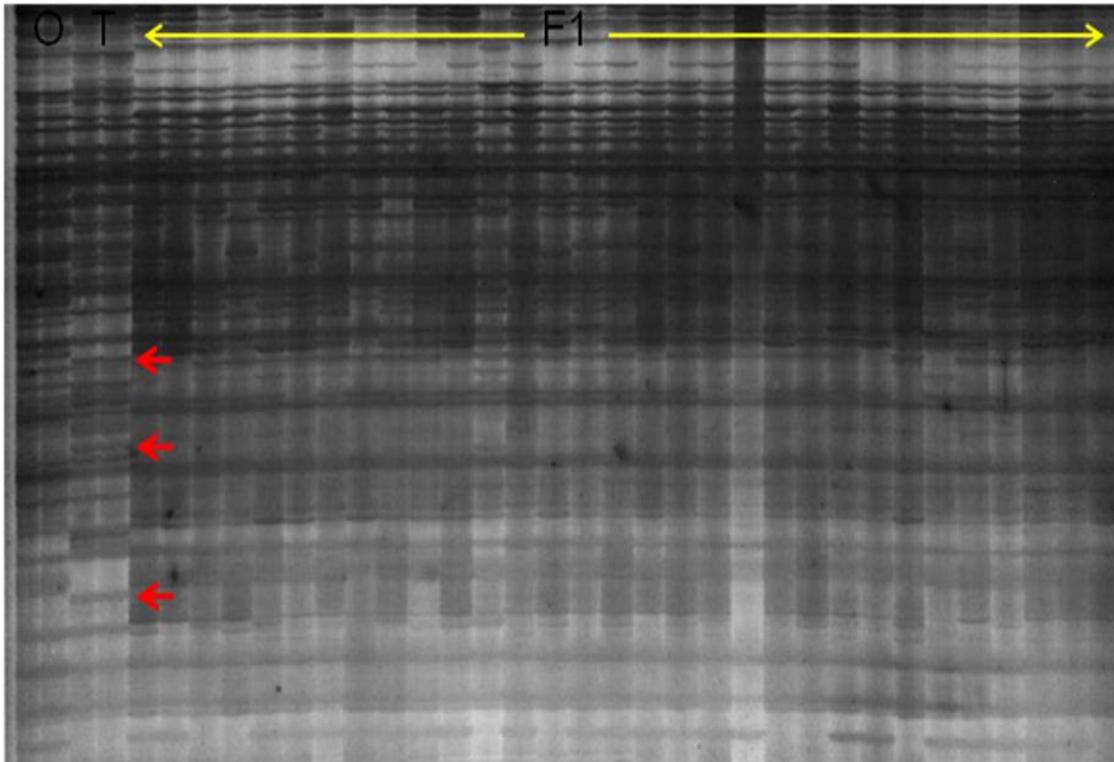


Figura 8. Marcadores AFLP (polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados), amplificados en los progenitores masculino (T) Tanganyika, femenino (O) OTA y en la progenie obtenida. Las flechas señalan a aquellas plantas híbridas que presentan marcadores paternos.

El segundo análisis fue realizado con el objetivo de buscar variabilidad dentro del complejo de plantas obtenidas, que si bien no fueron híbridas, eran el producto de reproducción de una planta sexual por efecto mentor del polen del progenitor apomíctico. En este caso se analizaron seis combinaciones de primers (P37-M39, P37-M43, P37-M45, P40-M38, P40-M43, P40-M45) de marcadores de AFLPs, con los cuales se obtuvieron 376 marcadores en total, de los cuales 330 resultaron ser monomórficos (87,76%) y 46 resultaron ser polimórficos (12,23%). En las **Fig. 9 y 10** se muestran dos geles típicos de poliacrilamida obtenidos. Cabe aclarar que en este análisis solo se utilizaron aquellas plantas no híbridas, dejándose las híbridas para otro objetivo que no fue parte de esta tesis y es la construcción de un mapa de ligamiento para ubicar regiones relacionadas al modo reproductivo del

pasto llorón. En realidad más tarde la mayoría de estas plantas se tornaron débiles y finalmente murieron,

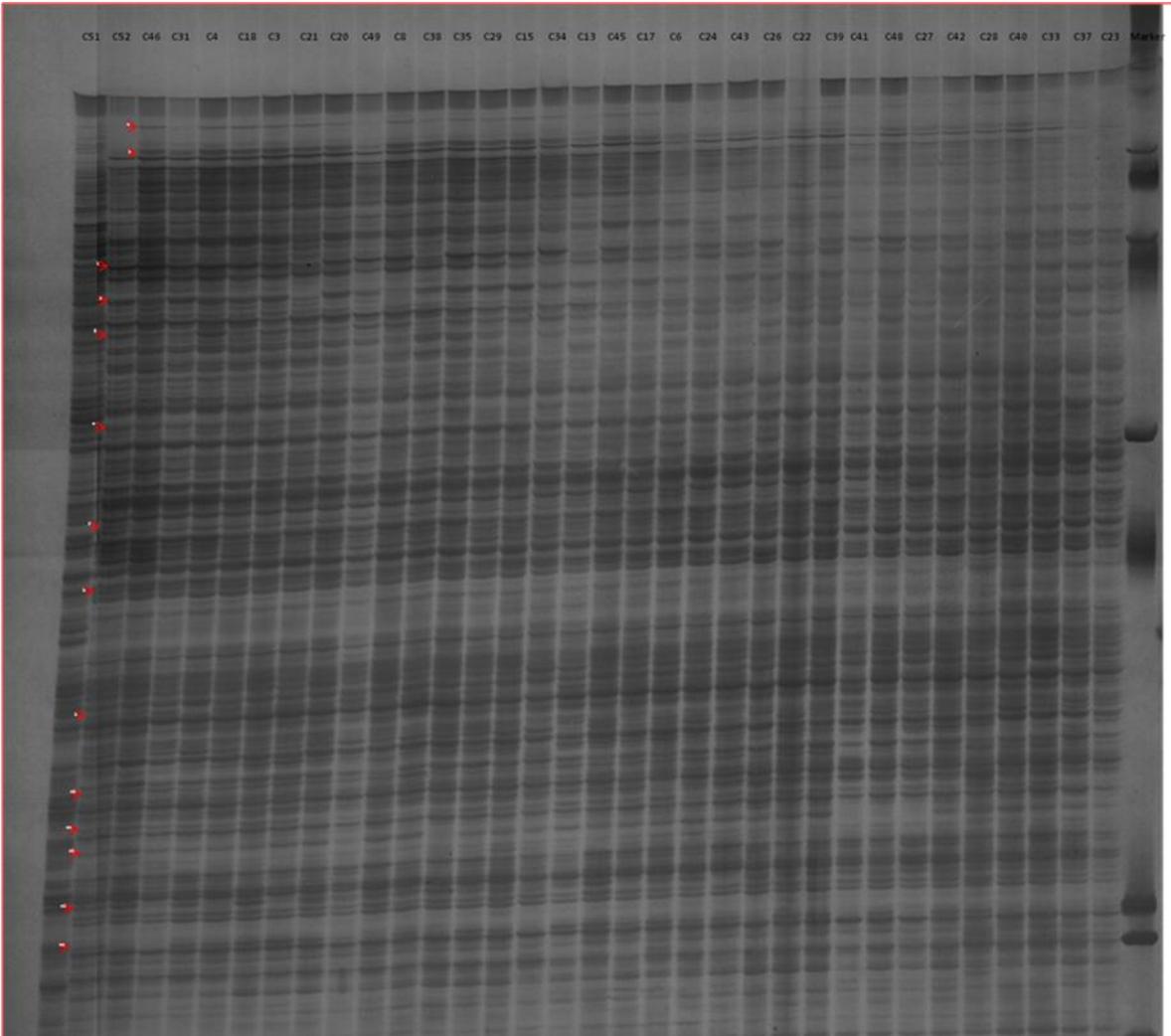


Figura 9. Marcadores de AFLPs amplificados en la progenie y progenitores (C51, Tanganyika USDA y C52, OTA USDA) correspondiente a la combinación de cebadores P40-M43. Las flechas indican la presencia de polimorfismos.

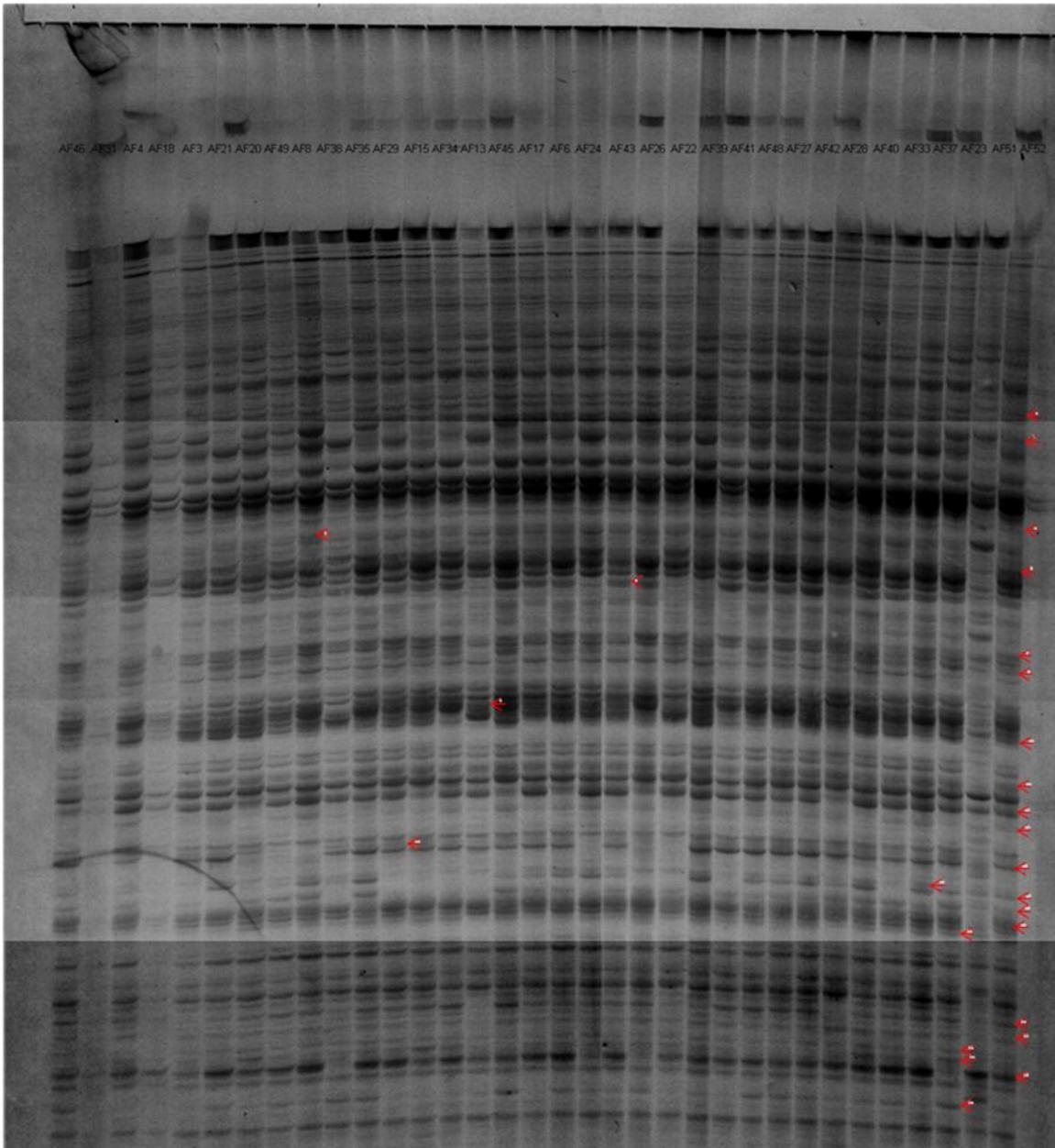


Figura 10. . Marcadores de AFLPs amplificados en la progenie y progenitores (C51, Tanganyika USDA y C52, OTA USDA) correspondiente a la combinación de cebadores P37-M43. Las flechas indican la presencia de polimorfismos.

El análisis de bandas haciendo uso del programa estadístico GenAIEx 6.4 (Peakall y Smouse 2006), correspondiente a la lectura de los geles de marcadores moleculares AFLPs, donde se consideraron solo los polimorfismos que resultaron de las siguientes cuatro combinaciones de primers: P37-M43; P40-M38; P40-M43; P40-M45, dio como resultado la presencia de cuatro bandas únicas en los hijos, ninguna banda única en los padres, 22 bandas compartidas entre los hijos y la madre y ninguna banda compartida entre los hijos y el padre. Esto suma un total de 46 bandas en los hijos, 20 bandas en el padre y 42 bandas en la madre, como se ilustra en la **Fig. 11**. Este análisis corrobora el origen no híbrido de la progenie obtenida, resultando ser progenie materna solamente. Dado que todos los análisis efectuados a la planta femenina indican claramente la ausencia de sacos apomíticos (Meier et al., 2011; Rodrigo, 2014), es evidente que esta progenie surgió de una autofecundación de la planta femenina bajo el efecto mentor del polen paterno.

En la mayoría de las plantas que se reproducen por apomixis gametofítica, el desarrollo partenogenético del embrión requiere de la fertilización de los núcleos polares, lo cual es denominado pseudogamia. Un hecho importante que se ha comprobado en las especies apomíticas de los géneros *Brachiaria*, *Paspalum* y *Panicum*, es que los genotipos sexuales son alógamos, con un alto grado de autoincompatibilidad, mientras que los apomíticos son autocompatibles. El pasto llorón, *Eragrostis curvula*, es una especie apomítica diplospórica y pseudógama. Nuestras evidencias indicarían que en esta especie las plantas sexuales son autoincompatibles ya que panojas ensobradas individualmente no producen semilla. Los resultados presentados en esta tesis indican que los cruzamientos de una madre tetraploide sexual (OTA-S) con un donante de polen tetraploide apomítico (cv. Tanganyika), presentan (utilizando AFLPs) descendientes que solo muestran marcadores maternos, indicando la existencia de autofecundación. Para que esto ocurra debería haber ocurrido una disrupción en el sistema de autoincompatibilidad en el genotipo sexual, que podría deberse a la presencia del polen del donante apomítico. Este fenómeno es conocido como efecto mentor y fue observado en especies apomíticas (Meier et al., 2012; Hörandl y Tensch, 2009). Los resultados demuestran que existe una ruptura de la autoincompatibilidad en pasto llorón, ya que la mayor parte de la progenie de los cruzamientos es producto de autofecundación, lográndose unos pocos híbridos entre OTA-S y Tanganyika. Actualmente se están evaluando distintas técnicas de emasculación para superar la autoincompatibilidad generada y lograr un mayor número de híbridos

(Meier et al., 2012). En *Elymus scabrifolius* se realizaron cruzamientos interespecíficos mediante cruzamientos dirigidos y rescate de embriones y se obtuvieron solo siete ejemplares de origen híbrido, eficiencia baja debido a la complejidad metodológica (Tomas; 2008).

Actualmente el grupo del CERZOS logró obtener híbridos de la misma planta madre, pero con otro progenitor masculino apomítico tetraploide de tipo conferta, Don Walter INTA.

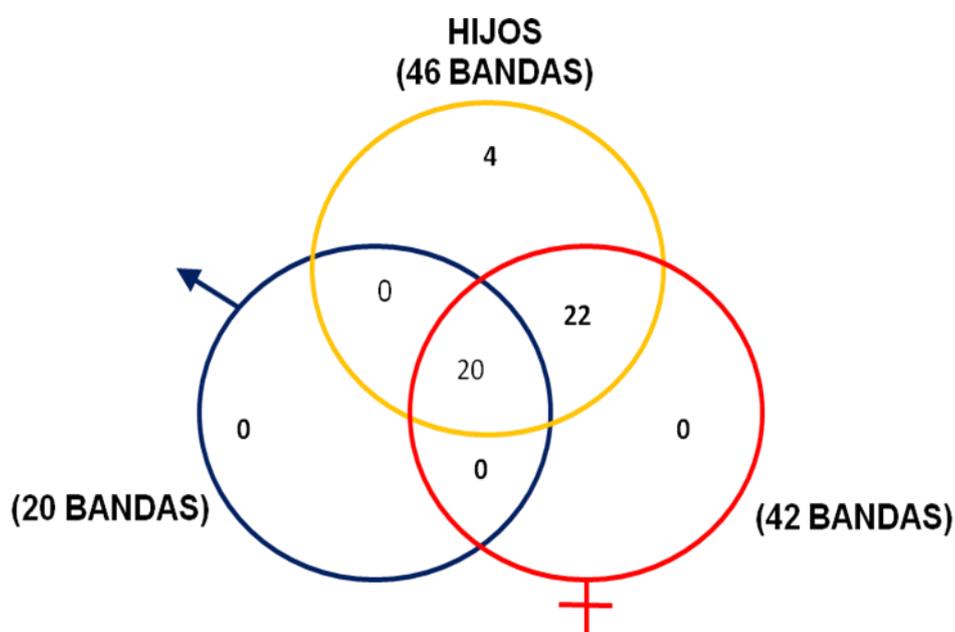


Figura 11. Diagrama de Venn correspondiente al análisis de bandas de AFLPs de pasto llorón (progenitores y progenie no híbrida) polimórficas obtenidas con cuatro combinaciones de primers (P37-M43; P40-M38; P40-M43; P40-M45), haciendo uso del programa estadístico GenAEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006).

El análisis fenotípico de caracteres cualitativos (pilosidad, coloración de las hojas y porte compacto o llorón), realizado en invernáculo, corroboró los resultados moleculares, dado que las plantas hijas presentaban un “porte de tipo conferta” y no de tipo curvula (porte llorón).

Similar porte materno fue observado en el campo.

En la **Fig. 12** se muestra el análisis de coordenadas principales, obtenido utilizando el programa estadístico GenAlEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006), a partir de los datos de los marcadores AFLPs. Este gráfico muestra que el parental masculino (51) se encuentra a una distancia considerable de las plantas hijas, que se encuentran agrupadas junto al parental femenino en un sector del gráfico, a excepción de la planta hija 18 que se muestra alejada con respecto a todos los materiales analizados.

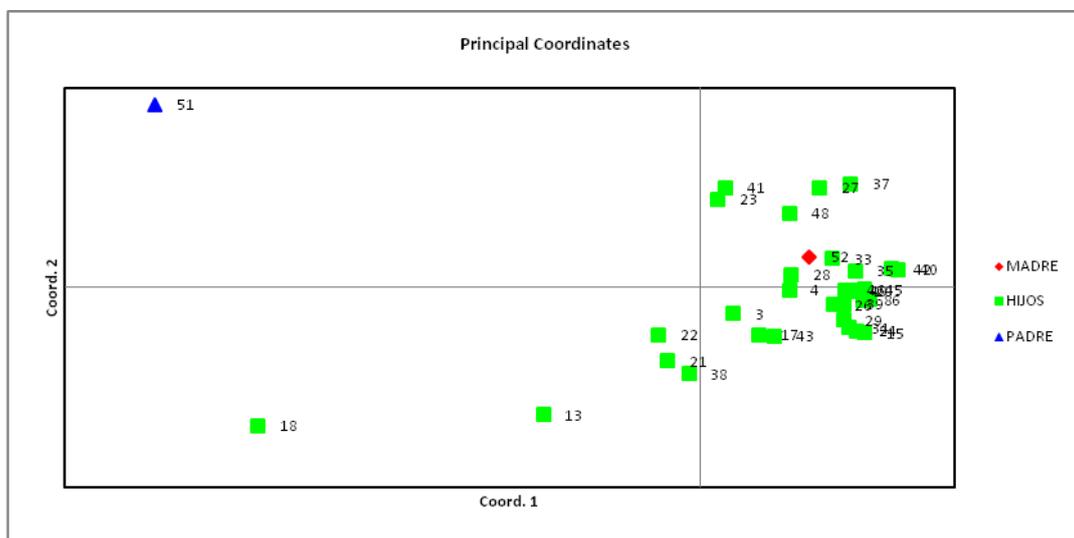


Figura 12. Análisis de coordenadas principales a partir de datos moleculares obtenidos de la lectura de productos de amplificación AFLPs de pasto llorón (progenitores y progenie) con algunas de las combinaciones de primers ensayadas (P37-M43; P40-M38; P40-M43; P40-M45), haciendo uso del programa estadístico GenAlEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006).

Este análisis corrobora los resultados anteriores, dado que la planta madre y los descendientes se parecen más y difieren del progenitor masculino, y plantea el interrogante acerca de las plantas 13 y 18. Dado que se trata de progenie materna la variación puede deberse a la recombinación y tal vez a otros factores generados por variables ambientales, tales como el movimiento de transposones y retrotransposones, que también responden a variables endógenas, como se ha demostrado en *Eragrostis curvula* (Rodrigo, 2014) y en otras especies de plantas (Dellaporta et al., 1984). En la primera

mitad del siglo XX, Barbara McClintock predijo cambios genómicos a gran escala como la activación de transposones y otras modificaciones estructurales en los cromosomas en respuesta a situaciones que causan estrés genómico. McClintock se refirió a distintos estreses que podrían causar reestructuración genómica generalizada, facilitada por la activación de transposones, la transposición de elementos móviles y la rotura de cromosomas - fusión - puente (McClintock, 1984). Este tipo de alteraciones en el genoma se suceden ante situaciones estresantes como el cultivo de tejidos, ataque de patógenos, cruzamientos interespecíficos, frente a estreses abióticos y en la separación de la línea germinal de los tejidos somáticos durante el desarrollo temprano. Aunque aún se carece de evidencia molecular directa y concreta, estamos empezando a comprender las respuestas moleculares del genoma inducidas por el estrés.

Podemos plantear aquí que la situación de estrés generada en la autofecundaciónr hibridación podría haber causado algunas diferencias en el genoma de algunas de estas plantas por reestructuración o transposición.

Con los mismos datos de marcadores de AFLP polimórficos y utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013) se construyó un Dendrograma UPGMA. Este análisis muestra la formación de cinco grupos: grupo 1 constituido por la planta madre (planta 52) y la mayoría de la plantas hijas; grupo 2 constituido por las plantas 13 y 38, grupo 3 constituido por el progenitor masculino (planta 51), el cual se encuentra más alejado de todas la demás plantas; grupo 4, constituido por la planta 18 y el grupo 5, constituido por la planta 21. El dendrograma se muestra en la **Fig. 13**.

Si bien, se trata de los mismos datos, los dos análisis empleados muestran diferente información. El primero nos muestra la dispersión de la variabilidad en función de dos coordenadas principales, mientras que el segundo análisis agrupa a las plantas en función de su distancia genética.

De cualquier manera ambos análisis corroboran el hecho de que las plantas obtenidas tienen mayor similitud y parentesco con el progenitor femenino.

La distancia entre ambos parentales podría ser entonces la explicación más plausible a la baja germinación de semillas y elevada mortalidad de plántulas.

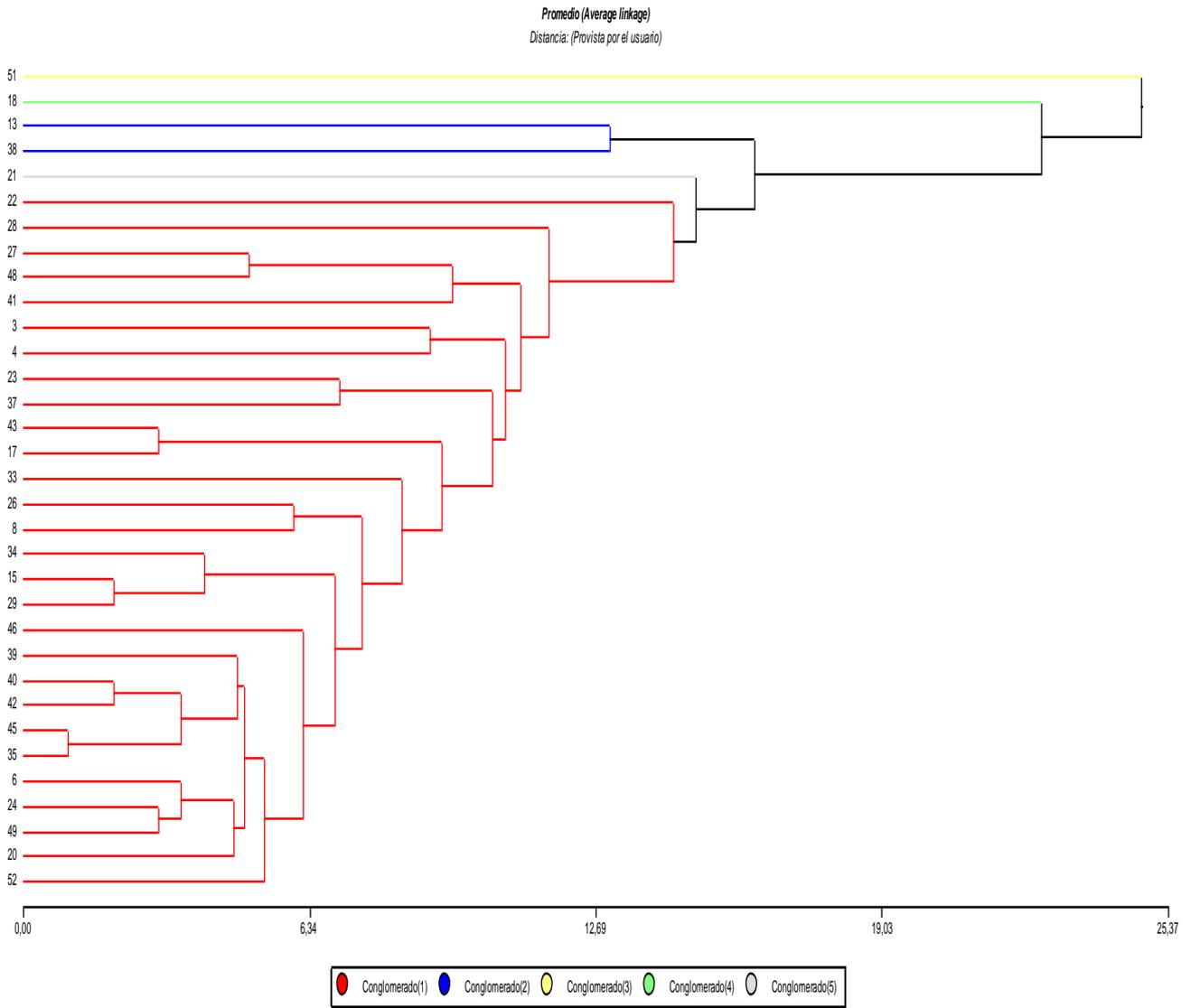


Figura 13. Dendrograma UPGMA generado a partir de la matriz de distancia genética binaria utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013) con las plantas progenitoras y la progenie de pato llorón y utilizando los marcadores de AFLPs polimórficos. Se observa la formación de cinco grupos.

El uso de marcadores moleculares para análisis de paternidad, identificación de híbridos y búsqueda de variabilidad se ha informado en numerosas especies (Li et al., 2001; Lowe et al., 2003; Jianli et al., 2006; Smith y Register, 1998; Antonova et al., 2006; Mingsheng et al., 2006; Nandakumar et al., 2004; Yashitola et al., 2002; Sundaram et al., 2008; Liu et al., 2007; Ilbi, 2003; Pendse et al., 2001; Beyene et al., 2005; Cavagnaro et al., 2006; Colomba y Gregorini; 2011). Este estudio, a través del análisis utilizando seis combinaciones de primers de AFLPs (P37-M39, P37-M43, P37-M45, P40-M38, P40-M43, P40-M45) se detectó la presencia de 376 marcadores en total, de los cuales 330 resultaron ser monomórficos (87,76%) y 46 polimórficos (12,23%). Resultados similares, aunque con distintos niveles de variación fueron obtenidos en otras especies, donde se han observado patrones de AFLPs variables, tales como en *Lolium perenne* L. “Perennial ryegrass”. En esta especie, con cinco combinaciones de primers fue posible obtener 222 bandas en total, de las cuales solo 56 resultaron ser monomórficas y 166 bandas polimórficas (Posset et al. 2006), mostrando mayor variabilidad que la observada en esta tesis con pasto llorón. En un estudio realizado con razas de maíz provenientes de Etiopía donde se analizaron ocho combinaciones de primers se obtuvo un total de 650 bandas, de las cuales solo 68 resultaron ser monomórficas y 582 polimórficas (Beyene et al., 2005). En *Bromus tectorum* o “cheatgrass” 13 combinaciones de primers dieron como resultado un total de 1200 bandas de las cuales 1169 resultaron ser monomórficas y solo 31 bandas fueron polimórficas (Ramakrishnan et al., 2004); en la especie forrajera nativa *Trichloris crinita* se utilizaron 24 combinaciones de primers de los cuales se obtuvieron un total de 1855 bandas y 925 bandas resultaron ser monomórficas y 930 bandas polimórficas (Cavagnaro et al., 2006); en *Poa arachnifera* Torr. se utilizaron 54 combinaciones de primers se obtuvieron 3756 bandas en total de las cuales 1215 bandas resultaron ser monomórficas y 2541 bandas polimórficas (Renganayaki et al., 2001); en *Elymus scabrifolius* se usaron 5 combinaciones de primers obteniendo 328 bandas en total de los cuales 278 bandas resultaron ser monomórficas y solo 50 bandas polimórficas (Tomas, 2008); en *Paspalum notatum* se usaron 5 combinaciones de primers y los patrones de bandas obtenidos fueron uniformes y coincidentes con el patrón materno en todos los individuos de la progenie de la cruce Q4008 x Q4012. La falta de polimorfismos entre los individuos de la progenie y la coincidencia de las bandas generadas con respecto al patrón de bandas de la madre indica que ambas poblaciones surgieron por partenogénesis en sacos embrionarios aposporicos (Rebozzio, 2009). En 163 accesiones de Avena cinco combinaciones de primers resultaron en 413 bandas polimórficas (Fu, 2008); en 60 accesiones de 10 especies del

genero *Hordeum* siete combinaciones de primers generaron un total de 339 bandas polimórficas (El Rabey, et al 2014); en 132 accesiones chinas del genero *Cynodon* se utilizaron 13 combinaciones de primers con los cuales se obtuvo un total de 763 bandas de las cuales 297 resultaron ser monomórficas y 466 bandas polimórficas (Wu, 2006). Esto indica que estos marcadores son útiles para estos fines, pero los niveles de variación obtenidos dependen de muchos factores, tales como la especie, el modo reproductivo de la misma, de la cantidad de combinaciones de primers, del objetivo del trabajo, etc.

Actualmente, los métodos de genotificación a gran escala permiten saturar completamente el genoma. Sin embargo, son costosos y requieren de adquirir el servicio, generalmente en el exterior. No obstante, para los objetivos de esta tesis, los análisis utilizando AFLPs fueron informativos y de gran utilidad para identificar híbridos y analizar la variabilidad de la progenie.

Tercera etapa. Evaluación en Invernáculo.

En una tercera etapa se procedió al análisis fenotípico. El análisis de correlación lineal de Pearson de los datos de cuatro variables morfológicas (NMR= número de macollos reproductivos, NMV= número de macollos vegetativos, NP= número de panojas y DC= diámetro de corona) registradas en el campo vs las mismas registradas en el invernáculo indicó la ausencia de correlaciones significativas. Los valores de “r” obtenidos en el análisis se muestran en la **Tabla 11**. Los mismos son cercanos a cero, indicando la mencionada falta de correlación.

Tabla 11. Coeficiente de correlación de Pearson entre los datos tomados a campo y en condiciones de invernáculo para cuatro variables morfológicas (NMR= número de macollos reproductivos, NMV= número de macollos vegetativos, NP= número de panojas y DC= diámetro de corona) (Infostat, Di Rienzo et al., 2013).

	NMR (C)	NMR(I)	NMV (C)	NMV (I)	NP (C)	NP (I)	DC(C)	DC(I)
NMR (C)	1	0,54	7,40E-11	0,81	0	0,54	4,90E-07	0,84
NMR(I)	0,09	1	0,08	0,45	0,57	0	0,32	9,00E-06
NMV (C)	0,79	0,26	1	0,13	2,10E-11	0,08	2,00E-10	0,19
NMV (I)	-0,04	0,11	0,23	1	0,85	0,45	0,45	0,11
NP (C)	1	0,09	0,81	-0,03	1	0,57	3,00E-07	0,84
NP (I)	0,09	1	0,26	0,11	0,09	1	0,32	9,00E-06
DC(C)	0,67	0,15	0,78	-0,12	0,68	0,15	1	0,22
DC(I)	-0,03	0,61	0,2	0,24	-0,03	0,61	0,19	1

Es común observar diferencias entre las plantas creciendo en condiciones de invernáculo y de campo. Si bien el invernáculo permite realizar primeras aproximaciones en diversos estudios de comportamiento vegetal, estas condiciones no permiten expresar el pleno potencial de las plantas. No existen condiciones de sequía, ni cambios de temperatura y si limitaciones al desarrollo radical cuando las plantas crecen en condiciones controladas. Por lo tanto, sobre todo si se trata de conocer el comportamiento de una planta que será introducida en un programa de mejoramiento, es menester realizar las determinaciones en condiciones de campo. De esa manera, tendremos una idea de su capacidad de crecimiento, su respuesta a los estreses ambientales, rendimiento y, en general, su potencial productivo.

Cuarta etapa. Evaluación a campo.

En la Tabla 12 se listan las variables morfológicas registradas en las plantas creciendo en condiciones de campo y los coeficientes de variación para las mismas.

Tabla 12. Coeficiente de variación para 11 caracteres morfológicos de pasto llorón registrados en condiciones de campo. El número de individuos analizados fue de 95 (Infostat, Di Rienzo et al., 2013).

Variable	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
DC	22,97	9,36	40,76	4,5	44
C	30,78	12,25	39,79	3	60
AP	51,17	21,14	41,32	4	114
NMV	303,08	264,88	87,4	7	1344
NMR	64,94	137,54	211,8	0	1164
NP	76,83	193,76	252,18	0	1746
PSH	86,31	97,48	112,93	0,6	527,1
PST	40,29	157,08	389,89	0	1164,6
PMS	126,6	230,98	182,45	0,6	1691,7
LH	26,79	8,86	33,07	10	49,3
AH	0,36	0,1	27,01	0,2	0,6

Este análisis evidenció un alto grado de variabilidad para todas las características morfológicas consideradas. La característica menos variable fue el ancho de hoja y la más variable el peso seco de tallo. También fueron altamente variables el número de panojas, el número de macollos reproductivos, la producción de materia seca y el peso seco de hoja. Esto indicaría que las posibilidades de utilizar esta variación para mejoramiento son muy buenas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, si en aquellas relacionadas con el rendimiento algún genotipo supera los valores del progenitor apomíctico. Generalmente las plantas apomícticas muestran mayores rendimientos que las plantas sexuales de la misma especie (Voigt, 1991). Sin embargo, identificar genotipos sexuales más vigorosos y con mejores características es importante para utilizarlos como plantas femeninas en los programas de mejora.

El análisis de comparaciones de medias mediante el método de Mínima Diferencia Significativa (LSD) o Fisher al utilizar un α individual por cada par de comparaciones permitió detectar mayor número de diferencias entre los valores medios de cada variable. Utilizando el método indirecto de calcular la relación H-T (Hoja-Tallo) en las plantas fue posible detectar aquellas plantas de mejor calidad, siendo estas las que presentaron una mayor proporción de hoja en relación a tallo. Estas fueron las plantas 28, 30, 15, 34, 18, 38, 45, en valores decrecientes de calidad, ya que presentaron los mayores valores de

medias, con diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al resto de las plantas analizadas. Las plantas de menor calidad, que fueron las que presentaron menores valores de relación Hoja-Tallo fueron las plantas 7 y 51. La última planta es el progenitor masculino. Esto indicaría que si bien los materiales apomícticos son más vigorosos, tienen una mayor producción de tallos, lo cual significaría que presentan mayor proporción de lignina, que es más abundante en los tallos y, por lo tanto, tienen menor calidad de forraje. Otros autores encuentran, proporciones elevadas de hojas en relación a tallos en pasto llorón (Leigh 1960; Shoop 1977; Laborde 1991). Sin embargo, de acuerdo a Laborde (1991) la incidencia de los tallos como depresores del consumo no resulta muy evidente en esta especie. Debido a su morfología, estos tallos no limitan en forma significativa el acceso a las porciones más foliosas de la planta, como ocurre en otras especies subtropicales. Sin embargo, durante el periodo reproductivo estas hojas pierden significativamente su calidad (Busso y Brevedan 1991).

En la variable peso seco de hojas, las plantas 38, 22, 51 (padre), 49, 18, 28, 8, 46 presentaron los mayores valores, con diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a las otras plantas analizadas. Las plantas que presentaron menores valores de peso seco de hojas fueron las 7, 1 y 26.

En cuanto a diámetro de corona, las plantas 49, 38, 22, 20, 33, 18, 28, 51 (padre), 13, 8, 31, 29, 46 presentaron los mayores valores, siendo las diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a las otras plantas analizadas. La planta 7 fue la de menor valor para esta variable.

Hasta aquí las plantas 38, 28 y 18 se muestran como muy promisorias para incluir en programas de mejora de la especie, presentando buena relación hoja/tallo, buen contenido de materia seca en las hojas y buen diámetro de corona.

La planta 51, es decir el parental masculino, apomíctico, fue la que presentó la mayor altura, evidenciando diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a las demás plantas analizadas. En el lado opuesto se encontró la planta 7.

La variable producción de materia seca total indica que las plantas más productivas fueron, en orden decreciente la 22, 38, 51, 49, 18, 8, 28, 46, 33, 34, 20, 41, 29, 11, 13, 4, 15, 48

siendo las diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a las otras plantas analizadas. Nuevamente, entre las plantas menos productivas se encontró la planta 7, seguida de la 1.

Siguiendo con el razonamiento anterior, nuevamente vemos en muy buenos lugares a las plantas 38, 28 y 18.

Para la variable largo de hojas las plantas 49, 38, 29, 28, 31, 22, 30, 4, 8, 15, 41, 34, 46, 11, 48, 18, 51, 45, 33, 20 presentaron los mayores valores, con diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a las otras plantas analizadas. La que presentó menor valor para esta variable fue la planta 5.

En relación al ancho de hojas las plantas 29, 28, 11, 45, 38, 33, 46, 18, 30, 4, 15, 20, 8, 49, 41, 42, 22, 13, 48, 50 presentaron los mayores valores mostrando diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a las otras plantas analizadas. Los menores valores correspondieron a las plantas 5, 7 y 1.

La caracterización de la variación genética es un paso previo a la aplicación de cualquier programa de conservación o de mejoramiento genético (Negi et al., 2000), a fin de poder realizar un mejor uso de los recursos disponibles y de planificar las estrategias de mejora en pasto llorón. Identificar plantas con caracteres superiores en relación a producción y calidad de forraje es de sumo valor. Algunas de las plantas analizadas en esta sección deberían ser tenidas en cuenta si se reactivaran los programas de mejoramiento del INTA en Anguil o San Luis.

El análisis multivariado de componentes principales arrojó los siguientes resultados, siendo la componente 1 la que explica el mayor porcentaje de la variación de las plantas analizadas (58,7%) y la componente 2 el 20,7%, como se muestra en la **Fig. 14**.

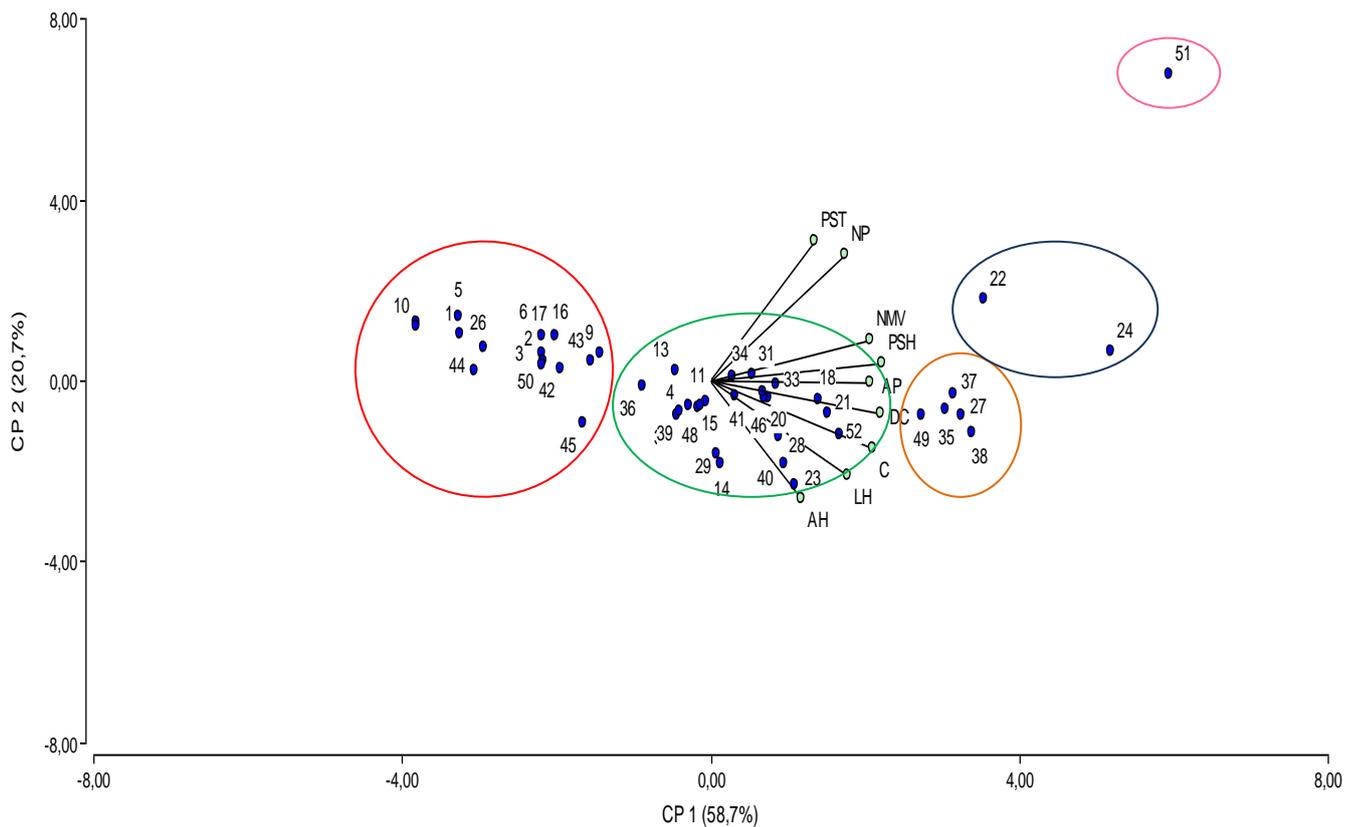


Figura 14. Análisis de componentes principales para los individuos parentales (51=Tanganyika y 52=OTA-S) y su progenie utilizando 9 variables morfológicas (Infostat, Di Rienzo et al., 2013).

Los círculos en el diagrama corresponden a los cinco grupos principales observados en el cluster. Las componentes 1 y 2 explican el 79,4% de la variabilidad total de los datos, mostrando una correlación cofenética de 0,978. Todas las variables, a excepción del ancho de hoja (62,7%), presentaron un porcentaje de reconstrucción superior al 70% (Anexo). Las plantas 51 (padre), 22 y 24 presentaron los mayores valores asociados a variables productivas mientras que las 10, 5, 11 y 44 presentaron los menores valores.

La **Tabla 13** muestra el análisis de correlación entre variables morfológicas en las plantas evaluadas para las dos primeras componentes principales (coeficiente de correlación cofenética= 0,978).

Tabla 13. Análisis de correlación entre variables morfológicas en las plantas evaluadas para las dos primeras componentes principales (coeficiente de correlación cofenética= 0,978).

Variables	CP 1	CP 2
DC	0,89	-0,18
C	0,85	-0,36
AP	0,84	-0,01
NMV	0,83	0,22
NP	0,71	0,67
PSH	0,90	0,09
PST	0,54	0,74
LH	0,72	-0,51
AH	0,48	-0,63

Coeficiente de correlación cofenética= 0,978

Esto indica la importancia del análisis considerando todas las variables en el análisis del potencial productivo de un genotipo. Si bien en el mismo las plantas 38, 28, 18, que se habían mostrado muy promisorias en el análisis individual, no están tan destacadas en este análisis, las mismas se muestran en la zona de los mayores valores en características relacionadas con su potencial productivo.

El dendrograma obtenido a partir de los datos morfológicos medidos a campo muestra el agrupamiento basado en UPGMA (encadenamiento promedio; unweighted pair-group method using an arithmetic average) a partir de la distancia euclídea (correlación cofenética 0,891). Así como se observó en el análisis de componentes principales, el padre se encuentra alejado de la progenie (Genotipo N°51). Las plantas hijas se encuentran subdivididas en cinco grupos principales, presentando los mayores valores de producción de materia seca las plantas 51, 24, 38, 22, 27,37, 49, 35 correspondientes al conglomerado 5, 2 y 3. Las plantas de mediana producción de materia seca se encuentran en el conglomerado 4 y las de baja producción las del conglomerado 1, se muestra en la **Figura 15**.

Si bien el primer análisis nos indicó que podíamos seleccionar tres plantas en función de sus indicadores indirectos de calidad y rendimiento, este análisis, donde se consideran

simultáneamente todas las variables, da resultados diferentes. Si desmenuzamos el análisis, podríamos pensar que si bien es cierto que el progenitor apomítico es más vigoroso que los materiales sexuales, la diferencia en la proporción hojas/tallos podría ir detrimento de la calidad, pasando a cobrar importancia aquellos materiales mejores en este aspecto. Otro tema a tener en cuenta es que hay que realizar varios análisis, con muchas repeticiones y trabajar en condiciones de campo, preferentemente en distintos ambientes, para llegar a conocer el verdadero potencial de las plantas a utilizar en programas de mejoramiento.

El disponer de gran cantidad de materiales de reproducción sexual es clave en este aspecto.

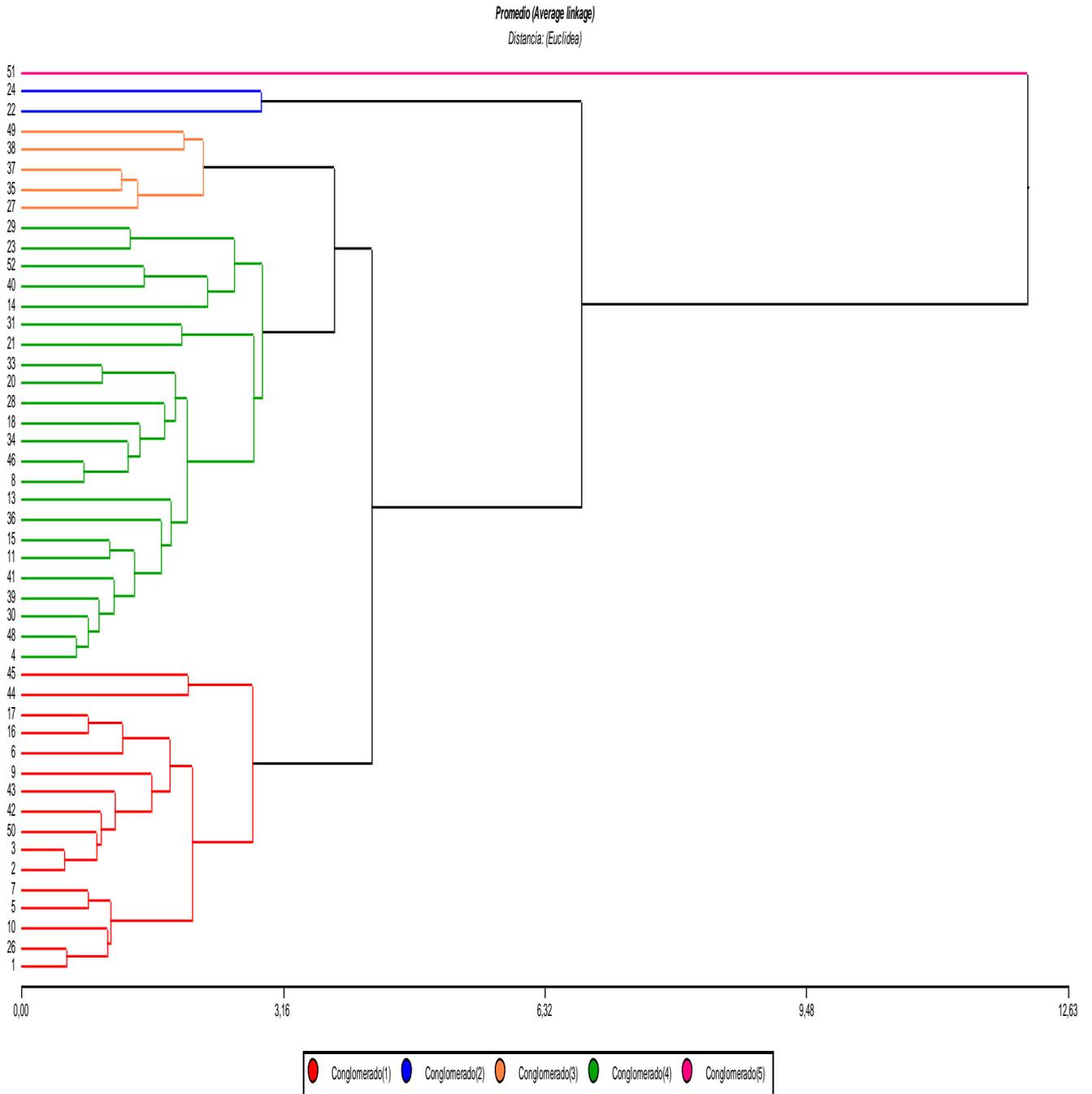


Figura 15. Dendrograma que muestra el análisis de agrupamiento basado en UPGMA a partir de la distancia euclídea (correlación cofenética 0,891) basado en datos morfológicos. Se utilizó el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

La significancia de la correlación entre matrices de distancia morfológica y molecular se evaluó utilizando el Test de Mantel, haciendo uso del programa estadístico GenAlEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006). El análisis de correlación entre la matriz de distancia genética de datos moleculares obtenidos a partir de la lectura de marcadores AFLPs en geles de poliacrilamida y la matriz de distancia de datos morfológicos de variables tomadas a campo, dio un valor de $r=0,017$ y un $p=0,338$, mostrando ausencia de correlación entre las mismas, pero esto no es estadísticamente significativo, como se ilustra en las **Fig. 16 y 17**.

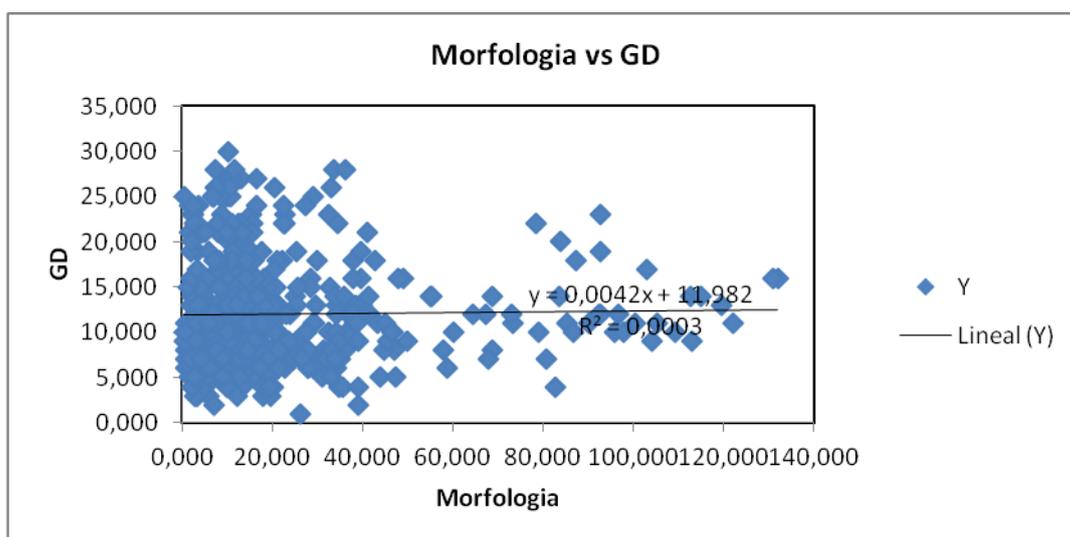


Figura 16. Correlación entre matrices de distancia genética y morfológica (Test de Mantel, $r=0,017$ y $P=0,338$, programa estadístico GenAlEx 6.4, Peakall y Smouse, 2006).

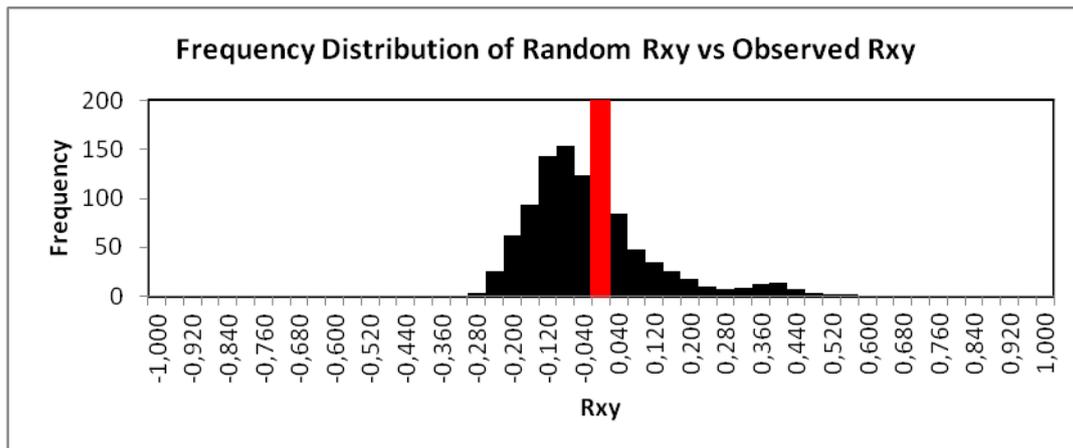


Figura 17. Distribución de la frecuencia del coeficiente de correlación “r” obtenidas por permutaciones aleatorias (999), se marca en rojo el valor de correlación observado a partir de las matrices originales. Usando del programa estadístico GenAlEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006).

Esta ausencia de correlación entre datos morfológicos y moleculares no significa que no la haya sino que el nivel de análisis es limitado por el bajo número de polimorfismos analizados. Por otro lado, en general, los polimorfismos se encuentran en regiones no codificantes del genoma, lo cual también podría explicar la ausencia de correlación. Esto podría solucionarse, en un análisis futuro corriendo más combinaciones de primers de AFLPs, de manera de encontrar bandas asociadas a los caracteres morfológicos investigados en esta tesis. Este es un estudio preliminar que debería profundizarse. También podrían utilizarse SNPs, pero esto implica otro nivel de desarrollo.

Otros autores han calculado, en diversas especies, la correlación entre matrices de distancia genética y morfológica, tales como el estudio llevado a cabo en maíces de Etiopía donde se evaluaron 62 accesiones, 15 variables agromorfológicas (peso de 1000 semillas, rendimiento (Kg/Ha), días de floración, días de floración femenina, altura de la planta, altura

de espiga, longitud de hoja, ancho de hoja, número de hojas, follaje, diámetro de espiga, días de maduración, hileras por espiga, granos por hilera, largo espiga) y 8 combinaciones de primers de AFLPs, obteniendo 582 (89,5%) bandas polimórficas. En este caso el test de Mantel arrojó valores de correlación de $r = 0,39$ con un $p = 0.001$, siendo significativa. Es decir que aún con mayor número de datos, la correlación fue media. Cuando se agregaron 20 loci SSR se obtuvieron mejores valores, con un $r = 0,43$ y un $p = 0.001$ (significativa) (Beyene et al., 2005). Tomás (2008), en *Elymus scabrifolius* evaluó 39 ejemplares y se utilizaron 8 combinaciones de cebadores AFLPs, que resultaron en 328 marcadores de los cuales solo 50 (15,2%) fueron polimórficos. Este autor tomó además 12 variables (Color de espigas, habito de crecimiento, pilosidad de lámina, color de cariopsis, longitud de macollo, nudos por macollo, longitud del último entrenudo, días de espigazon, densidad de espiguillas, densidad de antecios, relación lemma.gluma, relación cariopsis-lemma). Encontró, que la correlación entre matrices con datos morfológicos y moleculares era baja y no significativa. Esta correlación se estableció utilizando el test de Mantel ($r = -0,17$; $p = 0,7810$). En *Trichloris crinita* Cavagnaro et al., (2006) evaluaron 20 morfotipos, con 24 combinaciones de primers AFLPs y obtuvieron 930 bandas polimórficas (50,13%) de un total de 1855 bandas, se midieron 7 variables en plantas individuales (producción de biomasa, longitud de hoja, ancho de hoja, diámetro basal, número de cañas, altura de hoja, altura de tallo) y, utilizando el mismo test, obtuvieron correlaciones significativas ($p = 0.002$) pero de signo negativo ($r = -0,43$), ya que surge de la comparación de la distancia Euclidea y los valores de similaridad de Jacard. Ayele et al., (1999) utilizando 4 cultivares de *E. tef* y 14 accesiones de *E. pilosa* y marcadores AFLPs, con 11 combinaciones de primers, obtuvieron 858 marcadores de los cuales 397 (43,5%) resultaron polimórficos y se midieron 13 variables (forma y estructura de la panoja, color lemma, color tallo, color de antera, color de semilla, días de emergencia, días del ciclo, número de cañas, longitud de panoja, altura

de la planta, número de entrenudos, peso de cañas, peso fresco y seco de forraje). Estos autores hallaron baja correlación entre variables morfológicas y moleculares, con valores de $r=0,22$ y $p\leq 0.01$).

Otros autores en varias especies, trataron de correlacionar los datos de marcadores AFLP y microsatelites (SSR) utilizando el Test de Mantel y arrojaron los siguientes resultados en 20 genotipos de *Lolium perenne* L. "Perennial ryegrass" y cinco combinaciones de primers AFLPs y 23 primers SSRs obtuvieron una moderada correspondencia entre los marcadores AFLPs y SSRs con $r= 0,57$ y $0,32$ $p=0.001$ (significativo) (Posset et al., 2006); en cinco variedades de *Triticum turgidum* L. subsp. Durum (Desf.) utilizando 8 combinaciones de primers de AFLPs (12,77% de polimorfismo) y 9 de SSRs (28,57% de polimorfismo), el test de Mantel detecto una correlación elevada de ($r=0,92$) entre ambos tipos de marcadores moleculares (Colomba y Gregorini, 2011); en *Bromus tectorum*, "Cheatgrass" se utilizaron 13 combinaciones de primers de AFLPs y siete cebadores de SSRs y se obtuvo un total de 1200 marcadores AFLPs de los cuales 31 (2,3%) fueron polimórficos; la correlación AFLP y SSR dio significativa ($r=0,4636$ $p=0.0001$) (Ramakrishnan et al., 2004).

Como indicamos más arriba, dependiendo de la zona en que caigan los marcadores en el genoma existirá o no correlación entre los mismos.

En nuestro caso, los EST-SSR solo se utilizaron para confirmar la presencia de bandas paternas en la progenie. Es posible que no hubieran dado buenas correlaciones dado que los EST-SSR, como su nombre lo indica, fueron diseñados a partir de un transcriptoma,

que representa la región codificante del genoma. Los AFLPs, sobre todo los más polimórficos generalmente derivan de regiones no codificantes, de allí su mayor variación.

CONCLUSIONES

Como corolario podemos decir que este trabajo no permitió la obtención de plantas híbridas de pasto llorón, por lo tanto, no se cumplió la primera hipótesis, pero se obtuvieron resultados interesantes que se pueden resumir de la siguiente manera:

- 1) Se determinó que los parentales, si bien poseen el mismo nivel de ploidía, son incompatibles. El bajo nivel de germinación observado (39%), las plantas anormales obtenidas, la mortalidad y escasos híbridos (solo seis) serían una prueba de ello, corroborado por la distancia genética entre ambas plantas obtenida por marcadores moleculares y características morfológicas.
- 2) Se estableció que, para obtener una población de mapeo por modo reproductivo es menester utilizar parentales genéticamente más cercanos.
- 3) Se demostró entonces que los tipos *curvula* y *conferta* no son compatibles. Resultados similares fueron informados por Voigt (1991).
- 4) Se demostró en pasto llorón el efecto de polen mentor para romper la autoincompatibilidad en materiales sexuales.
- 5) Se obtuvo una población de plantas caracterizadas por marcadores moleculares y caracteres morfológicos.
- 6) Se observó que, con la profundidad de este análisis, que no fue muy elevada, no hubo correlación ya entre datos morfológicos y moleculares, determinada por el test de Mantel, con un $r=0,017$ ($P=0,338$),
- 7) Las plantas hijas fueron parecidas a la madre aunque algunas la superaron en caracteres de interés.
- 8) se observó variabilidad a nivel molecular, en caracteres morfológicos y agronómicos.

- 9) Se identificaron algunas plantas con características promisorias para utilizarlas en programas de mejoramiento de la especie.

CAPITULO 2:

**Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en
Eragrostis curvula (Schrad.) Nees “pasto llorón”.**

INTRODUCCIÓN

Por medio del mejoramiento clásico las plantas cultivadas han sido manipuladas genéticamente por el hombre en cuanto a sus características fenotípicas de interés. Estas están determinadas por genes y son transferidas a la progenie a través de cruzamientos. Sin embargo, estos métodos convencionales de mejoramiento se enfrentan a una serie de problemas, como una reducción del pool génico, incompatibilidad sexual y un determinado tiempo requerido para que se transfieran los caracteres deseables a los cultivares de interés, pudiendo durar décadas en especies bianuales, perennes y en especies altamente heterocigóticas (Brasileiro y Carneiro, 1998).

La aplicación de herramientas de biología molecular permitió la producción de plantas con nuevas características, las que no podrían haber sido introducidas por las técnicas de mejoramiento tradicional, debido en muchos casos, a incompatibilidades entre las especies a ser cruzadas. Las plantas transgénicas o cultivos genéticamente modificados (GM) se sembraron comercialmente en 1996 y desde ese entonces su adopción global ha aumentado en forma consistente y con tasas sin precedentes en la historia de la agricultura. Esta rápida adopción, que creció de 1,7 a 125 millones de hectáreas en trece años, refleja la satisfacción del agricultor con los productos de la tecnología, que ofrecen varios beneficios, como la reducción de los costos de producción, mayor flexibilidad en el manejo de los cultivos, disminución en el empleo de insecticidas, mayor rendimiento y mejor calidad (Levitus, 2010); incremento de celulosa y/o biomasa total, una reducción en los niveles de lignina y/o un cambio en la composición de la misma, y la expresión de celulasas o ligninasas microbianas (Sticklen, 2006). De esta forma, los cultivos transgénicos pueden ser diseñados tomando en cuenta su uso posterior en procesos agrícolas e industriales (Boudet et al., 2003). En el 2013 la distribución por país, según el Servicio para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA), 28 países sembraron 175,2 millones de hectáreas con cultivos transgénicos, ocupando Estados Unidos con 70,1 millones de hectáreas, Brazil 40,3 millones de hectáreas y Argentina 24,4 millones de hectáreas el resto por los demás países (**Figura. 1**).

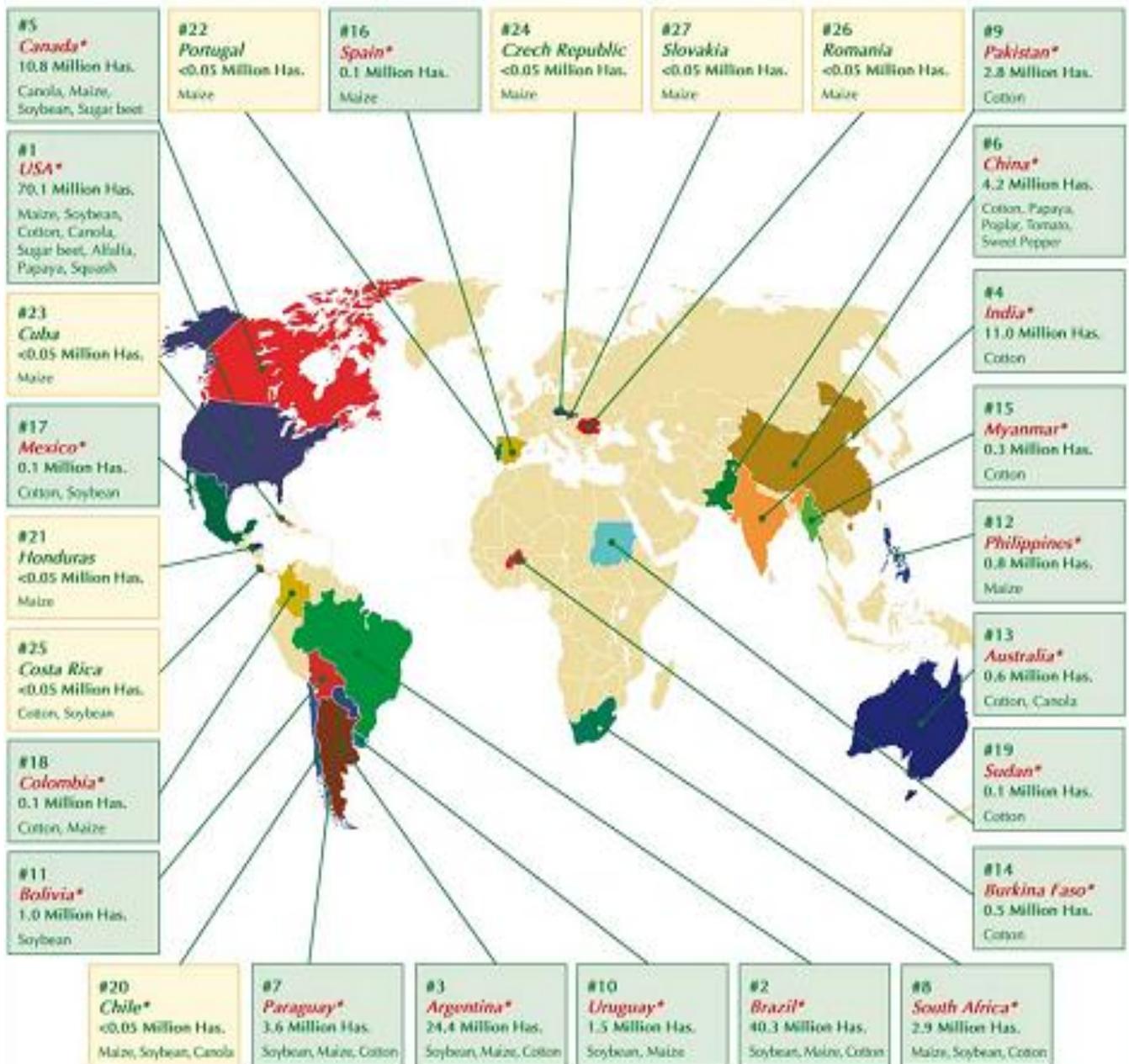


Figura. 1. Área cultivada con cultivos GM Biotech en 2013, por país, superficie en el mundo sembrada 175,2 millones de hectáreas. Fuente: ISAAA.

Reseña histórica

Desde 1981 a la actualidad, en solo 34 años se han logrado muchos éxitos en el campo de la transgénesis vegetal, que se resumen a continuación:

1981. Se obtienen los primeros callos vegetales transformados genéticamente.

1983. Se obtienen plantas de tabaco transformadas genéticamente.

1986. Se realizan ensayos de campo por primera vez, de plantas transgénicas resistentes a insectos, virus y bacterias, en EE.UU. y Europa. En EE.UU. la Agencia de Protección Ambiental (EPA) aprueba la liberación del primer cultivo modificado por ingeniería genética: tabaco.

1987. Se generan plantas transgénicas para resistencia a insectos (mediante proteína de *Bacillus thuringiensis*) y resistencia a herbicidas. También se obtienen plantas de algodón transgénicas, y se desarrolla la técnica de bombardeo génico.

1988. Se transforman genéticamente plantas de soja y arroz, y comienzan los ensayos a campo con las plantas de tomate transgénicas de maduración retardada desarrolladas por Calgene.

1990. Calgene conduce el primer ensayo de campo exitoso con plantas de algodón transgénicas (tolerantes al herbicida Bromoxynil), y Michael Fromm, reporta la transformación estable del maíz usando una pistola génica de alta velocidad.

1992. Se reporta la transformación estable de trigo. Alrededor de 400 ensayos de campo con cultivos transgénicos se realizan en todo el mundo. Ya se obtienen plantas transgénicas con composición modificada de hidratos de carbono, y de ácidos grasos.

1994. La FDA aprueba el primer cultivo genéticamente modificado utilizado como alimento: el tomate Flavr Savr. Para obtenerlo, se introduce el gen que codifica para la enzima poligalacturonasa en una disposición particular para que, al transcribirse, genere moléculas de ARN complementarias al ARNm de poligalacturonasa propio de la planta, impidiendo

así su traducción. Dado que dicha enzima es la responsable de degradar la pectina (componente de la pared celular vegetal que le da firmeza a la misma), los frutos de la planta de tomate transgénico Flavr Savr permanecen firmes por más tiempo, mejorando su uso en la industria alimenticia y su comercialización. Por otro lado, el USDA (Departamento de Agricultura de EE.UU.) y la FDA aprueban la soja tolerante a herbicida.

1995. La EPA (Agencia de Protección medioambiental de Estados Unidos) aprueba la soja tolerante a herbicida.

1996. Se aprueba la comercialización de los primeros cultivos transgénicos (soja, algodón y maíz) a nivel mundial. Particularmente en Argentina, se aprueba la comercialización de la soja tolerante a glifosato.

1998. En Argentina, se aprueba la comercialización de cultivos de maíz transgénico tolerante al herbicida glufosinato de amonio, y cultivos de maíz y algodón transgénicos resistentes a insectos lepidópteros.

2001. En Argentina, se aprueban para su comercialización cultivos de algodón transgénico tolerante al herbicida glifosato y otro maíz resistente a insectos lepidópteros.

2003. 7 millones de agricultores siembran 67,7 millones de hectáreas de cultivos GM en 18 países. Argentina ocupa el segundo lugar, con 14 millones de hectáreas de soja, maíz y algodón. La adopción asciende al 98%, 50% y 20% de las superficies totales para estos cultivos, respectivamente.

2004. Argentina autoriza el primer maíz tolerante a herbicida, anticipándose por primera vez en una aprobación regulatoria a la UE.

2005. En Argentina se aprueban, para su comercialización, un maíz transgénico con tolerancia a glufosinato de amonio y resistencia a lepidópteros, y otro tolerante a glifosato. Se cumplen 10 años de cultivos GM en Argentina. Los beneficios económicos a nivel nacional acumulados desde el comienzo de su adopción, en 1996; ascienden a 20 mil millones de dólares.

2006. Los cultivos GM alcanzan las 100 millones de hectáreas en todo el mundo.

2007. Argentina siembra maíz con características acumuladas (resistencia a insectos y tolerancia a herbicida) y Brasil autoriza un maíz GM por primera vez, iniciando una etapa de aceleración en las aprobaciones y en la adopción de transgénicos.

2009. Argentina siembra algodón con características acumuladas (resistencia a insectos y tolerancia a herbicida) y supera las 20 millones de hectáreas de cultivos GM. La adopción representa el 100% de la soja, el 98% del algodón y el 82% del maíz.

2010. Se cumplen 15 años de cultivos GM en la agricultura argentina. Los beneficios acumulados a nivel nacional alcanzan los 72 mil millones de dólares.

2012. Unos 17 millones de agricultores siembran 170 millones de hectáreas de cultivos GM en 28 países. Argentina ocupa el tercer lugar, con casi 24 millones de hectáreas de soja, maíz y algodón. Argentina autoriza la siembra comercial de maíces con cuatro y cinco genes acumulados para el control de malezas e insectos.

2013. El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca anuncia la renovación y modernización del marco regulatorio argentino para OGM, que acumula 5 aprobaciones comerciales en soja, 20 en maíz y 3 en algodón, además de más de 1.000 autorizaciones para ensayos a campo.

Actualmente el mejoramiento de plantas puede recurrir a las técnicas de Ingeniería genética. La combinación de técnicas de biología molecular, cultivo de tejidos y transferencia de genes representa una herramienta poderosa para introducir nuevas características (**Fig. 2**). Genes de diferentes especies vegetales, animales o microorganismos pueden ser introducidos de forma controlada en un genoma vegetal receptor, de fecundación independiente. La fuente de estos genes es la variabilidad genética existente en la naturaleza. Por lo tanto, su utilización en el proceso de transformación de plantas exige un desarrollo de la investigación básica en biología molecular y celular. Un determinado gen responsable del carácter de interés debe ser localizado y aislado de los demás genes. Luego este gen será caracterizado e introducido en vectores para la transformación de plantas (Brasileiro y Carneiro, 1998).

Para la obtención de una planta transgénica es necesario disponer de:

1. Un sistema eficiente de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas y fértiles.
2. Vectores apropiados, que permitan el clonado del gen de interés y su transferencia al tejido blanco de transformación.
3. Un protocolo de transformación, es decir, un sistema de transferencia de genes y de selección del material transformado.
4. Herramientas de análisis molecular para detectar la presencia del transgen y los productos del mismo en la planta.

Resulta importante destacar que para lograr una planta transgénica deben ocurrir tres procesos en una misma célula:

- a) El transgen debe ser transferido al interior de la célula,
- b) El transgen debe integrarse al ADN celular y
- c) Se debe regenerar una planta completa a partir de la célula transgénica en la que se verificaron los procesos **a** y **b**.

Dado que las células tienen diferente competencia o capacidad de respuesta para cada uno de estos procesos, la puesta a punto de un protocolo eficiente de transformación genética requiere maximizar la cantidad de células competentes para todos ellos de manera simultánea. (Diaz. et al., 2010).

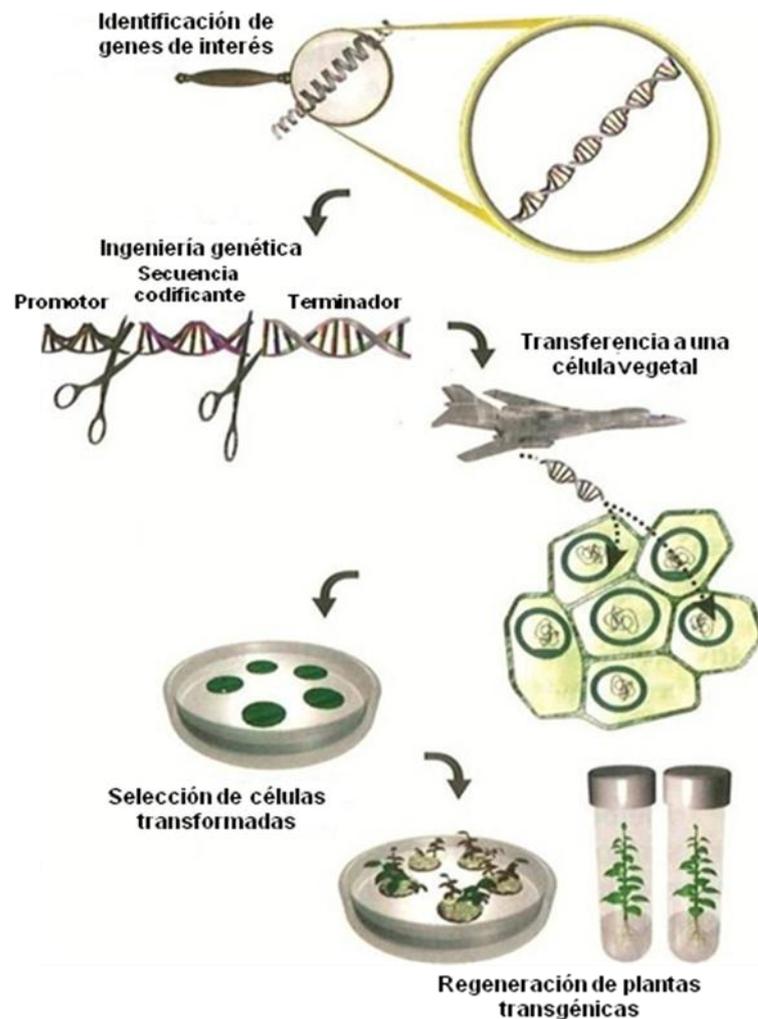


Figura 2. Esquema de las diferentes etapas necesarias para la obtención de una plantas transgénicas (Modificado Brasileiro y Carneiro, 1998).

La totipotencialidad celular fue enunciada por Haberlandt en 1902, quien propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas, este fenómeno permite que las plantas transgénicas sean obtenidas de células originalmente transformadas con un ADN exógeno. La totipotencia es la potencialidad que presentan las células vegetales de originar nuevas plantas. Los avances en la investigación sobre los reguladores de crecimiento vegetal y el cultivo de tejidos en muchas especies de interés agronómico han permitido la obtención de plantas regenerantes a partir de una única célula vegetal. La pared celular constituye un obstáculo para la entrada del ADN a la célula que todos los métodos de transformación genética tienen que superar de algún modo.

Existen distintos métodos de obtención de plantas transgénicas, estos han sido desarrollados para poder transferir y expresar genes de interés en plantas. La transferencia de los mismos se realiza principalmente por medio de métodos biológicos (vectores bacterianos ejemplo: *Agrobacterium tumefaciens* o virales) o por transferencia directa (métodos físicos como bombardeo con microproyectiles (**Tabla 1**), electroporación de protoplastos, etc.

Tabla 1. Comparación de técnicas de transformación más utilizadas en plantas (Diaz. et al., 2010).

	<i>Agrobacterium</i>	Método biolístico
Especies a transformar	dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas	sin limitaciones
Eficiencia de transformación	Alta	Baja
Tipo de integración en el genoma vegetal	aleatoria en regiones con transcripción bajo número de copias independientes precisa	Aleatoria multicopia en tándem imprecisa
Construcción de vectores	Compleja	Simple
Dependencia del genotipo	Mayor	Menor
Construcción de vectores	compleja	Simple
Dependencia del genotipo	Mayor	Menor

1) Métodos directos de transferencia de genes

a) Transformación de protoplastos

La introducción y expresión de ADN foráneo en protoplastos fue el primer método de transferencia directa claramente demostrado en plantas. Se disponía, para algunas especies, de procedimientos eficientes para la regeneración a partir de protoplastos, células que carecen temporariamente de pared celular que es la principal barrera para la introducción de ADN en las células vegetales. Los protoplastos pueden ser aislados en forma mecánica o por un proceso enzimático que digiere la pared. Así se obtiene una suspensión que contiene millones de células individuales lo que favorece la transformación de células aisladas. Los protoplastos pueden ser

transformados utilizando polietilenglicol (PEG), electroporación, microinyección o liposomas. La transformación de protoplastos mediada por PEG es el método más comúnmente usado. Tanto el PEG como la electroporación producen poros en la membrana plasmática por alteración de la polaridad de la misma y por ellos penetra el ADN foráneo. En el último caso se somete a los protoplastos a un campo eléctrico. Ambas técnicas permiten el tratamiento simultáneo de un gran número de protoplastos. La microinyección es un método difícil y laborioso que consiste en la introducción de ADN dentro de protoplastos individuales mediante el uso de capilares de inyección y micromanipulador y con esta metodología es posible lograr un alto grado de integración del ADN foráneo. Cabe notar que el cultivo de protoplastos es la metodología más sofisticada de cultivo *in vitro* de plantas por lo cual representa gran complejidad experimental y no está disponible más que para algunas especies y dentro de ellas particularmente en genotipos modelo. Por ello se desarrollaron metodologías alternativas de transformación directa como la electroporación de tejidos, el uso de fibras de carburo de silicio para facilitar la entrada del ADN a las células en cultivo y el bombardeo con microproyectiles o micropartículas siendo este último el más utilizado actualmente dentro de los métodos físicos. Se han logrado transformar diversas pasturas y forrajes con esta metodología, tales como, *Agrostis alba* (Asano y Ugaki, 1994); *Agrostis stolonifera* (Lee et al., 1996; Asano et al., 1998); *Dactylis glomerata* (Horn et al., 1988); *Festuca arundinacea* (Wang et al., 1992; Ha et al., 1992; Dalton et al., 1995; Kuai y Morris, 1996; Kuai et al., 1999); *Festuca pratensis* (Spangenberg et al., 1995); *Festuca rubra* (Spangenberg et al., 1994); *Lolium multiflorum* (Potrykus et al., 1997; Wang et al., 1997); *Lolium perenne* (Wang et al., 1997); *Panicum maximum* (Hauptmann et al., 1987); *Zoysia japonica* (Inokuma et al., 1998).

b) Bombardeo de micropartículas

Es un proceso por el cual micropartículas cubiertas con ADN son aceleradas por un gas comprimido e introducidas en células vegetales. Inicialmente la fuerza impulsora de las partículas estaba dada por pólvora, pero luego fue reemplazada por el sistema de helio comprimido que brinda una mejor regulación de la fuerza, distribución de microproyectiles y mayor reproducibilidad entre bombardeos. Se

utilizan microproyectiles de oro o tungsteno (químicamente inertes) cuyos tamaños van desde 0,5 a 3 μm , que al ser disparados a grandes velocidades pueden atravesar pared y membranas de la célula vegetal bombardeada sin causarle daños significativos (Klein et al., 1987). Como blanco de bombardeo se pueden emplear diversos tipos de explante vegetal, desde células o protoplastos hasta plántulas completas, pasando por tejidos organizados en embriones y meristemas. El explante es generalmente sometido a un tratamiento osmótico pre y post bombardeo que produce plasmólisis celular, evitando que el impacto y la penetración de las partículas dañen las células. Los vectores plasmídicos que se usan en este tipo de procedimiento solo requieren un origen de replicación que permita un alto número de copias de los mismos en *E. coli*, aspecto que facilita en la práctica la preparación del ADN necesario en grandes cantidades para la transformación genética por este método. Esta técnica, sin embargo, tiene limitaciones. Algunas especies oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Sin embargo, la principal limitación del método continúa siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente el transgen. A pesar de esta limitación, la versatilidad de la aceleración de partículas para introducir transgenes ha superado muchas de las barreras asociadas a otros métodos de transformación, como son el rango de huéspedes de *Agrobacterium* y las dificultades inherentes al cultivo y regeneración de protoplastos. Este método, conocido también como biolística o biobalística, se han logrado transformar diversas pasturas y forrajes, tales como, *Agrostis stolonifera* (Zhong et al., 1994; Hartman et al., 1994; Xiao y Ha, 1997; Chai et al., 2002; Dai et al., 2003; Guo et al., 2003; Wang et al., 2003); *Bouteloua gracilis* (Aguado-Santacruz et al., 2004); *Cynodon* sp. (Zhang et al., 2003; Li y Qu, 2004 Goldman et al., 2004); *Dactylis glomerata* (Denchev et al., 1997; Chao et al., 2001); *Dichanthium annulatum* (Dalton et al., 2003); *Eragrostis curvula* (Ncanana et al., 2005); *Festuca arundinacea* (Spangenberg et al., 1995; Chao et al., 2000; Wang et al., 2001; Wang et al., 2003; Chen et al., 2003; Chen et al., 2004; Hu et al., 2005); *Festuca rubra* (Spangenberg et al., 1995; Spangenberg et al., 1998; Chao et al., 2000; Altpeter y Xu, 2000); *Lolium multiflorum* (Ye et al., 1997; Dalton et al., 1999; Ye et al., 2001 Petrovska et al., 2004; Li et al., 2004; Takahashi et al., 2005); *Lolium perenne* (Hensgens et al., 1993; van der Maas et al., 1994;

Spangenberg et al.,1995; Dalton et al., 1999; Alpeter et al., 2000; Xu et al., 2001; Petrovska et al., 2004; Hisano et al., 2004; Chen et al., 2005); *Lolium rigidum* (Bhalla et al., 1999); *Panicum virgatum* (Richards et al., 2001); *Paspalum notatum* (Smith et al., 2002; Gondo et al., 2005); *Poa pratensis* (Ha et al., 2001); *Psathyrostachys juncea* (Wang et al., 2004).

1) Métodos biológicos o indirectos

En este trabajo se utilizó el **método biológico de transformación mediado por *A. tumefaciens***, que es un eficiente vector en la Ingeniería genética de plantas, principalmente en dicotiledóneas. Estas bacterias transfieren naturalmente parte de su genoma a las células vegetales, en el momento de infección.

El DNA de *Agrobacterium* puede ser manipulado por Ingeniería genética, de manera de portar genes de interés. Una vez obtenido el vector que contiene los genes de interés este debe ser transferido a *Agrobacterium*. Existen tres metodologías de transformación de *Agrobacterium* más utilizadas. Estas son conjugación triparental, electroporación y choque térmico. Todos estos métodos presentan buena eficiencia de transformación. El método debe ser seleccionado dependiendo básicamente en los recursos disponibles de cada laboratorio. En este trabajo se utilizó el método directo de transformación por choque térmico (freeze-thaw), siendo el principio de esta metodología la permeabilización de la membrana de *Agrobacterium* en condiciones extremas de temperatura (de -186 a 37°C), permitiendo el pasaje del vector directamente a la célula receptora (Holsters et al., 1978).

En el proceso de infección de células vegetales, una agrobacteria se encargará de integrarlos al genoma vegetal. Son llamados Ingenieros genéticos naturales. La regeneración de esas células que contienen ese DNA exógeno dará origen a plantas transgénicas, transmitiendo un gen integrado a su progenie de forma mendeliana (Miranda Brasileiro A. C., 1998).

La clasificación de esta bacteria según Morrillo (2011) es la siguiente:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Proteobacterias alfa

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Agrobacterium*

Especie: *tumefaciens* (**Fig. 3**)

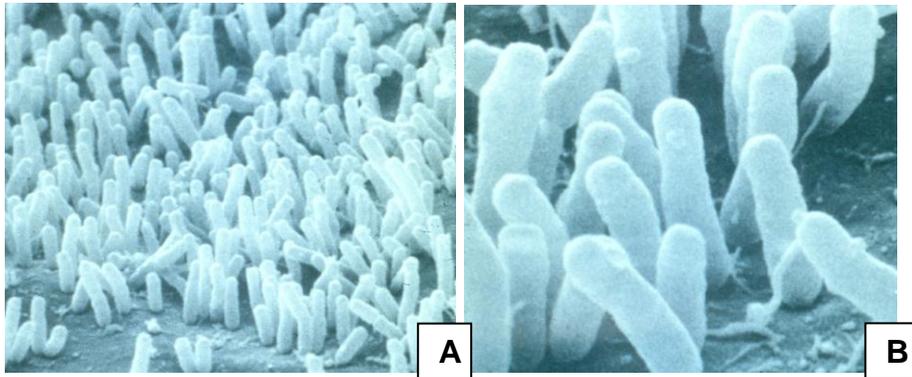


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de células de *A. tumefaciens* dispuestas sobre una superficie vegetal con diferentes amplificaciones (A y B).

A. tumefaciens es una bacteria Gram negativa, encapsulada con forma de bastón (bacilo) que no forma esporas pero posee de uno a cuatro flagelos laterales utilizados para su movilidad. Además, sus colonias en medio sólido (LB Agar) se presentan pequeñas, de color blanco, circulares y lisas; mientras que en suspensión presentan ligera turbidez con película fina. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango entre 25-28°C (Morillo, 2011).

El tamaño es de aproximadamente 0.6-1 μm de ancho y 1.6-3 μm de largo. Son bacterias aeróbicas y la mayoría de las cepas son capaces de crecer en bajas concentraciones de oxígeno en el interior de los tejidos de la planta. Estos organismos pueden utilizar y metabolizar un amplio espectro de carbohidratos, sales de ácidos orgánicos y aminoácidos. Mientras que algunas cepas usan fuentes de nitrógeno como las sales y nitratos de amonio, otras necesitan el aporte de aminoácidos y otros factores de crecimiento adicionales (Llop, 2003).

Las cepas de *Agrobacterium* patógenas contienen un plásmido que induce tumores, el cual se conoce como plásmido Ti. La enfermedad causada por esta bacteria se desencadena cuando genes específicos de este plásmido se transfieren al genoma del huésped y comienzan a codificar enzimas requeridas para la síntesis de fitohormonas que son sobreexpresadas en la célula vegetal, lo que provoca un aumento en la división celular (hiperplasia) y en el tamaño de las células (hipertrofia) que se traduce en la formación de un tumor, se muestra en **Figura 4** (Llop, 2003). Esta enfermedad se llama agalla de corona.



Figura 4. Tumores de *Agrobacterium* en los tallos.

Para entender como este organismo puede ser utilizado como un sistema biológico de entrega de ADN, se debe conocer su modo de acción *in vivo*. En los casos de transformación mediada por *Agrobacterium*, los genes de interés deben insertarse dentro del plásmido Ti, el cual posee un tamaño de 200-250 KB. Dentro del plásmido se encuentra el ADN-T flanqueado por dos repeticiones directas imperfectas de 25pb de longitud, esenciales para que ocurra la transferencia. Estos extremos no son funcionalmente similares, ya que, mientras una delección en el borde derecho anula la integración del ADN-T en el genoma vegetal, una delección similar en el borde izquierdo apenas afecta la integración. La razón de esto es el sentido de la transferencia de la región T, la cual comienza siempre por el borde derecho. Entre las secuencias bordes se encuentran los genes involucrados en la síntesis de opinas (amino azúcares que utilizan las bacterias como fuente de carbono y nitrógeno) y los genes que codifican para

fitohormonas, las que a través de cambios en la regulación metabólica provocan una proliferación celular desmedida en el tejido vegetal afectado.

En conjunto, los productos de estos genes producen tumores en la planta invadida y favorecen la multiplicación bacteriana. La remoción de estos oncogenes permite la morfogénesis normal de las células transformadas y al ser prescindibles para la transferencia del ADN-T pueden ser reemplazados por un sitio de clonado múltiple y un gen marcador seleccionable, lo cual permite disponer de vectores para transferir genes clonados de interés.

Por fuera de la región T, los genes están organizados en operones inducibles. Entre estos se encuentran: los genes de virulencia (vir A, B, C, D, E, F y G) encargados de la transferencia del ADN-T a la planta, los genes responsables del catabolismo de las opinas, los genes encargados de la interacción de la bacteria con la célula vegetal y los genes involucrados en el reconocimiento de diferentes compuestos fenólicos secretados por las plantas. Este punto es clave en la especificidad bacteria-huésped y por ello se lo tiene en consideración en el momento de la elección de la cepa bacteriana para obtener una transformación eficiente.

En *Agrobacterium* se desarrollaron dos tipos de vectores para la transferencia de genes: el vector co-integrado y el vector binario. El sistema del co-integrado se basa en la integración de los genes de interés en el plásmido Ti de la bacteria. Para formar este vector se introduce en *A. tumefaciens* un plásmido incapaz de replicarse en dicha bacteria pero que puede recombinar con el plásmido Ti por sitios de homología. En consecuencia, tanto la región *vir* como la portadora de los genes de interés (ADN-T) están presentes en el mismo vector. Sin embargo, la utilización de este sistema no es tan habitual debido a que presenta baja frecuencia de recombinación y los plásmidos co-integrados son de gran tamaño lo cual dificulta su manipulación.

Basándose en el hecho de que la región *vir* y el ADN-T no necesitan estar presentes en el mismo replicón para que la transferencia sea eficiente, se utilizan vectores binarios que permiten trabajar con dos plásmidos en lugar de hacerlo con uno de gran tamaño. Los dos componentes de este sistema cumplen los siguientes requisitos:

Un vector binario o de clonado contiene un origen de replicación funcional tanto en *Echerichia coli* como en *A. tumefaciens*; un marcador de selección funcional en ambas bacterias; el ADN-T con sus secuencias borde derecha e izquierda, este ADN-T contiene un gen marcador de selección funcional en las células vegetales y un sitio de clonado múltiple ubicado entre el borde derecho y el gen marcador seleccionable. Dado que la transferencia del ADN-T se inicia a partir del borde derecho, esta disposición garantiza que siempre que se haya integrado el vector lo haga el gen de interés (Hajdukiewicz, 1994).

El segundo componente de este sistema es un plásmido *helper* que contiene al plásmido Ti sin ADN-T, este provee las funciones necesarias para completar la transferencia del ADN-T desde el vector binario a la planta.

El proceso de transferencia del ADN-T, puede dividirse en una fase bacteriana y una fase celular (Reaam, 1989; Zupan y Zambryski, 1995).

Durante la fase bacteriana tienen lugar los eventos que conducen a la producción y exportación de un vector funcional que contiene al ADN-T (el complejo-T). En esta transferencia intervienen mecanismos similares a los encontrados en la conjugación bacteriana (Lessl y Lanka, 1994). Las heridas producidas en la planta liberan compuestos fenólicos como siringonas o acetosiringonas. Esto estimula a la bacteria a entrar en contacto con una célula vegetal, e inducen a los genes de virulencia (*vir*) que desencadenan el proceso de transferencia del ADN-T.

La fase celular, que transcurre en la planta, incluye aquellos eventos involucrados en la integración del ADN bacteriano al genoma nuclear. El ADN-T se encuentra flanqueado por dos bordes, derecho e izquierdo, que son regiones repetitivas de 25pb. Las secuencias de los bordes son los únicos elementos requeridos en *cis* para la transferencia. Fuera del borde derecho existe una secuencia (*ode*) que incrementa la eficiencia de transferencia (Peralta et al., 1986).

En este segmento (ADN-T) se ubican genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de factores de crecimiento (auxinas y citocininas), y nutrientes bacterianos (opinas). Estos genes serán controlados por secuencias regulatorias de la planta. Los genes involucrados en el proceso de transferencia no se encuentran en el segmento

transferido, sino en otro lugar del plásmido. Los genes *vir* pueden funcionar en *cis* o *trans*. Existen varios genes *vir*. Estos actúan de manera secuencial en el proceso de transferencia. Los genes *virA* y *virG* son reguladores que inducen la transcripción de otros genes. El gen *virA* se expresa constitutivamente. El proceso comienza cuando los compuestos fenólicos activan a la proteína *VirA*, la cual a su vez activa a la proteína *VirG* que estimula la expresión de las regiones virulentas (*virB*, *C*, *D* y *E*) que codifican proteínas involucradas en el proceso de transferencia. Las proteínas *VirD2* y *VirD1* escinden el ADN-T de simple cadena del plásmido Ti, debido a una actividad endonucleasa específica. Luego de este corte las proteínas *VirD2*, que protegen el borde derecho 5' durante el proceso de integración, permanecen covalentemente por una unión fosfotirosina. A partir del extremo libre 3' del plásmidoTi comienza la síntesis de una nueva cadena simple de ADN que termina cuando alcanza el extremo 5'. La cadena escindida (ADN-T) es la que participa en el proceso de transferencia (**Fig. 5**).

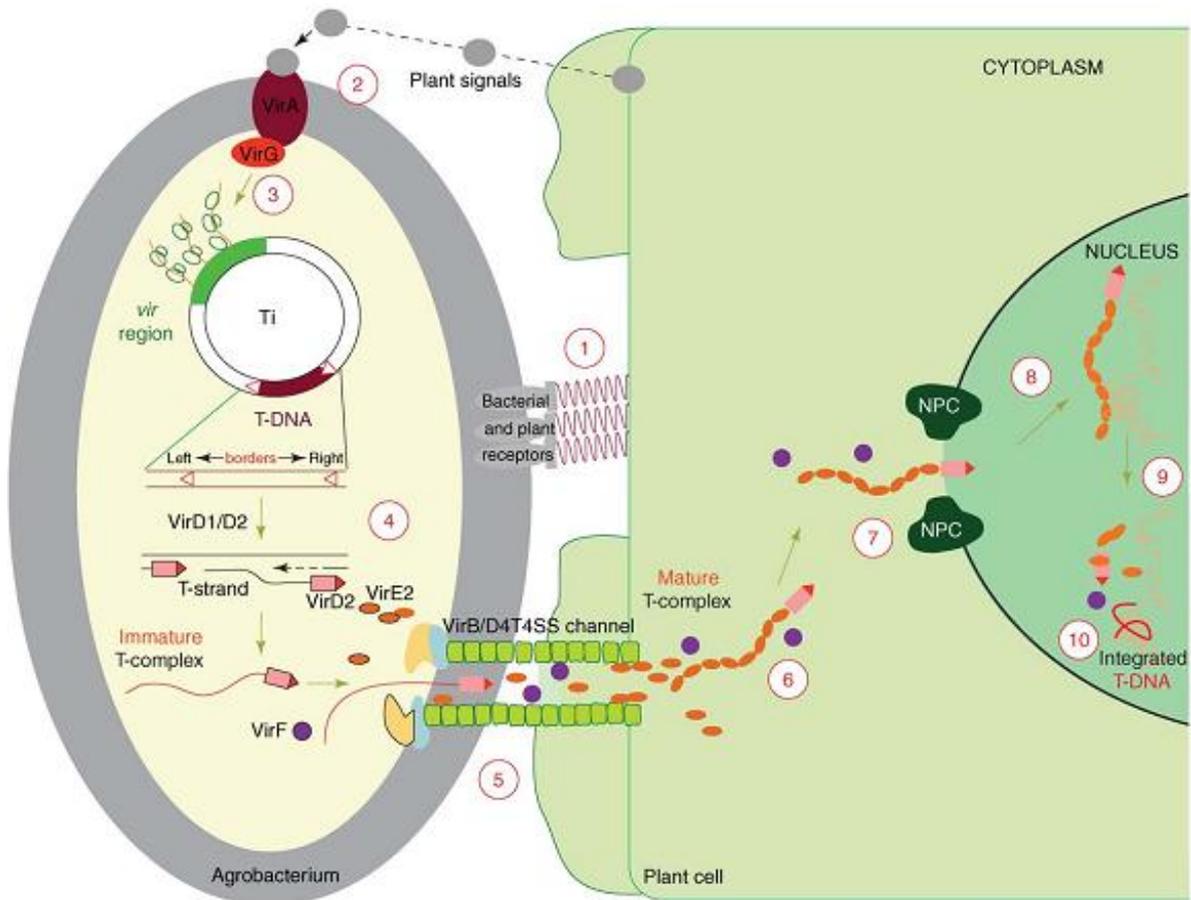


Figura 5. Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, comprende 10 pasos principales, (1) reconocimiento y fijación, (2) transducción de señales de dos componentes, (3) se genera una copia móvil del ADN-T, complejo de proteínas, (4) complejo T inmaduro junto con otras proteínas en el citoplasma de la Célula huésped (5), el complejo T maduro viaja a través del citoplasma de la célula huésped (6), se importa activamente en el núcleo de la célula huésped (7), una vez dentro del núcleo, el ADN-T es reclutado para el punto de integración (8), se despoja de sus proteínas (9), e integrado en el genoma del huésped (10) (modificado de Tzfira, 2004).

Este segmento es exportado a la célula de la planta a través de un canal, formado probablemente por proteínas VirB (11 proteínas VirB diferentes son codificadas por el

operón *virB*). A través de este canal migran también las proteínas *VirE2* (Binns et al., 1995) que se unen al ADN-T de cadena simple (aproximadamente 600 moléculas de esta proteína recubren al segmento), protegiendo principalmente el extremo 3' (Tinland, 1996). Las proteínas *VirD2* y *VirE2* posibilitan la entrada del ADN-T al núcleo. La asociación de *VirE2* con la molécula *VirD2*-ADN-T constituye el complejo-T. La integración del ADN-T no es específica de sitio, y no requiere de largas regiones de homología. Es por lo tanto un proceso de integración ilegítimo. Un modelo propone que la asociación entre el ADN de la planta y el ADN-T se inicia en el extremo 3' o secuencias adyacentes del ADN-T, donde hay una corta región de homología con el ADN vegetal (de al menos cinco nucleótidos contiguos al sitio de preinserción). El extremo libre del ADN vegetal está sujeto a la digestión por endonucleasas, que provocan pequeñas deleciones (13-73 pb) del ADN de la planta en el sitio de inserción. En el proceso intervienen enzimas vegetales, probablemente una ADN polimerasa, una ligasa, topoisomerasas y helicasas.

El borde derecho se une al ADN de la planta por una región donde encuentra homología en 1-2 pb (microhomología). En este proceso probablemente intervenga una ligasa que usa el enlace fosfotirosina, rico en energía, que unía *VirD2* al ADN-T. El extremo 3' del ADN-T de cadena simple es usado como iniciador para copiar el ADN complementario en la planta. Luego de este evento, el ADN-T queda definitivamente incorporado. Puede integrarse más de una copia de ADN-T en un sitio dado del genoma vegetal. Los patrones de integración son mucho más simples que cuando se introduce el ADN por métodos directos de transformación. El ADN integrado puede consistir en un monómero bien definido de ADN-T, de fácil interpretación, con escaso riesgo de expresiones inestables, que podrían ser causadas por recombinaciones o silenciamiento génico.

La integración del ADN-T en algún cromosoma vegetal ocurre al azar por recombinación no homóloga. De esta forma el gen de interés y el gen marcador de selección son integrados al genoma de la planta y pueden ser expresados en todos los tejidos vegetales, algunos de ellos no ser expresados, dependiendo de las secuencias regulatorias utilizadas y del sitio de inserción en el genoma.

En este trabajo se utilizó un vector binario que contiene el gen *bar*, el cual le da la resistencia al herbicida fosfinotricina o glufosinato de amonio, un agente selectivo sintético, que constituye el componente activo de varios herbicidas (Basta R, Liberty R, etc.) El

bialaphos es un antibiótico tripeptídico producido por *Streptomyces hygroscopicus*, que consiste en una molécula de GA y dos residuos L-alanina (Murakani, 1986). Este producto natural es un componente activo del herbicida Herbiace R, (Kondo, 1973). En las células vegetales, por acción de las peptidasas, el bialaphos se convierte en glufosinato de amonio (GA) el cual es un análogo de ácido-L-glutámico.

El glufosinato es un herbicida post-emergente, no selectivo, de contacto que inhibe en forma competitiva a la *glutamina sintetasa* (GS) (Wild y Manderscheid, 1984). Dicha enzima condensa ácido glutámico y amonio para formar el aminoácido glutamina. Esta es la vía principal de asimilación primaria y secundaria del nitrógeno en las plantas (Coruzzi y Last, 2000).

La inhibición de la GS provoca la acumulación de amonio en las células vegetales (Wild y Manderscheid, 1984 y Tachibana, 1986), así como también la carencia de aminoácidos cruciales para la planta, lo cual afecta la síntesis de proteínas (Bergamn *et al.*, 1976) e inhibe la fotosíntesis. Los síntomas de fitotoxicidad causados por el GA incluyen la clorosis del tejido tratado, seguida de necrosis que culmina, en el lapso de pocos días, con la muerte de las plantas (Ballinder *et al.*, 1987), colapsos de la epidermis y la ruptura y contorsión de las células del mesófilo internervales (Ullrich *et al.*, 1990).

El gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* codifica la enzima Pat (L-fosfinotricina-acetil-transferasa) (Strauch *et al.*, 1988 y Wohlleben *et al.*, 1988) la cual confiere resistencia al GA y al Bialaphos. El mecanismo de acción de esta enzima es la acetilación de L-glufosinato cuyo producto es N-acetil-l-glufosinato (De block *et al.*, 1987; Wohlleben *et al.*, 1988; Broer *et al.*, 1989 y Drogue *et al.*, 1992), con lo cual este análogo del ácido glutámico pierde su afinidad por la GS, su enzima blanco (Seto *et al.*, 1982) Pat es esteroespecífica para el L-isómero del glufosinato; el D-glufosinato en una mezcla racémica no es acetilado y al igual que el acetilglufosinato no es tóxico para las plantas. Un gen homólogo, el gen *bar*, que codifica también para la enzima Pat (Wohlleben *et al.*, 1988), fue aislado de *S. hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987). El gen *bar* ha sido introducido con éxito en numerosas especies. Para ello, la secuencia codificante correspondiente se clonó bajo el control del promotor CaMV 35S o derivados del mismo y se utilizó para la transformación de tabaco (De Block *et al.*, 1987), tomate (De Block, 1988), papa (Botterman y Leemans, 1989) y alfalfa (D'Halluin *et al.*, 1990) entre otros. Pruebas a

campo de plantas transformadas indicaron que la expresión del transgen confiere resistencia útil para fines agronómicos. Así, los transgenes *bar* o *pat* forman parte de cultivos transgénicos comerciales en varios países.

En este trabajo se ha empleado uno de los genes reporteros más utilizados, el gen *gus* o *uid A*, el cual es obtenido de la bacteria *Escherichia coli*. Este gen permite el monitoreo a corto plazo del resultado de la transformación genética a partir de la producción de color azul en los explantos transformados debido a la acción de la enzima β -glucuronidasa (codificada por dicho gen) sobre el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolylglucurónico, más conocido como X-Gluc. Esta prueba de expresión transitoria se realiza con la reacción histoquímica GUS, empleada como base para la estandarización de protocolos de transformación eficiente (De Guglielmo, 2009).

El ensayo presenta la ventaja que en la mayoría de las especies vegetales casi no se da actividad endógena GUS, por lo que los resultados obtenidos utilizando esta prueba en plantas transformadas son confiables y poseen alta sensibilidad. A pesar de esto, presenta la desventaja de ser destructivo, con lo que únicamente luego de la conversión de embrión a planta, es posible remover porciones de la planta para realizar el ensayo en órganos específicos y obtener un reconocimiento rápido de las plantas transformadas sin destruir el explante (Duque et al., 2007).

Existe otro gen reportero que no se ha empleado en este trabajo, es el que comúnmente codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), el cual cuando es expresado en células vegetales y éstas son iluminadas con luz ultravioleta, producen una fluorescencia verde brillante que es fácilmente detectada (Martínez et al., 2004). Este gen se aisló de la medusa *Aequorea victoria* y presenta muchas ventajas prácticas, ya que su expresión puede observarse en tiempo real en células vivas, no necesita suministrarse ningún sustrato para su expresión y además no destruye el tejido analizado, con lo que no compromete la viabilidad celular. Sin embargo, existen algunas limitaciones en su uso debido a que la autofluorescencia de la clorofila presente en embriones somáticos puede interferir en su emisión de fluorescencia (Duque et al., 2007).

Factores que afectan la expresión génica y la eficiencia de transformación

La eficiencia de transformación se puede aumentar mediante la manipulación de la planta, mejorando la competencia de sus tejidos o a través de las bacterias, manipulando el cultivo para una mejor inoculación (Henzi et al., 2000; Mondal et al., 2001; López et al., 2004; Chakrabarty et al., 2002). La edad de las plantas y el pre-cultivo de los explantos han sido manipulados para aumentar la eficiencia de transformación. Estos ensayos han sido realizados para determinar las mejores condiciones de la infección de las células vegetales o aumentar el número de células que se dividen de la planta antes de la infección bacteriana (Mets et al., 1995; Amoah et al., 2001; Chakrabarty et al., 2002).

Los factores para aumentar la virulencia de las bacterias tales como La temperatura (°C); el PH del medio y los inductores químicos tales como compuestos fenólicos ejemplo: acetosiringona (Le et al., 2001; Chakrabarty et al., 2002; Somleva et al., 2002; De Clercq et al., 2002; Lopez et al., 2004) también han sido investigados. La manipulación de otros factores, como la concentración de *Agrobacterium* (Densidad óptica), duración del co-cultivo y pre-cultivo bacteriano; la infiltración por vacío; surfactantes ejemplo: Plurónico F-68 tensioactivo, etc., también han aumentado la eficiencia de transformación en muchos ensayos (Cheng et al., 1997; Mondal et al., 2001; López et al., 2004; Amoah et al., 2001).

HIPÓTESIS

Es posible transformar pasto llorón utilizando *Agrobacterium tumefaciens* a fin de incorporar nuevos caracteres, suprimir funciones o validar genes de interés.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al mejoramiento del pasto llorón a través de la utilización de herramientas biotecnológicas tales como el cultivo de tejidos e ingeniería genética y disponer de una herramienta para validar genes, específicamente los relacionados con modo reproductivo.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Desarrollar un protocolo de transformación de pasto llorón mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para disponer de una herramienta para introducir o reprimir genes y también para validar genes, específicamente los relacionados con modo reproductivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las investigaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del CERZOS (centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida). El esquema de trabajo se muestra en la **Fig. 6**.

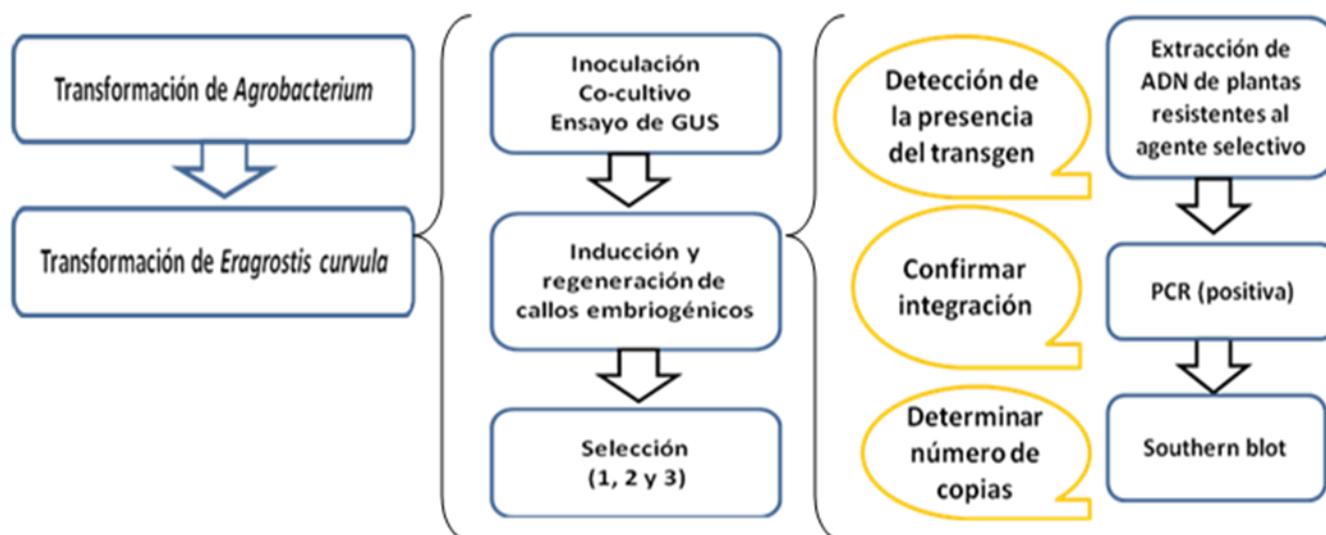


Figura 6. Esquema de trabajo para transgénesis.

A) Material vegetal

Se utilizaron tres cultivares de *E. curvula* (Schrad.) Nees nombre vulgar “Pasto llorón”, dos tetraploides apomícticos (Tanganyika y Morpa $2n=4X=40$) provenientes del Centro Regional Anguil La Pampa - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y uno hexaploide apomíctico facultativo (Kromdraai $2n=6X=60$) colectadas en el Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida del Centro Científico Tecnológico CONICET ubicado en Bahía Blanca provincia de Buenos Aires.

B) Cultivo de tejidos

1.Explantos

Se utilizaron cuatro explantos, a saber, 1) semillas maduras, 2) embriones maduros aislados, 3) callos embriogénicos (obtenidos a partir de semillas maduras) , 4) sección de meristema apical (obtenida a partir de semillas maduras germinadas durante 7 días en medio Murashighe y Skoog, 1962) y 5) semillas maduras germinadas *in vitro* durante cuatro días.

2.Esterilización

Las semillas maduras primero se lavaban con agua destilada varias veces a fin de remover la suciedad superficial antes de colocarlas en etanol al 70% durante un minuto y luego en hipoclorito de sodio al 8% adicionándole una gota de tween 20 por veinte minutos. Luego de esto eran enjuagadas tres veces con agua destilada estéril para asegurar que no queden restos de hipoclorito de sodio. Una vez finalizada la esterilización se iniciaba el proceso de cultivo *in vitro*.

3. Inducción de callos

Para la inducción de callos se utilizó el medio de Murashighe y Skoog (1962) sólido, del cual se tomaron 4,33gr/lit y se le adicionó 0,5gr/lit de hidrolizado de caseína, 30gr/lit de sacarosa, y se suplementó con 2mgr/lit de 2,4D y 0,01 mgr/lit de BAPg/lit , 160mgr/lit del bacteriostático timentina, PH 5.8. Como solidificante se utilizó agar a una concentración de 6gr/lit. Los cultivos se dejaban durante 30 días en cuarto de cultivo en condiciones de oscuridad a 25-27°C.

4. Regeneración de plantas

Los callos obtenidos (tratados o no tratados) eran transferidos al medio de regeneración de plantas cuya composición de sales Murashighe y Skoog (1962) fue de 4,33gr/lit, 30gr/lit de sacarosa, 400 mgr/l de hidrolizado de caseína, suplementado con 1mgr/l de 2,4D, vitaminas de Murashighe y Skoog (25,78gr/250ml), 160mgr/lit del bacteriostático timentina, y 6gr/lit de agar durante 30 días, en condiciones de luz difusa los primeros 15 días y luz

plena los restantes 15 días, con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 horas de oscuridad y una humedad del 40%.

5. Determinación de la mínima concentración inhibitoria del agente selectivo

A partir de plántulas creciendo *in vitro* de 7 días de germinadas, se realizó la curva de respuesta al agente selectivo fosfinotricina (PPT) en las variedades de pasto llorón, Tanganyika y Kromdraai. Se utilizó un medio MS básico sin reguladores de crecimiento al cual se adicionó el agente selectivo en concentraciones de 0mgr/Lt, 0,50 mgr/Lt, 1,00 mgr/Lt, 2,00 mgr/Lt, 2,50 mgr/Lt, 3,50 mgr/Lt, 4,00 mgr/Lt, 6,00 mgr/Lt y 8,00 mgr/Lt y se solidificó con agar. El ensayo se realizó en tubos de cultivo de vidrio con una planta por tubo, utilizando 20 tubos por cada concentración. A los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días se tomó el dato porcentaje de supervivencia en control y el medio con las distintas concentraciones del agente selectivo. El medio era renovado cada 15 días.

C) *Agrobacterium*

Se trabajó con dos cepas de *A. tumefaciens* de diferente capacidad de virulencia y infección, AGL0 (menos virulenta) y AGL1 (más virulenta) de *A. tumefaciens*. Ambas portan el mismo vector binario (pPZP201BUGI) que se muestra en **Figura 7**. Este expresa el gen reportero *uidA* y un gen de selección, *bar*, bajo los promotores Ubi1 y Act1, respectivamente. Este vector fue cedido gentilmente por el Dr. Antonio Diaz Paleo (CNIA, INTA Castelar, Argentina).

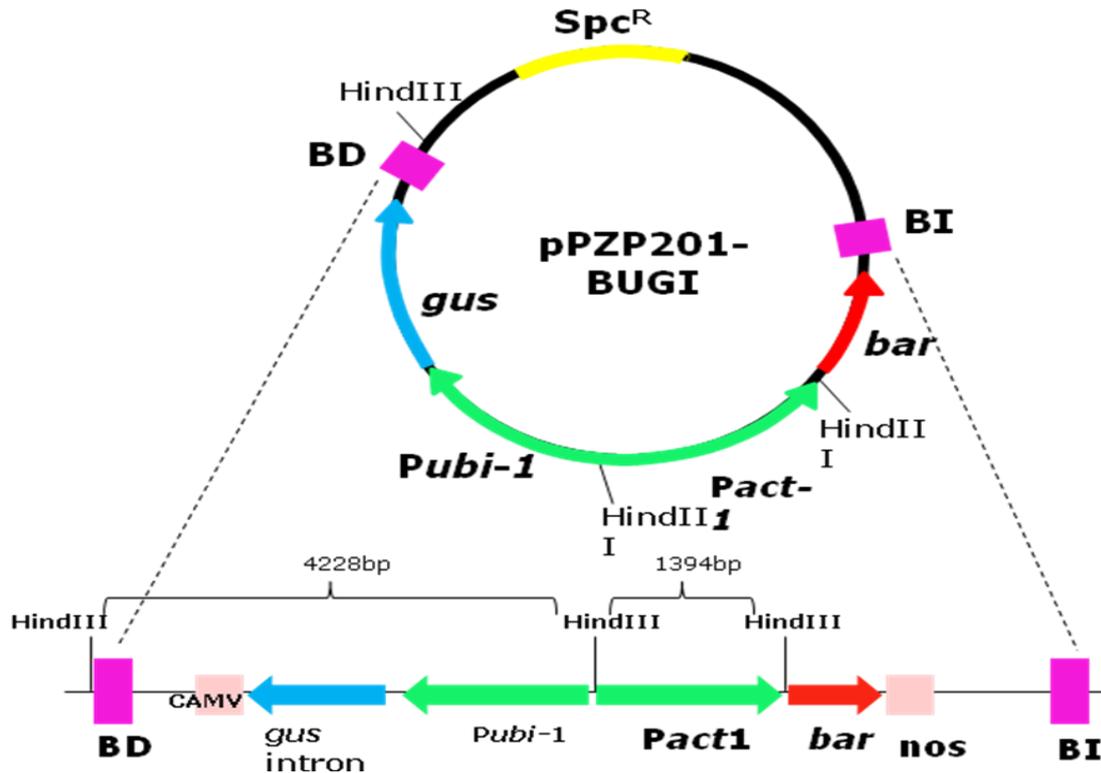


Figura 7. Cassette de expresión de los genes *gus* y *bar* en el plásmido pPZP201-BUGI.

D) Transformación de *A. tumefaciens* por choque térmico (freeze-thaw)

En la transformación de *Agrobacterium* se utilizó la metodología de choque térmico. Brevemente: el cultivo de la cepa AGL0 sin vector bacteriano se inició en una caja de Petri en medio LB Agar sólido (10 gr/l de triptona; 5gr/l extracto de levadura; 10 gr/l cloruro de sodio; 15gr/l agar; PH: 7), con rifampicina (50mgr/l) y se incubó a 27-28°C durante aproximadamente 72hs, hasta que se observó el crecimiento de colonias aisladas.

Luego una colonia aislada del cultivo bacteriano se colocó en un tubo de ensayo con 2ml de medio líquido YEB (5gr/l extracto de carne, 1gr/l extracto de levadura, 5gr/l peptona de caseína, 5gr/l sacarosa, 240mgr/l sulfato de magnesio, PH:6,8) con rifampicina (50mgr/ml), se incubó a 28°C en agitación durante 12-16hs en oscuridad. Luego se tomaron de este cultivo 500ul y se adicionaron 10ml de medio de cultivo YEB con rifampicina (50mgr/ml) hasta lograr una DO= 0,7, incubando a 27-28°C durante 6hs. Luego se Incubó en hielo

durante 15 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron delicadamente en 100 ul de Cl₂Ca 20mM (4°C). A continuación se adicionó 1 microgramo de DNA plasmidico, se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego de esto las células se colocaron por 2 minutos en nitrógeno líquido y luego por 5 minutos a 37°C. Se adicionó 1 ml medio YEB, se homogeneizó suavemente con una micropipeta y se incubó por 2hs a 28°C.

Luego 100 microlitros de células en suspensión se sembraron en medio sólido YEB con los antibióticos rifampicina (50mgr/ml) y spectinomicina (100mgr/ml) y se incubó a 28°C por 48 – 72 hs, luego de lo cual se colectaron las colonias transformadas.

La transformación se verificó mediante la técnica de PCR, utilizando un programa de amplificación específico para los genes *uidA* (desnaturalización de ADN 94°C 3 minutos 1 ciclo; (desnaturalización 94°C 0,45', hibridación del primer 60°C 0,45', extensión 72°C 1,3') 35 ciclos; extensión final 72°C 5' 1 ciclo; mantenimiento 4°C ∞;

Primers: 5' GAT TTC GTA ATT ATG CGG GCA ACG TC 3';

5' TCA GGC ACA GCA CAT CAA AGA GAT C 3'.

E) Transformación de *Eragrostis curvula*

1. Crecimiento de las cepas de *Agrobacterium*

Se inició un cultivo sólido bacteriano de la cepas que contienen el plásmido pPZP201-BUGI en una caja de Petri en medio LB agar con antibióticos (100mgr/ml de spectinomicina y 200mgr/ml de carbenicilina), se incubó a 27-28°C durante aproximadamente 72hs, hasta que se observó el crecimiento de colonias aisladas. Luego, una colonia individual se colocó en un tubo de ensayo en 2ml con medio LB o MGL (5gr/l triptona; 2,5gr/l extracto de levadura; 5gr/l manitol; 1gr/l acido glutámico; 250mgr/l KH₂PO₄; 100mgr/l cloruro de sodio; 100mgr/l sulfato de magnesio heptahidrato; PH: 7) líquido con la adición de 1mgr/ml biotina, 100 mgr/ml spectinomicina y 200 mgr/ml carbenicilina. Se incubó a 28°C en agitación (250rpm) durante 12- 16hs.

2.Tratamiento de los explantos

Se probaron distintos tratamientos para herir los tejidos de las semillas maduras, tales como, perforación con aguja histológica, sonicación y tratamiento con micro esferas de vidrio (Glads Beads). Las semillas eran heridas bajo lupa, se practicaban dos heridas con aguja histológica en el sector del embrión. En los casos de embriones maduros aislados bajo lupa utilizando pinza o bisturí este era directamente el tratamiento de herida. En el caso de embrión aislado elongado (luego de 4 días de germinación) también este era el tratamiento de herida. En el caso de semilla germinada (cuatro días) el tratamiento fue por sonicación. Las semillas eran colocadas en un tubo eppendorf con agua destilada por 5 minutos en un sonicador Branson a Smithkline company ultrasonic cleaner B-220 0/60 HZ 125 Watts. Otro tratamiento efectuado a semillas sin pregerminar fue utilizando micro esferas de vidrio (Glads Beads SIGMA de 212 – 300 microns). Se las colocó en un tubo eppendorf con agua destilada con las micro esferas durante 5 minutos agitando con vortex.

3.Inoculación y co-cultivo

Para inocular los explantos se utilizaron dos métodos, en el primero se tomó el inóculo iniciado a partir de una colonia, como se indicó en el inciso anterior, se centrifugó y el pellet se resuspendió en en medio nuevo hasta lograr una DO_{600} de 1-1,5 (medio común). En el segundo, se trabajó de la misma manera, en lugar de centrifugar todo el cultivo (los 2 ml) se tomó una alícuota que se resuspendió en LB nuevo para lograr una dilución de 1/25 (medio fresco). Luego de esto se adicionó acetosiringona (200 – 400 μ molar) para incrementar la virulencia de la cepa, dado que se intenta transformar una monocotiledónea, y el surfactante Plurónico F68 (0.01%), glucosa (1%) a fin de incrementar la eficiencia de transformación (entre minutos a horas) y tratamiento de vacío de 0,015mmHg (de 5 minutos). En las Tablas 3, 4 y 5 se resumen las características de cada experimento.

Los explantos fueron colocados en medio de cultivo MS modificado para pasto llorón (como se describió anteriormente) en presencia del cultivo bacteriano con la adición de acetosiringona y el surfactante 0.01% plurónico F68, durante dos horas a temperatura ambiente. Se colocó en oscuridad por tiempos variables (ver **Tablas 3, 4 y 5**). Posteriormente se retiró el medio de cultivo bacteriano y los explantos fueron transferidos a otras placas conteniendo medio MS (medio de co-cultivo sin el agregado del bacteriostático). Se mantuvieron en estas condiciones de 2 a 4 días (ver **Tablas 2, 3 y 4**).

Transcurrido este tiempo los explantos inoculados se transfirieron al medio de inducción (en algunos casos modificado por la adición de cisteína y ácido ascórbico, 40 y 2 mg/l. respectivamente, a fin de evitar la oxidación de los callos) con el agregado del antibiótico timentina (160 mgrs/l – 300 mg/l).

Tabla 2. Condiciones experimentales de los ensayos de transformación utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, Para la inoculación se utilizó un medio de crecimiento bacteriano común.

N° Ensayo	Densidad Óptica (OD)	Periodo de Incubación	Co-cultivo (días)	Acetosyringona (micromolar)	F-68 (%)	Vacio (minutos)
1	1,5	2hs	2	400	No	No
2	0,7	2:45hs	3	200	No	No
3	0,5	25 minutos	2	200	0,01	5
4	1	1hs	2	400	0,01	5
5	1,5	2hs	2	400	0,01	5
6	1	2hs	2	400	0,01	5

Tabla 3. Condiciones experimentales de los ensayos de transformación utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, Para la inoculación se utilizó un medio de crecimiento bacteriano fresco.

N° Ensayo	Densidad Óptica (OD)	Periodo de Incubación	Co-cultivo (días)	Acetosyringona (micromolar)	F-68 (%)	Vacio (minutos)
8	0,7	1hs	2	400	0,01	5
10	1	2hs	2	400	No	No
11	1	1hs	2	400	0,01	5
12 a* y b*.						
13*	0,5	ON	3	400	0,01	No
14*	1	1hs	2	200	0,01	No
15*	0,7	1hs	5	400	No	No
16*	1	1hs	2	400	0,01	No
17*	1,5	1hs	2	400	0,01	No
18 a* y b*; 19**	1,5	1hs	5	400	0,01	No
20**	0,5	30 minutos	2	400	0,01	1
21**	1	1hs	5	400	0,01	No
22**, 23**	0,5	1hs	3	400	0,01	No

* En el medio de inducción de callos 40mgr/l, L-cystein; 15mgr/l Ac. ascórbico. ** En el medio de co-cultivo se le adiciona 98mgr/l acetosyringona, 500mgr/l de prolina, 40mgr/l. En el medio de inducción de callos 40mgr/l, L-cystein; 2mgr/l Ac. Ascórbico, 213mgr/l de MES, 1mgr/l glutamina.

Tabla 4. Condiciones experimentales de los ensayos de transformación utilizando la cepa AGL0 pPZP201-BUGI. Para la inoculación se utilizó un medio de crecimiento bacteriano fresco.

N° Ensayo	Densidad Óptica (OD)	Periodo de Incubación	Co-cultivo (días)	Acetosyringona (micromolar)	F-68 (%)	Vacio (minutos)
7	1	2hs	2	400	0,01	5
9	1,5	1,5hs	2	400	0,01	5

4. Ensayo histoquímico de Gus

A los 4 – 5 días de inducción se tomaron muestras al azar de los callos incipientes y se realizó el ensayo histoquímico de Gus (Jefferson et al., 1987 modificado) para detectar la expresión del gen *uidA* y la eficiencia de transformación transitoria.

Primero se preparo la solución X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-3-glucuronic acid), se procedió a disolver 25mgr de X-Gluc en 250ul de dimetilformamida (DMF), se agregó 0,1M de buffer K/Na₂PO₄ PH: 7; 10mM Na-EDTA; 5mM de ferricianuro de potasio; 5mM de ferrocianuro de potasio; 0,1% triton X-100 y se mezcló rápidamente, se esterilizó por filtración, se alicuotó y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Luego se procedió a realizar el ensayo histoquímico de GUS. Se retiraron los explantos y/o callos del medio de co-cultivo, se los lavó con agua destilada estéril y se los colocó en un recipiente estéril, se le agregó la solución de X-Gluc y se incubó en oscuridad a 37°C durante toda la noche (ON). Luego se retiró la solución y se realizaron al menos dos lavados con etanol 96% y el tejido así tratado se conservó en etanol 96% a 4°C. Dado el tamaño de los explantos, las observaciones de los mismos que presentaban coloración azul se hizo bajo lupa.

5. Cultivo *in vitro* de los tejidos inoculados

Luego de la inoculación y co-cultivo los explantos se colocaron en el medio de inducción de callos mencionado anteriormente, donde se mantuvieron durante 4 semanas en condiciones de oscuridad 25-27°C. Luego de este período se los transfirió al medio de regeneración mencionado anteriormente por durante 4 semanas.

6. Selección

Las plantas regeneradas obtenidas *in vitro* fueron repicadas a un medio de selección y se sometieron a tres rondas de selección de concentraciones crecientes del agente selectivo fosfotricina (4,33gr/l sales Murashighe y Skoog (1962), 30gr/l sacarosa más el herbicida fosfotricina PPT. Según ronda de selección se le adicionó (primera ronda 2,5mgr/lit, segunda ronda 3,5 mgr/litro o tercer ronda 6mgr/lit) y el bacteriostático 160mgr/l timentina,

6gr/l agar). Se realizaron tres rondas de selección (basadas en la mínima concentración inhibitoria del agente selectivo determinada para esta especie vegetal).

Luego del trasplante de las plantas que resistieron al agente selectivo a macetas, se precedió a una nueva ronda de selección con 10mgr/lt de glufosinato de amonio, cuyo nombre comercial es Basta, con el objetivo de detectar escapes. Se realizó una aplicación de herbicida durante tres días seguidos. Luego de 15-20 días se observó la supervivencia y mortandad de las plantas.

F). Análisis de plantas resistentes al agente selectivo

Las plantas regeneradas *in vitro* que presentaron tolerancia al agente selectivo en las tres rondas de selección se analizaron por PCR y Southern blot.

1. Extracción de ADN

Se extrajo ADN a partir de hojas previamente liofilizadas. El ADN genómico se extrajo utilizando la siguiente solución reguladora: 50 mM Tris-HCl 1M pH 8, 10 mM EDTA 0,5 M pH8, 100 mM CINA 5 M, 10% SDS y 10 mM beta-mercaptoetanol. Las hojas liofilizadas se colocaron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron. El producto obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 700 microlitros con la mencionada solución tamponada de extracción y se incubó durante 20 min. a 65 °C con agitación lenta (estufa con agitador vertical). Posteriormente se agregaron 200 microlitros de acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo durante 20 min. Pasado ese tiempo se centrifugaron los tubos en una centrífuga Eppendorf (20 min. a 13.000 rpm) para eliminar restos de tejido. El paso anterior se repitió para lograr un sobrenadante más limpio. El mismo se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 700 microlitros de isopropanol para precipitar el ADN. Los tubos se incubaron durante 10 min. a -20 °C. El ADN se precipitó por centrifugación a 13.000 rpm durante 4 min. El precipitado se lavó con 600 microlitros de alcohol 70% y se centrifugó durante 4 min. a 13.000 rpm. Este lavado se repitió una segunda vez. Luego el pellet se secó a estufa a 37°C o en flujo laminar durante aproximadamente 30 min. y se resuspendió en 100 microlitros de solución TE 1X. La concentración y calidad de ADN se determinó en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300-Merck) con las lecturas a la DO260 y la DO280.

2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo este análisis se realizó una PCR para los genes *uidA* y *bar* cuyos componentes que se indica en la **Tabla 5** y secuencia de los primers correspondientes en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Componentes de la PCR para primers específico para los genes *uidA* y *bar* .

	1X
ADN	1ul
Buffer 5x	4ul
DNTPs	1ul
Primer up	0,8ul
Primer dwn	0,8ul
Taq polimerasa	0,25ul
Agua	12,15ul
	20ul

Se procedió a realizar la PCR indicado en la Tabla Ciclo de amplificación específico para los genes *uidA* y *bar*: desnaturalización total de ADN 94°C 3 minutos 1 ciclo; (desnaturalización 94°C 0,45', hibridación del primer 60°C 0,45', extensión 72°C 1,3') 35 ciclos; extensión final 72°C 5' 1 ciclo; mantenimiento 4°C ∞.

Tabla 6. Secuencias de primers correspondientes a los genes *bar* y *uid A*.

PRIMERS	SECUENCIAS
Primer <i>uidA</i> up	5' GAT TTC GTA ATT ATG CGG GCA ACG TC 3'
Primer <i>uidA</i> dwn	5' TCA GGC ACA GCA CAT CAA AGA GAT C 3'
Primer <i>bar</i> 1	5' TGC ACC ATC GTC AAC CAC T 3'
Primer <i>bar</i> 2	5' ACA GCC ACC ACG CTC TTG AA 3'

3. Southern Blot

Para determinar la probable integración del transgén en el genoma vegetal y, en caso positivo determinar el número de copias, las plantas que fueron PCR positivas fueron evaluadas por la técnica de Southern Blot utilizando el DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de *Agrobacterium*

La transformación de *Agrobacterium tumefaciens*, cepa AGL0, con el vector pPZP201BUGI utilizando la metodología de choque térmico, con las modificaciones señaladas en la sección anterior, fue exitosa, se transformaron células de *A. tumefaciens* y se obtuvieron colonias que crecieron en el medio selectivo correspondiente. Las colonias transformadas fueron caracterizadas molecularmente mediante PCR utilizando primers específicos que permitieron amplificar fragmentos internos del gen *uidA*, localizados en el vector binario.

Los resultados obtenidos confirmaron la presencia del gen esperado, *uidA*, en las bacterias transformadas como se muestra en la **Figura 8**.

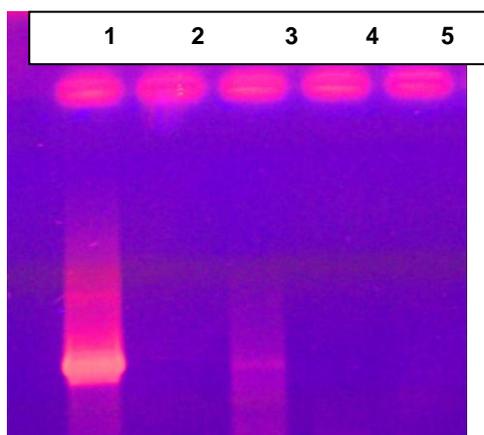


Figura 8. PCR de *A. tumefaciens* cepa AGL0 transformada con vector binario pPZP201BUGI, utilizando primers específicos para fragmentos internos del gen *uidA*. 1- control positivo, 2- control negativo, 3- AGL0 transformada que contiene el pPZP201BUGI, 4 y 5- no transformadas.

Además de la cepa AGL0 pPZP201BUGI en este trabajo se utilizó la cepa AGL1 pPZP201BUGI de *A. tumefaciens*. La cepa AGL1 conteniendo este vector fue cedida gentilmente por el Dr. Antonio Diaz Paleo (CNIA, INTA Castelar, Argentina). Las dos cepas utilizadas en este estudio difieren en su capacidad de virulencia; siendo la cepa AGL0 menos virulenta y AGL1 más virulenta, y ambas portan el mismo vector binario pPZP201BUGI.

La elección de las mismas se debió a que las mismas fueron utilizadas con éxito en la transformación estable de otras especies de gramíneas, como por ejemplo, la cepa AGL1 se utilizó en *Triticum aestivum* (Sparks et al., 2003; Wu et al., 2003); Triticale (Nadolska-Orczyk et al., 2005); *Panicum virgatum* (Somleva et al., 2002); *Hordeum vulgare* (Wang et al., 2001); *Oryza sativa* (Raina, 1999; Upadhyaya et al., 2000) y la AGL0 en *Oryza sativa* (Upadhyaya et al., 2000); *Hordeum vulgare* (Holme et al., 2008); *Triticum aestivum* (Weir et al., 2001); *Secale cereale* (Popelka y Alpeter, 2003).

Tranformación de *Eragrostis curvula* utilizando las cepas transformadas de *Agrobacterium tumefaciens*

En este estudio se utilizaron cinco diferentes explantos de tres cultivares de pasto llorón, todos obtenidos a partir de semillas maduras. Se realizaron 23 ensayos donde se logró inocular un total de 8428 semillas maduras, como control negativo se inocularon 930 semillas maduras. Estas diferentes inoculaciones, tendientes a la obtención de plantas transgénicas de pasto llorón, comprendieron diferentes tratamientos aplicados a las semillas maduras.

Se detallan a continuación los resultados utilizando cada metodología:

Antes de la inoculación se probaron distintos tratamientos para herir los tejidos de las semillas maduras, tales como, perforación con aguja histológica, sonicación y tratamiento con micro esferas de vidrio (Glads Beads). Luego de la inoculación y co-cultivo de los explantos, se realizó el ensayo histoquímico de Gus (Jefferson et al., 1987 modificado) para detectar la expresión del gen *uidA* y la eficiencia de transformación transitoria, en el cual para controlar el apareamiento de falsos positivos se dispuso de un vector binario que

contiene un intron, este hace que la expresión de GUS, por *Agrobacterium* sea nula y no detectable (Vancanneyt et al., 1990).

En cuanto al efecto del genotipo, se logró obtener expresión transitoria del gen GUS en los tres cultivares utilizados, con diferentes respuestas en las cuales influyó la respuesta al cultivo *in vitro*, la cepa de *Agrobacterium* utilizada y las condiciones y tratamientos aplicados.

En el cultivar Morpa, los mejores resultados se obtuvieron utilizando la cepa AGL1 pPZP201BUGI, con el explanto semillas maduras heridas y las condiciones de cultivo e incubación especificadas en la **Tabla (2 – 4)** ensayo 8, donde se observó que un 58% de los explantos dieron GUS positivo, es decir que se observó coloración azul como se observa en la **Fig. 9**. También dieron resultados promisorios con AGL0 pPZP201BUGI, el explanto semillas maduras heridas y las condiciones de cultivo e incubación especificadas en la **Tabla (2 - 4)**, ensayo 9 donde se observó que un 20% de los explantos dieron GUS positivo.

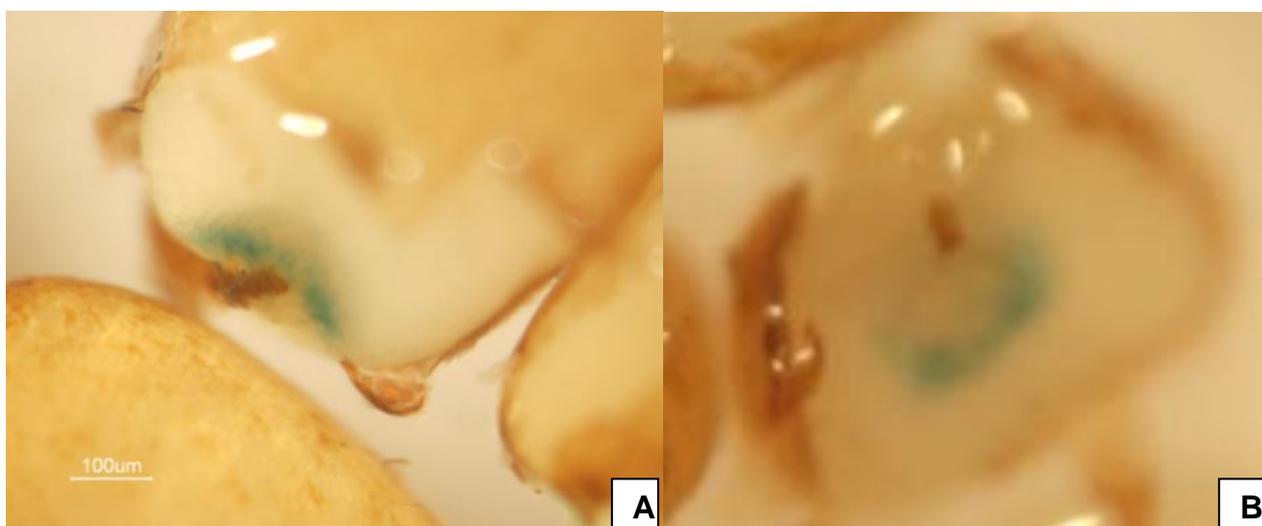


Figura 9. Ensayo histoquímico de GUS se muestra A)y B) Gus positivo en el cultivar Morpa.

En el cultivar Tanganyika los mejores resultados se obtuvieron con el explanto semillas maduras heridas (Tabla 10, ensayo 9) donde se obtuvo un 8% de expresión del gen GUS con la cepa AGL0 y 34% con AGL1 y con semillas heridas tratadas con micro-esferas de vidrio como explanto (**Tabla 15**, ensayo 18b). Es decir que en todos los casos este genotipo no tuvo tan buena respuesta como Morpa.

No se observó expresión transiente del gen GUS en el cultivar Kromdraai en ninguno de los tratamientos aplicados.

Luego de 4 semanas en cultivo se obtuvieron callos a partir de semillas maduras de los tres cultivares en estudio de diferentes tamaños y calidades, desde callos acuosos, sin una estructura definida y que no prosperaron hasta callos más compactos y friables, organogénicos y embriogénicos. En general, considerando los 23 ensayos de transformación realizados se puede resumir que, utilizando semillas maduras se logró obtener entre un 36 - 100% de callos, utilizando sección de meristema apical entre 36,16 - 72% de callos, con embriones maduros entre 10 - 98% y con semillas maduras entre 3 - 100% de callos. Estas variaciones fueron debidas a una conjunción de todos los factores involucrados, a saber el genotipo, el tipo de explanto, las condiciones experimentales a que fueron sometidos, como cepa de *Agrobacterium*, etc.se muestra en la **Tabla (7 – 19)**.

En cuanto a la regeneración de plantas *in vitro*, los porcentajes variaron entre 0 – 35 % (**Tablas7 - 19**) para el cultivar Tanganyika, que fue el resultado de una conjunción de todos los factores involucrados. En Kromdraai el rango fue de 0 a 7% y Morpa no regeneró plantas en las mismas condiciones.

Entre los factores a tener en cuenta en el caso de Morpa, por ejemplo, fue la limitada disponibilidad de semillas. Para realizar estos ensayos se utilizó semilla pura proveniente del invernáculo del CERZOS. No fue posible conseguir semilla viable en el Banco de Germoplasma de pasto llorón de Anguil. La semilla de este origen tenía escasa viabilidad, determinada por el test de tetrazolio, y bajo poder germinativo *in vitro*. En cuanto a la semilla comercial, la que se puede encontrar en el mercado es una mezcla a la que se denomina “pasto llorón argentino” o Ermelo. Por esa razón no se pudieron realizar más ensayos con el cultivar Morpa, donde la expresión transitoria fue relativamente buena pero no se logró regeneración. En 2001 el grupo de trabajo del CERZOS realizó trabajos de

cultivo *in vitro* de pasto llorón logrando regeneración de cinco variedades, registrándose para Morpa porcentajes de regeneración en el explanto semillas maduras de un 52,17%, pero cabe aclarar que no hubo en esos casos transformación, lo cual en general reduce las posibilidades de regeneración de plantas. En otras especies de gramíneas donde se intentó transformar con *Agrobacterium tumefaciens* se observaron porcentajes variables de regeneración, tal como en *Triticum aestivum* donde se utilizaron como explanto embriones maduros. En este caso se informan valores de regeneración de 1,6 - 30,6% para el cultivar EM12 (Ding et al., 2009). Jones et al. (2010) utilizando embriones inmaduros de *Triticum turgidum* obtuvieron valores de 39,3 – 75 % de regeneración para el cultivar Steward. En *Lolium perenne* utilizando como explanto callos de semillas maduras de distintos cultivares se obtuvieron valores variables de regeneración que oscilaron entre 13,9 % al 48,9% (Wu et al., 2007).

En Tanganyika (**Tabla 11** ensayo 10; **Figura 10**), utilizando semillas maduras heridas se obtuvieron porcentajes de expresión transiente de GUS del 14% y de regeneración del 19,33%. Considerando todos los experimentos realizados, este representó el mejor resultado obtenido teniendo en cuenta todos los factores, es decir expresión transitoria y regeneración, dado que otros ensayos presentaron mayores porcentajes de expresión transiente de GUS pero no regeneraron plantas.

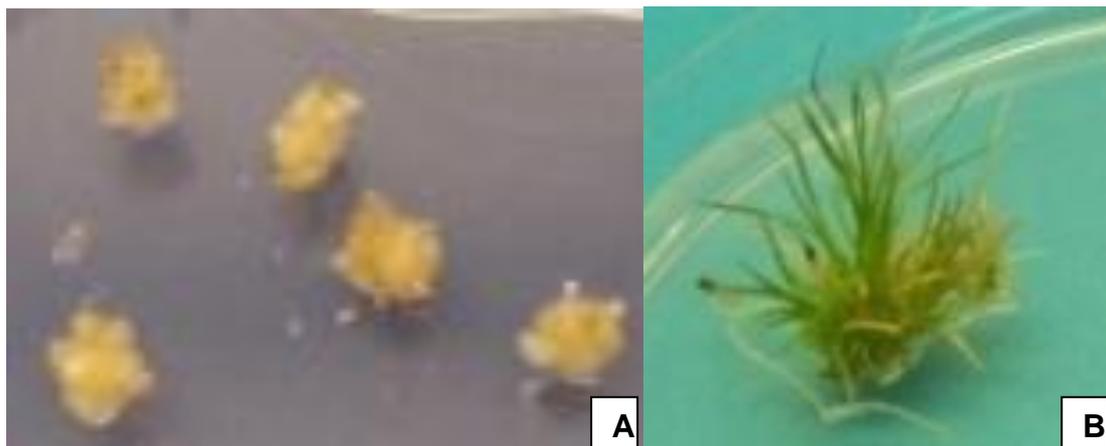


Figura 10. Ensayo 10 de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, se muestra en A).callos a partir de semillas maduras heridas, B). regeneración.

Como corolario de esta parte se puede decir que es menester realizar más experimentos y cambiar el tipo de explanto. La razón de utilizar semillas fue su disponibilidad a lo largo del año, sin embargo, resultados previos del grupo de trabajo indicaron que el mejor explanto para obtener *in vitro* plantas de pasto llorón son las inflorescencias inmaduras. Los informes en la literatura acerca de transformación de otras gramíneas han utilizado embriones maduros como en trigo (Ding et al., 2009), embriones inmaduros en arroz (Hie y Komari 2008), maíz (Huang y Wei, 2005; Ishida et al., 2007), trigo (Wu et al., 2009; He et al., 2010; Ishida et al., 2014), *Hordeum vulgare* (Hensel et al., 2008; Barlett et al., 2008), sorgo (Kumar et al., 2011; Wu et al., 2014;), *Secale cereale* (Popelka y Alpeter, 2003), *Avena sativa* (Gasparis et al., 2008), callos como en el caso de arroz (Hie y Komari 2008), *Setaria itálica* (Wang et al., 2001), *Eleusine coracana* (Antony Ceasar y Ignacimuthu, 2011), *Pennisetum glaucum* (ramadevi et al., 2014), *Cynodon dactylon* (Salehi et al., 2005), *Agrostis stolonifera* (Yu et al., 2000); en *Lolium multiflorum* (Lee et al., 2010); en *Lolium perenne* (Wu et al., 2007; Patel et al., 2013); en *Lolium temulentum* (Ge et al., 2007); en *Festuca arundinacea* (Dong y Qu, 2005; Gao et al., 2008); en *Festuca pratensis* (Gao et al., 2009); en *Panicum virgatum* (Xi et al., 2009; Li y Qu, 2011); en *Miscanthus sinensis* (Hwang et al., 2014); en *Brachypodium distachyon* (Steinwand et al., 2013); *Phragmites communis* (Kim et al., 2013) y sección del meristema apical como en en sorgo (Pandey et al., 2010) y *Panicum virgatum* (Chen et al., 2010).

Selección

Previo a la selección de las plantas regeneradas se determinó la mínima concentración inhibitoria (MCI se muestran al final del capítulo en **Figuras (13 - 16)** para plantas de pasto llorón no transformadas. Para ello se realizó una curva de sensibilidad al agente selectivo fosfotricina y se tomaron datos de supervivencia a los 10, 20, 30,40, 50 y 60 días para los cultivares Tanganyika y Kromdraai creciendo en medio de Murashigue y Skoog con concentraciones crecientes del agente selectivo. La MCI resultó ser de 3,5 mg/l para ambas variedades.

Luego de esto se procedió a la selección de las plantas regeneradas (**Figura 11**) con el herbicida fosfotricina. Las plantas que sobrevivieron a los tratamientos de tres rondas de selección (2,5; 3,5 y 3,5 mg/l, un mes en cada concentración) se analizaron por PCR y

Southern Blot a fin de determinar la presencia y integración del transgén en el genoma vegetal.



Figura 11. Ensayo 10 de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI, se muestra la selección con 3,5mgr/l de fosfinotricina .

En una primera instancia se analizaron 25 plantas, 16 de las cuales resultaron ser PCR positivas para el gen *uidA*. Sin embargo el análisis posterior con la técnica de Southern blot no arrojó los resultados esperados. Este resultado fue sorprendente pero contundente, con lo cual las plantas creciendo en macetas fueron pulverizadas con Basta a una concentración de 10mgr/lt durante tres días. A los 15 días todas las plantas murieron con lo cual se concluyó que las mismas no eran transgénicas. Analizando estos resultados se puede concluir que el gen GUS no se había integrado al genoma de estas plantas.

Estos resultados condujeron a ampliar el rango de selección a tres rondas de 2,5, 4 y 6 mg/l de fosfinotricina. Las plantas que sobrevivieron a estas estas rondas, se analizaron con las mismas técnicas mencionadas anteriormente. En todos los casos la selección en macetas dio negativa, por lo cual se concluye que no fue posible, en las condiciones de esta tesis lograr la transformación estable de pasto llorón.

Además del explanto, como mencionamos más arriba, otro factor a tener en cuenta para el futuro es ampliar el n en los experimentos. Se requiere de un gran número de explantos de partida dado que la eficiencia de transformación es baja.

Poliembrionía

En el cultivar Tanganyika tetraploide, cuando se procedió a extraer los embriones aislados bajo lupa, se observó la presencia de embriones múltiples o poliembrionía se muestra en la **Figura 12**; antecedentes similares fueron observados por Poverene et al. (1987) y Poverene (1988) quienes informaron la presencia de este fenómeno de poliembrionía en pasto llorón, que da origen a plantas mellizas a partir de un solo cariopse.



Figura 12. Embriones de pasto llorón cultivar Tanganyika, A) embrión normal uniembrionado, B) Embrión múltiple o poliembrionía.

TABLAS

Tabla 7. Transgénesis utilizando la cepa AGL0 pPZP201-BUGI y callos embriogénicos de los cvs. Tanganyika y Kromdraai como explantos

N° Ensayo	Inoculación / co-cultivo	cv	% Coloración Azul (GUS)	% Regeneración
	Densidad óptica 1			0
7	Periodo de Incubación 2hs	T	4	
	Co-cultivo 2 días			0
	Acetosiringona 400 micromolar	K	8	

Tabla 8. Transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y callos embriogénicos de los cvs Tanganyika y Kromdraai como explantos

N° Ensayo	cv	Densidad Óptica (OD)	Co-cultivo (días)	Acetosyringona (micromolar)	F-68 (%)	Vacio (minutos)	% GUS	% Regeneración
3	K	0,5	2	200	0,01	5	s/d	0
	T						s/d	0
6	K	1	2	400	0,01	5	s/d	0
	T						s/d	0
20	T	0,5	2	400	0,01	1	0	0

Tabla 9. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y embriones de los cvs. Tanganyika y Kromdraai como explantos

N° Ensayo Explanto	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co- cultivo (días)	AS (uM)	F-68 (%)	% GUS	% Rege nerac ión
15 Embriones aislados	K	0,7	1	5	200	No	0	0
14 Embriones elongados	K	1	1	2		0,01	0	0

Tabla 10. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL0 pPZP201-BUGI y semillas maduras heridas de los cvs. Tanganyika y Kromdraai como explantos

N° Ensayo Explanto	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co- cultivo (días)	AS (uM)	F-68 (%)	Vacio (min)	% GUS	% Rege nerac ión
9	T	1,5	1,5hs	2	400	0,01	5	8	0
	M							20	0

AS: acetosyringona.

Tabla 11. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras heridas de los cvs. Tanganyika, Kromdraai y Morpa como explantos.

N° Ensayo	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co- cultivo (días)	AS (uM)	F-68 (%)	Vac io (mi n)	% GUS	% Regen eració n
8	T	0,7	1	2	400	0,01	5	6	1,58
	M							58	0
10	T	1	2	2	400	No	No	14	19,33
11	T	1	1	2	400	0,01	5	8	0,5
13	T	0,5	ON	3	400	0,01	No	4	0,8
								5	
21	T	1	1	5	400	0,01	No	5,45	0,29
22	M	0,5	1	3	400	0,01	No	0	0

Tabla 12. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras germinadas, del cv. Tanganyika como explanto.

N° Ensayo Explanto	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co- cultiv o (días)	AS (uM)	F-68 (%)	Vacio (min)	% GUS	% Reg ener ació n
12a	T	1	1	2	400	0,01	5	7,5	0
								13	
12b*								0	0

AS: acetosyringona. 12b*: Semillas germinadas heridas con aguja histológica bajo lupa. . T: Tanganyika.

Tabla 13. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras sonicadas del cv Tanganyika como explantos

N° Ensayo	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co-cultivo (días)	AS (uM)	F-68 (%)	Vacio (min)	% GUS	% Regeneración
16	T	1	1hs	2	400	0,01	No	0	15,12

AS: acetosyringona. T: Tanganyika.

Tabla 14. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras sin herir + Glads Beads, cv Tanganyika.como explantos.

N° Ensayo	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co-cultivo (días)	AS (uM)	F-68 (%)	Vacio (min)	% GUS	% Regeneración
17	T	1,5	1hs	2	400	0,01	No	0	35,06

AS: acetosyringona. T: Tanganyika.

Tabla 15. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI y semillas maduras heridas + Glads Beads, cvTanganyika. como explantos

N° Ensayo	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co-cultivo (días)	AS (uM)	F-68 (%)	Vacio (min)	% GUS	% Regeneración
18a								22	0
18b	T	1,5	1	5	400	0,01	No	34	4
19								16	3,63

AS: acetosyringona. T: Tanganyika.

Tabla 16. Ensayos de transgénesis utilizando la cepa AGL1 pPZP201-BUGI semillas maduras sin herir + Glads Beads, cv Tanganyika como explantos

N° Ensayo	cv	Densidad Óptica (OD)	Periodo Incubación	Co- cultivo (días)	AS (uM)	F-68 (%)	Vacio (min)	% GUS	% Rege- nerac ión
23	T	0,5	1hs	3	400	0,01	No	0	0

AS: acetosyringona. T: Tanganyika.

Tabla 17. Selección de plantas regeneradas *in vitro* con el agente selectivo fosfinitricina en tres rondas de selección.

Tanganyika	Explanto	N°Ensayo	%	%	%	%	%
Cepa			Inducción	Regeneración	Selección	Selección	Selección
AGL1			de callos		1	2	3
	E	1	99,33	6,66	50	50	0
	E	2	79,11	8,22	16	0	-
	S	2	88	10	16	0	-
	MA BCO	4	51,56	10,93	100	57	0
	MA	4	36,13	5,94	50	0	-
	SH	1	99,33	14	87	62	25
	SH BCO	5	95	2,5	50	50	0
	SH	5	72,19	0,89	50	50	0
	SH BCO	8	100	24,44	100	0	-
	SH	8	99,68	1,58	100	89	11
	SH BCO	10	100	28	43	43	0
	SH	10	100	19,33	85	71,42	0
	SH	11	99	0,5	0,5	0,5	0
	SH	13	96	0,8	0,8	0,8	0
	SS BCO	16	82,27	15,18	8,86	0	-
	SS	16	90,24	15,12	7,51	1,26	0,68
	SGB BCO	17	98,66	68	40	1,33	1,33
	SGB	17	96,26	35,06	19,94	4,28	2,73
	SHGB BCO	18 ^a	75	12,5	12,5	4,16	4,16
	SHGB BCO	18 ^b	82,66	4	4	2,66	2,66
	SHGB BCO	19	100	2	2	2	0
	SHGB	19	93,99	3,63	1,42	0,94	0,94
	SHGBC	23	100	4,76	0	-	-
	BCO						

Tabla 18. Selección de plantas regeneradas *in vitro* con el agente selectivo fosfinotricina en tres rondas de selección.

Kromdraii	Explanto	N°Ensayo	% Inducción callo	% Regeneración	% Selección 1	% Selección 2	% Selección 3
Cepa							
AGL1							
	E	1	97	7	33	33	0
	SH	1	98,66	6	57	28	14
	S	2	89,33	5,33	16	0	-
	MA BCO	4	75,67	5,40	0	-	-
	MA	4	72	6	50	25	0

Tabla 19. Selección de plantas regeneradas *in vitro* con el agente selectivo fosfinotricina en tres rondas de selección.

Morpa	Explanto	Tratamiento	%Inducción callos	%Regeneración	Selección 1	Selección 2	Selección 3
AGL1	SH BCO	8	19,51	2,43	100	0	-

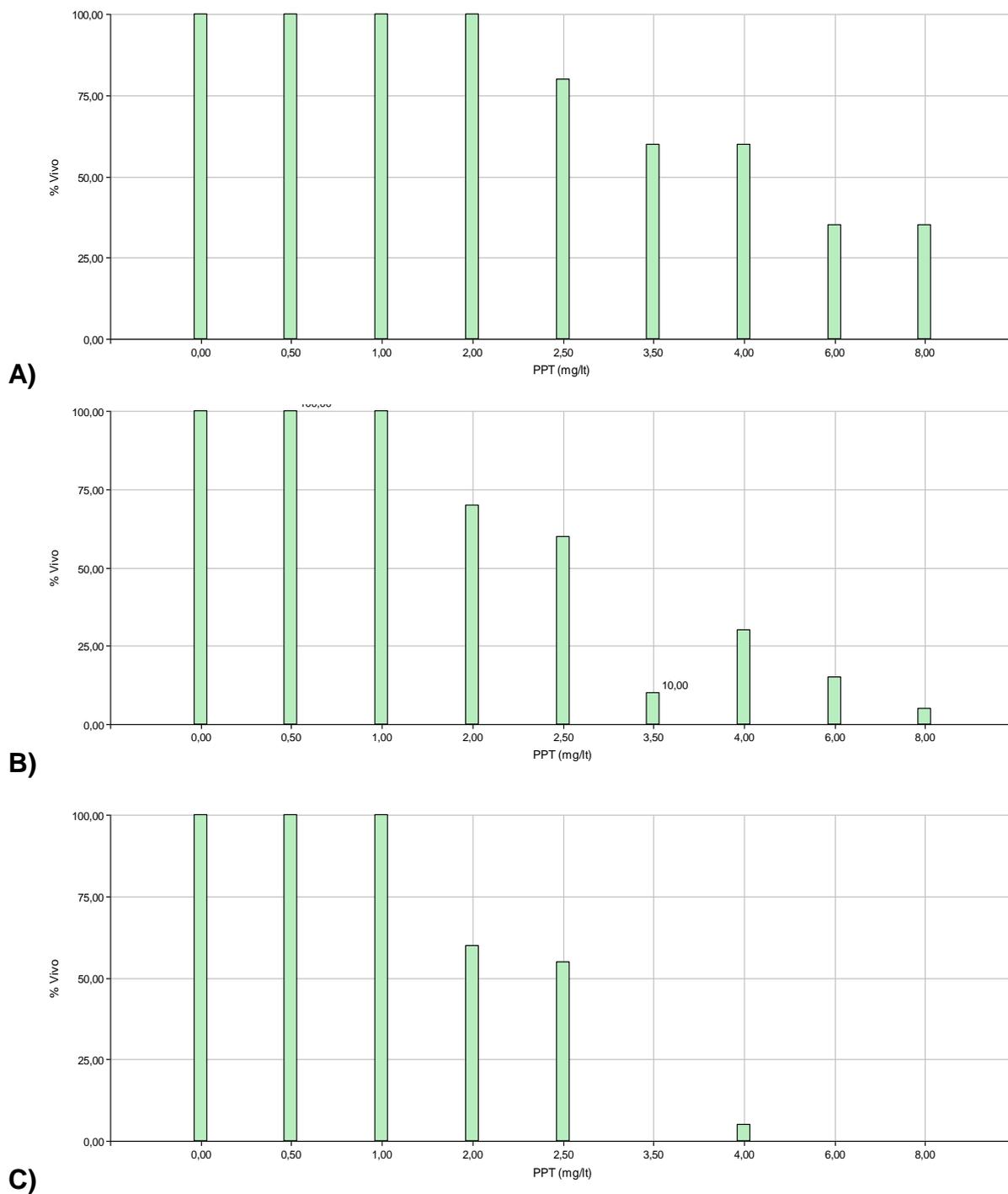
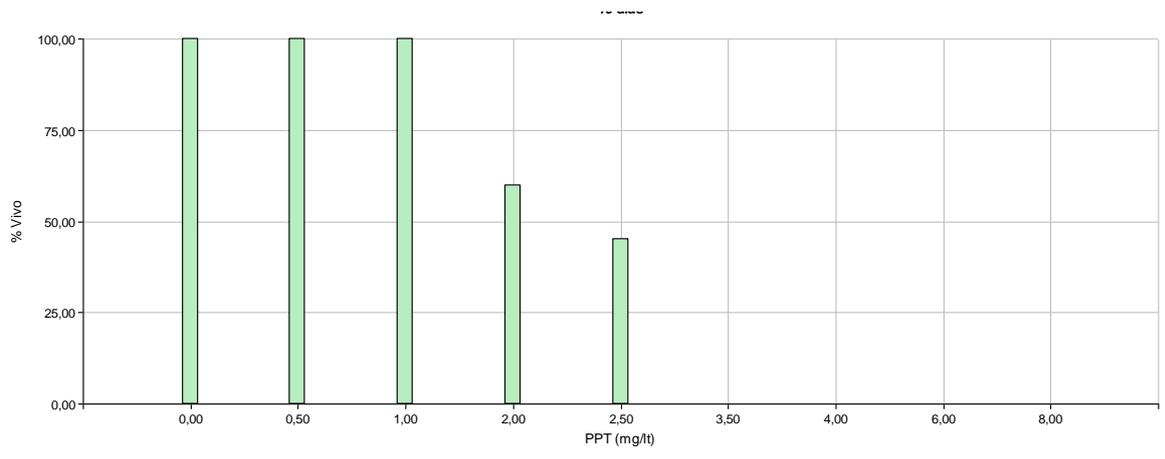
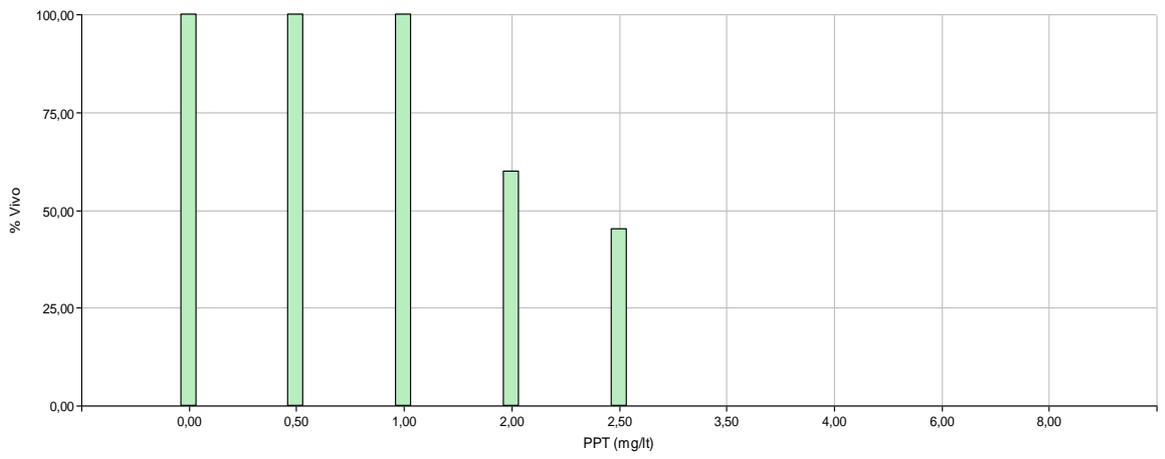


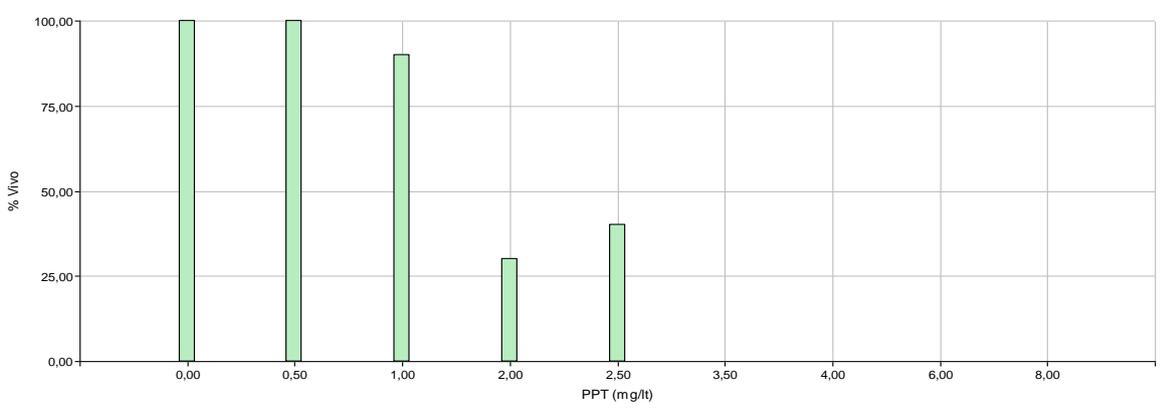
Figura 13. Curva de respuesta al agente selectivo fosfotricina en *E. curvula* var. Tanganyika a los A.10 días, B.20 días, C.30 días porcentaje de supervivencia en control 0mgr/lt y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/lt, 1,00 mgr/lt, 2,00 mgr/lt, 2,50 mgr/lt, 3,50 mgr/lt, 4,00 mgr/lt, 6,00 mgr/lt y 8,00 mgr/lt.



D)



E)



F)

Figura 14. Curva de respuesta al agente selectivo fosfotricina en *E. curvula* var. Tanganyika a los D. 40 días, E. 50 días, F. 60 días porcentaje de supervivencia en control 0mgr/lit y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/lit, 1,00 mgr/lit, 2,00 mgr/lit, 2,50 mgr/lit, 3,50 mgr/lit, 4,00 mgr/lit, 6,00 mgr/lit y 8,00 mgr/lit.

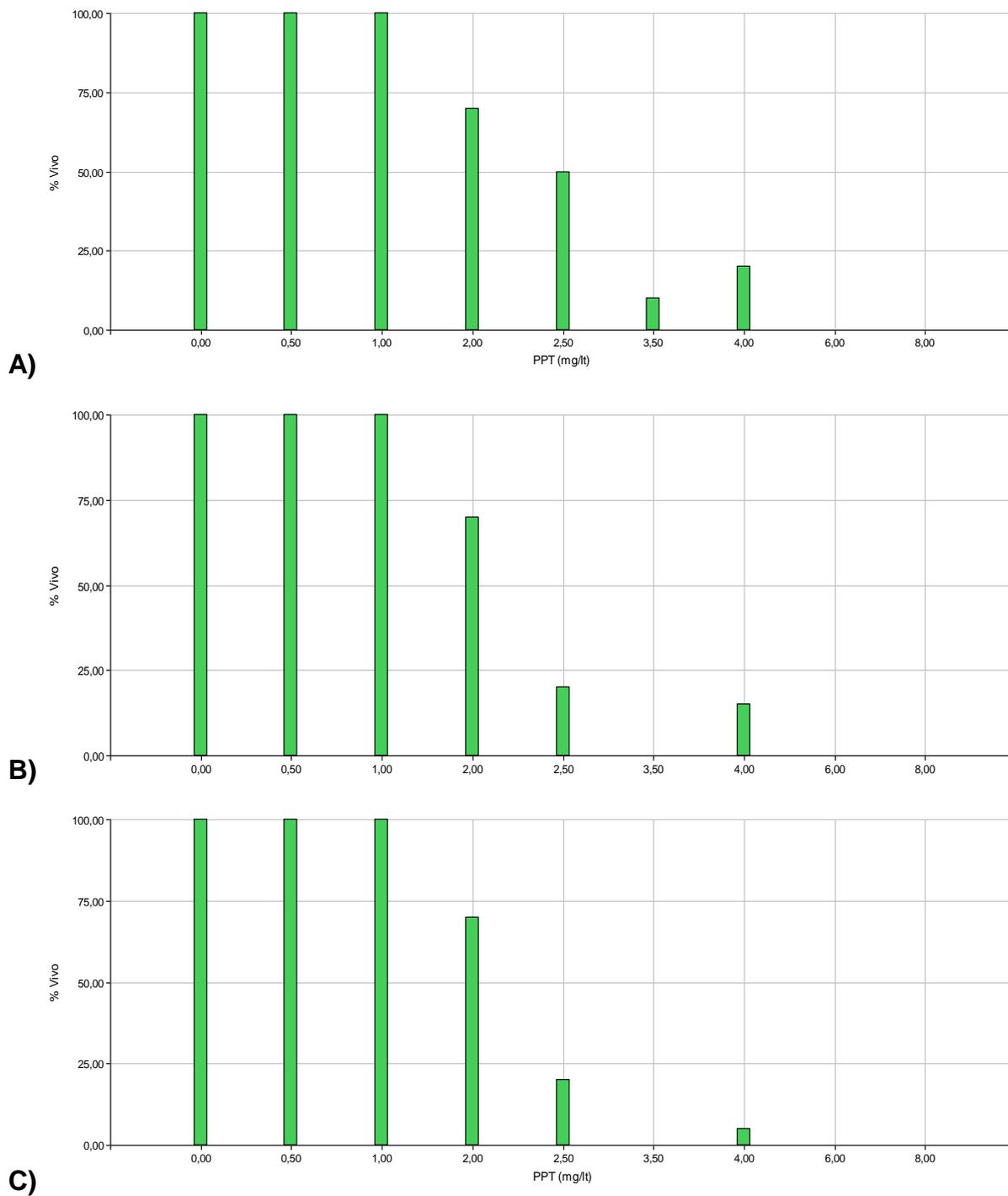
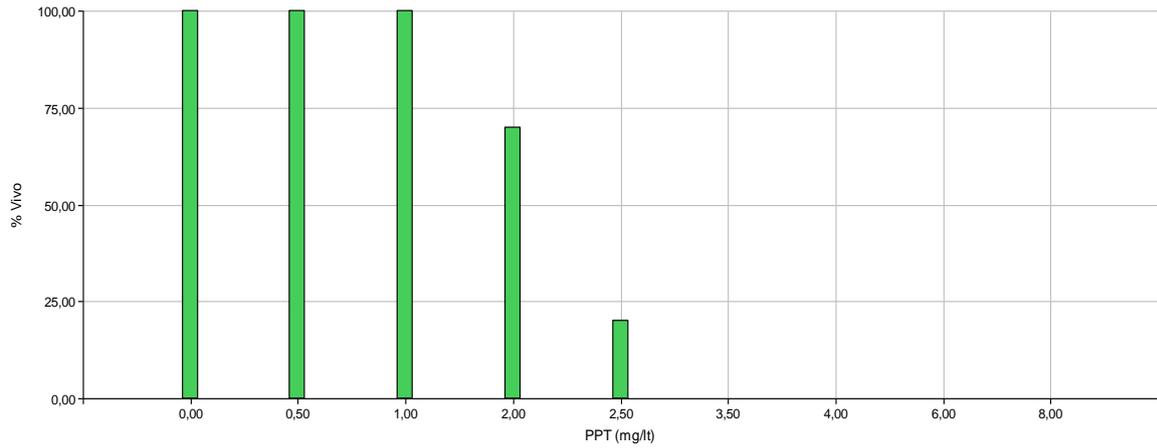
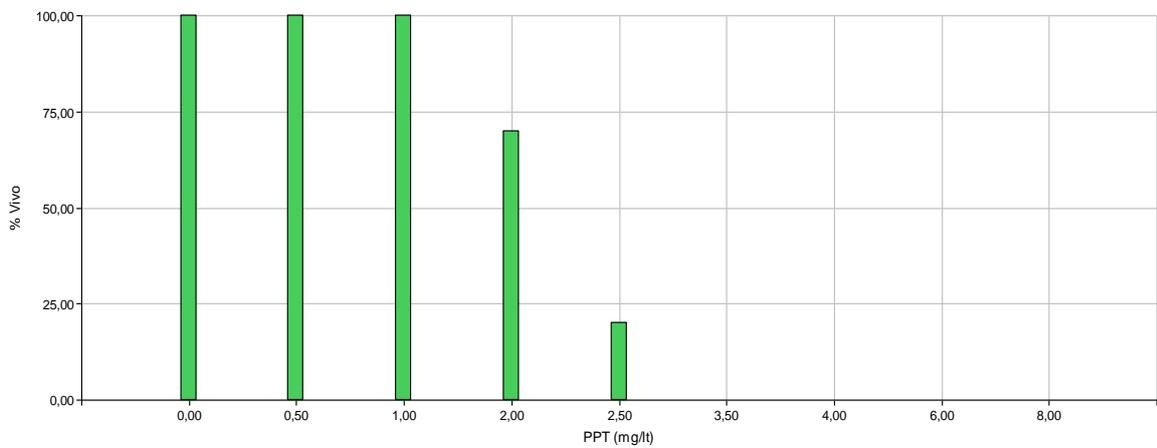


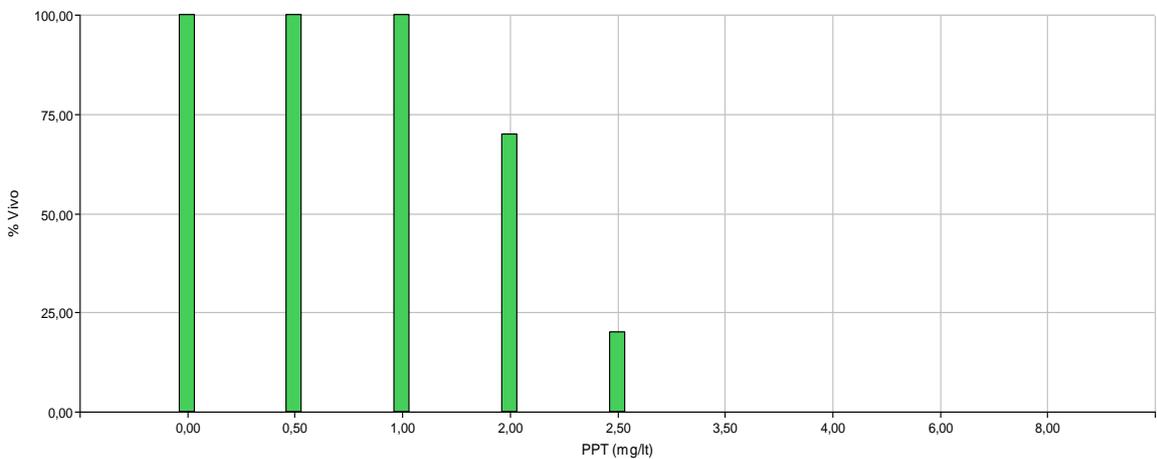
Figura 15. Curva de sensibilidad al agente selectivo fosfinitricina en *E. curvula* var. Kromdraai a los A.10 días, B.20 días, C.30 días, porcentaje de supervivencia en control 0mgr/Lt y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/Lt, 1,00 mgr/Lt, 2,00 mgr/Lt, 2,50 mgr/Lt, 3,50 mgr/Lt, 4,00 mgr/Lt, 6,00 mgr/Lt y 8,00 mgr/Lt.



D)



E)



F)

Figura 16. Curva de sensibilidad al agente selectivo fosfinitricina en *E. curvula* var. Kromdraai a los D.40 días, E.50 días, F.60 días, porcentaje de supervivencia en control 0mgr/l y las siguientes concentraciones de 0,50 mgr/l, 1,00 mgr/l, 2,00 mgr/l, 2,50 mgr/l, 3,50 mgr/l, 4,00 mgr/l, 6,00 mgr/l y 8,00 mgr/l.

CONCLUSIONES

- En las condiciones utilizadas en esta tesis, no se logró la transformación estable de pasto llorón, con lo cual la hipótesis no se cumple, pero se lograron resultados que permiten visualizar una transformación a corto plazo teniendo en cuenta las consideraciones especificadas en este capítulo.
- Se obtuvo la curva de mínima concentración inhibitoria de supervivencia al agente selectivo fosfotricina para pasto llorón.
- Se obtuvo un protocolo de transformación transiente para dos cultivares de pasto llorón a partir de semillas maduras utilizando dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, AGL0 y AGL1, que difieren en su capacidad de virulencia, portando el vector binario pPZP201BUGI.
- El cultivar que mejores resultados arrojó en cuanto a expresión transiente de GUS y regeneración de plantas fue Tanganyika (teniendo en cuenta que no hubo suficiente cantidad de semilla de Morpa para continuar trabajando).
- El mejor explanto en este sentido fueron las semillas maduras heridas.
- Deberán ajustarse algunas variables a fin de obtener un protocolo de transformación estable para pasto llorón. Entre los factores a tener en cuenta se encuentran, el tipo explanto, el genotipo y el incremento del n experimental. La cepa de *Agrobacterium* y el vector también deberán tenerse en cuenta, actualmente se cuenta con una amplia batería de vectores y cepas obtenidos con nuevas tecnologías que sería conveniente utilizar.

CONSIDERACIONES FINALES

Para el desarrollo de cultivares mejorados es esencial el conocimiento del modo de reproducción de la especie y de la variabilidad genética disponible. El complejo *E. curvula* está compuesto mayormente por materiales apomícticos. Este modo reproductivo limita los cruzamientos, que son una herramienta por excelencia del mejorador de plantas y constituyen un paso esencial en el proceso de mejoramiento. La identificación de materiales sexuales en el complejo es indispensable para la obtención de híbridos. Sin embargo estos materiales son muy escasos y menos vigorosos que los materiales apomícticos. En este trabajo de tesis no se logró la obtención de híbridos debido a problemas de incompatibilidad entre los parentales, a pesar de poseer el mismo nivel de ploidía, pero se logró obtener y caracterizar por marcadores moleculares un número importante de materiales sexuales, producto de la autofecundación del parental femenino debido al efecto mentor del polen del material apomíctico.

Se demostró que los tipos *curvula* y *conferta* no son compatibles por lo cual, para obtener una población de mapeo por modo reproductivo es menester utilizar parentales genéticamente más cercanos.

La caracterización de los materiales realizada en esta tesis permitió identificar algunas plantas con características promisorias para utilizarlas en programas de mejoramiento de la especie.

Actualmente el mejoramiento de plantas puede recurrir a las técnicas biotecnológicas tales como, ingeniería genética, biología molecular, cultivo de tejidos y transferencia de genes, herramientas poderosas para introducir nuevas características a las especies. El modo reproductivo en este caso representa una ventaja, dado que el transgen se transmitirá a la progenie de estas plantas sin recombinación. Por otro lado la apomixis representa una barrera importante para la contención de los transgenes.

En este trabajo se utilizó el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, que es un eficiente vector en la Ingeniería genética de plantas como se describió anteriormente.

Se puede concluir que en las condiciones utilizadas en este trabajo no se logró la transformación estable de pasto llorón, con lo cual la hipótesis no se cumple, pero se lograron resultados que permiten visualizar una transformación a corto plazo, teniendo en cuenta las consideraciones especificadas en el Capítulo 2, ya que se obtuvo un protocolo de transformación transiente para dos cultivares de pasto llorón a partir de semillas maduras utilizando dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, AGL0 y AGL1, que difieren en su capacidad de virulencia, portando el vector binario pPZP201BUGI.

El cultivar Tanganyika arrojó los mejores resultados en cuanto a expresión transiente de GUS y regeneración de plantas con el explanto semillas maduras heridas.

Deberán ajustarse algunas variables a fin de obtener un protocolo de transformación estable para pasto llorón. Entre los factores a tener en cuenta se encuentran, el tipo explanto, el genotipo, el aumento del n experimental. La cepa de *Agrobacterium* y el vector también deberán tenerse en cuenta, actualmente se cuenta con una amplia batería de vectores y cepas obtenidos con nuevas tecnologías que sería conveniente utilizar.

BIBLIOGRAFIA

- Acuña C. A. Blount, A. R., Quesenberry K. H. Kenworthy K. E. Hanna W. W. 2011. *Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids*. Euphytica 179:227-235.
- Acuña C. A. Blount, K. H., Quesenberry K. E. Kenworthy, and W. W. Hanna 2009. *Bahiagrass tetraploid germplasm: Reproductive and Agronomic Characterization of segregating progeny*. Crop Science, VOL. 49.
- Adams, M., J. Keller, J. Gocayne, M. Dubnick, M. Polymeropoulos, H. Xiao, C. Merrill, A. Wu, B. Olde, R. Moreno, A. Kerlavage, W. McCombie y J. Venter. 1991. *Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project*. Science, 252:1651-6.
- Andrés A, 2005. *El mejoramiento genético de las especies forrajeras*. Manual de Pasturas. Bayer Cropscience, 5-10.
- Antony Ceasar, S., and Ignacimuthu, S. 2011. *Agrobacterium-mediated transformation of finger millet (Eleusine coracana(L.) Gaertn.) using shoot apex explants*. Plant Cell Rep.30, 1759–1770.
- Ahloowalia B. 1983. *Spectrum of variation in somaclones of triploid ryegrass*. Crop. Sci., 23: 1141-1147.
- Aguado-Santacruz, G. A.; Rascon-Cruz, Q.; Cabrera-Ponce, J. L.; MartinezHernandez, A.; Olalde-Portugal, V.; Herrera-Estrella, L. 2002. *Transgenic plants of blue grama grass, Bouteloua gracilis(H.B.K.) Lag. Ex Steud., from microprojectile bombardment of highly chlorophyllous embryogenic cells*. Theor. Appl. Genet. 104:763–771
- Altpeter, F.; Xu, J. P. 2000 *Rapid production of transgenic turfgrass (Festuca rubraL.) plants*. J. Plant Physiol. 157:441–448;.
- Altpeter, F.; Xu, J. P.; Ahmed, S. 2000. *Generation of large numbers of independently transformed fertile perennial ryegrass (Lolium perenne L.) plants of forage- and turf-type cultivars*. Mol. Breed. 6:519–528;
- Amoah BK, Wu H, Sparks C, Jones HD (2001) *Factors influencing Agrobacterium-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue*. J. Exp. Bot. 52:1135-1142
- Arencibia AD, Carmona ERC, Tellez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE, Oramas P 1998. *An efficient protocol for sugarcane (Saccharum spp. L.) transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic Res. 7:213-222.

- Armando L V 2014. *Caracterización morfológica y molecular de Panicum coloratum var. makarikariense Goossens*. Tesis Doctorado en Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Argentina.
- Asano, Y.; Ito, Y.; Fukami, M.; Sugiura, K.; Fujie, 1998. *A. Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer*. Plant Cell Rep. 17:963–967
- Asano, Y.; Ugaki, M. 1994. *Transgenic plants of Agrostis alba obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts*. Plant Cell Rep. 13:243–246
- Asker, S; Jerling L. 1992. *Apomixis in plantas*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ayele M, Tefera H, Asefa K y Nguyen T 1999. *Genetic characterization of two Eragrostis species using AFLP and morphological traits*. Hereditas 130:33-40
- Bajaj, S.; Ran, Y.; Phillips, J.; Kulrajathevan, G.; Pal, S.; Cohen, D.; Elborough, K.; Puthigae, S. 2006.. *A high throughput Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation method for functional genomics of perennial ryegrass (Lolium perenne L.)*. Plant Cell Rep. (in press)
- 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, p. 88.
- Bartlett J G, Alves S C, Smedley M, Snape J W, Harwood W A. 2008. *High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation*. Plant Methods 4:22
- Bashaw, E.C. 1962. *Apomixis and sexuality in buffelgrass*. Crop Sci. 2:412-415.
- Bashaw EC, Hanna WW. 1990. *Apomictic reproduction*. In: Chapman G editor Reproductive versatility in the grasses. 1st ed. Cambridge, UK Cambridge University Press, 100-130.
- Bashaw EC, Hignight KW. 1990. *Gene transfer in apomictic buffelgrass through fertilization of an unreduced egg*. Crop Sci;(30):571-575.
- Bashaw EC, 1969. *Registration of buffelgrass germoplasm*. Crop Sci 9:396.
- Bechold N, Jaudeau B, Jolivet S, Maba B, Vezon D, Voisin R, Pelletier G 2000. *The maternal chromosome set is the target of T-DNA in planta transformation of Arabidopsis thaliana*. Genetics 155:1875-1887.

- Beckmann, J. y M. Soller. 1986. *Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement*. Oxford Surveys Plant Mol. Biol. Cell. Biol., 3:197-250.
- Bettany, A. J. E.; Dalton, S. J.; Timms, E.; Manderyck, B.; Dhanoa, M. S.; Morris, P. 2003.. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Festuca arundinacea(Schreb.) and Lolium multiflorum (Lam.)*. Plant Cell Rep. 21:437–444
- Bellinder, R, Lyons E, Scheckler S y Wilson H, 1987. *Cellular alterations resulting from foliar applications of HOE-39866*. Weed Sci. 35:27-35.
- Bergamn A, Gardestrom P, y Ericson O. 1981. *Release and refixation of ammonia during fotorespiration*. Plant Physiology. 53:528-532.
- Beyene Y, Botha A-M y Myburg A, 2005. *A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian Highland maize*. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (7), pp. 586-595.
- Bhalla, P. L.; Swoboda, I.; Singh, M. B. 1999. *Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen*. Proc. Natl Acad. Sci.USA 96:11676–11680
- Boisson Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard G., Rosenberg C. & Barker D. 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.
- Bor, N. L. 1973. *The grasses of Burma, Ceylon, India and Pakistan (excluding Bambusaseae)*. Pergamon Press. Londres: 495-581.
- Brasileiro A C M, Caneiro V T C 1998. *Manual de transformación genética de plantas*. EMBRAPA Brasilia 309p.
- Botterman J. y Leemans J 1989. *Discovery, transfer to crops, expression and biological significance of bialaphos resistance gene*. British Crop Prot. Council monograph 42: 63-67.
- Brix K. 1974. *Sexual reproduction in Eragrostis curvula (Schrad.) Nees*. Z. Pflanzenzuchtg, 71: 25-32.
- Broer I, Arnold W, Wohlleben W y Puhler A, 1989. *The phosphinothricin-N-Acetyltransferase gene as a selectable marker for plant genetic engineering*. In G, Gallig, Ed, Proceedings of the Braunschweig Symposium on Applied Plant Molecular Biology 240-246.
- Brouwer D. & Osborn T. 1999. *A molecular linkage map of tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. Theor. Appl. Genet., 99: 1194-1200.

Brown J, Caligari P. D. S, Campos H. A. 2014. *Plant Breeding*, Second Edition 4: 64-65.

Brummer E., Bouton J., Sledge M. & Kochert G. 2000. Molecular mapping in alfalfa related species. En: *DNA-based markers in plants*. (eds. Vasil I y Phillips R.). Kluwer Acad. Dordrecht.

Burgos J. J. 1963. *El clima de las regiones áridas en la Republica Argentina*. Rev. Invest. Agric. INTA 17:385-405.

Burrow GB, Jessup RW, Bowers JE, Schulze SR, Li Z, Wang YW, Burson BB, Hussey MA y Patterson AH 2001 *Alignment of Pennisetum ciliare and Sorghum bicolor chromosomes based on EST-enriched genetic maps*.

Busey, P. y Wright, L. N. 1976. *Interespecific hybridization of lovegrasses (Eragrostis)* Agron. Abstr. 68:47.

Busso C, Brevedan R. 1991. *Nutrición mineral*. En: *El pasto Ilorón, su Biología y Manejo*.

Ed. Fernández O, Brevedan R, Gargano A. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina, p 57-126.

Buxton D. & Mertens D. 1995. Quality-related characteristics of forages. En: *Forages: The Science of Grassland Agriculture Vol. 21*.(eds. Barnes R.; Darrell A.; Nelson C.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Campbell T. 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, p. XX.

Cardone S. 2006. *Consecuencias genéticas del cultivo in vitro en un pasto apomíctico y su progenie*. Tesis de Doctorado. UNS.

Cardone S, Polci P, Selva JP, 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.

Carnahan, N. L. y Hill, H. D. 1961. *Cytology and genetics of forage grasses*. Abstr. Rev. 27:1-162

- Cavagnaro PF, Cavagnaro JB, Lemes JL, Masuelli RW y Passera CB 2006. *Genetic diversity among varieties of the native forage grass Trichloris crinita base don AFLP markers, morphological characters, and quantitative agronomic traits*. NRC Genome Vol 49 Canada.
- Cervigni G D L, Paniego N, Díaz M, Selva J P, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Martelotto L, Felitti S, Pessino S, Spangenberg G, 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(1-2):1-10.
- Cervigni G D L, Paniego N, Pessino S, Selva J P, Díaz M, Spangenberg G, Echenique V. 2008. *Gene expression in diplosporous and sexual Eragrostis curvula genotypes with differing ploidy levels*. Plant Mol Biol. 67(1-2):11-23.
- Chai, B.; Maqbool, S. B.; Hajela, R. K.; Green, D.; Vargas, J. M. Jr; Warkentin, D.; Sabzikar, R.; Sticklen, M. B. 2002. *Cloning of a chitinase like cDNA (hs2), its transfer to creeping bentgrass (Agrostis palustris Huds.) and development of brown patch (R. solani) disease resistant transgenic lines*. Plant Sci. 163:183– 193
- Chai, M. L.; Senthil, K. K.; Kim, D. H. 2004. *Transgenic plants of colonial bentgrass from embryogenic callus via Agrobacterium-mediated transformation*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 77:165–171
- Chen X, Equi R, Baxter H, Berk K, Han J, Agarwal S, Zale J. 2010. *A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (Panicum virgatum L.) seedlings*. Biotechnology for Biofuels 3: 9.
- Chen, L.; Auh, C.; Dowling, P.; Bell, J.; Chen, F.; Hopkins, A.; Dixon, R. A.; Wang, Z.-Y. 2003. *Improved forage digestibility of tall fescue (Festuca arundinacea) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase*. Plant Biotechnol. J. 1:437–449
- Chen, L.; Auh, C.; Dowling, P.; Bell, J.; Lehmann, D.; Wang, Z.-Y 2004. *Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (Festuca arundinacea)*. Funct. Plant Biol. 31:235–245
- Chen, X.; Yang, W. Q.; Sivamani, E.; Bruneau, A. H.; Wang, B. H.; Qu, R.D. 2005. *Selective elimination of perennial ryegrass by activation of a proherbicide through engineering E. coli argE gene*. Mol. Breed. 15:339–347
- Cherney J., Cherney D., Akin D. & Axtell J. 1991. *Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality*. Adv. Agron. 46: 157-198.

- Cho, M. J.; Choi, H. W.; Lemaux, P. G. 2001. *Transformed T0 orchardgrass (Dactylis glomerata L.) plants produced from highly regenerative tissues derived from mature seeds*. Plant Cell Rep. 20:318–324
- Cho, M. J.; Ha, C. D.; Lemaux, P. G. 2000 *Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues*. Plant Cell Rep. 19:1084–1089
- Coruzzi y Last 2000. *Amino Acids*. En Biochemistry and Molecular Biology of Plants. 358-410.
- Covas G. 1991. *Introducción del Pasto Llorón en la Argentina*. En: El pasto llorón, su Biología y Manejo. Eds. O. Fernández, R. Brevedan y A. Gargano, CERZOS y UNS, Bahía Blanca, Argentina. 1:1-6.
- Covas, G y Carnie A. 1985. *El pasto llorón Eragrostis curvula: manual con información básica y normas para su cultivo y utilización*. Buenos Aires Hemisferio Sur.
- Crane CF. 2001. *Classification of apomictic mechanisms* In: Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T editors. The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering; 1st ed. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR) 24-43.
- Chakrabarty R, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Singh BD, Chopra VL. 2002 *Agrobacterium-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower*. J. Biosci.27:495-502
- Cheng, M.; Fry, J. E. 2000. *An improved efficient Agrobacterium-mediated plant transformation method*. Int. Patent. Publ. WO 00/34491
- Cheng, M.; Hu, T.; Layton, J.; Liu, C.-N.; Fry, J. E. 2003. *Desiccation of plant tissues post-Agrobacterium infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 39(6): 595–604
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou I, Hironaka C, Duncan DRI, Conner TWL, Wang Y 1997. *Genetic transformation of Wheat mediated by Agrobacterium tumefaciens*, Plant. Physiol.115:971-980.
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY, 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. J. Mol. Breed.11:287-293
- Christopher, J. y Abraham, A. 1974. Studies on the cytology and phylogeny of South Indian grasses. II Subfam. Eragrostoidae. Cytologia 39:561-571.

Colom M. & Vazzana C. 2002. Water stress effects on three cultivars of *Eragrostis curvula*. Italian J. Agron., 6(2): 127-132.

Colomba MS y Gregorini A 2011. Genetic diversity analysis of the durum wheat Graziella Ra, *Triticum turgidum* L. subsp. Durum (Desf.) Husn. (Poales, Poaceae). Biodiversity Journal 2 (2): 73-84.

Covas G, 1979. Normas para el manejo del pasto lloron. Informativo Tecnol. Agrop. Reg. Semiar. Pampeana 74:9-10. EEA Anguil

Creemers-Molenaar J., Loeffen J. & 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.

Cronquist, A. 1981. "Integrated System of Classification of Flowering Plants". Columbia Univ. Press, Nueva York, EEUU, 1262 pag.

Croughan S., Quisenberry S., Colyer P. & Brown T. 1994. Registration of Brazos-R3 bermudagrass germoplasm. Crop Sci., 34: 542.

Dahleen L. & Eizenga G. 1990. Meiotic and isozymic characterization of plants regenerated from euploid and selfed monosomic tall fescue embryos. Theor. Appl. Genet., 79: 39-44.

Dai, W. D.; Bonos, S.; Guo, Z.; Meyer, W. A.; Day, P. R.; Belanger, F. C2003. Expression of pokeweed antiviral proteins in creeping bentgrass. Plant Cell Rep. 21:497–502

Dale P. & Dalton S. 1983. Immature inflorescence culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*. Z. Pflanzenphysiol., 111: 39-45.

Dale P., Thomas E., Brettell R. & Wernicke W. 1981. Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1: 47-55.

Dalton, S. J.; Bettany, A. J. E.; Bhat, V.; Gupta, M. G.; Bailey, K.; Timms, E.; Morris, P. 2003. Genetic transformation of *Dichanthium annulatum* (Forssk): An apomictic tropical forage grass. Plant Cell Rep. 21:974–980

- Dalton, S. J.; Bettany, A. J. E.; Timms, E.; Morris, P, 1995. The effect of selection pressure on transformation frequency and copy number in transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Sci.*108:63–70
- Dalton, S. J.; Bettany, A. J. E.; Timms, E.; Morris, P. 1999.Co-transformed, diploid *Lolium perenne* (Perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum*(Darnel) plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 18:721–726
- Dalton S. 1988. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass). *J. Plant Physiol.*, 132: 170-175.
- Darlington, C.D.1939. The evolution of genetic systems. University Press, Cambridge, UK. 149 p.
- Darwin, C.1875. The variation of animals and plants under domestication. Second edition, revised.Vol. II.(London: John Murray). p. 97.
- De Clercq J, Zambre M, Van Montagu M, Dillen W, Angenon G 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius*A. Gray. *Plant Cell Rep.*21:333-34
- De Block M, Botterman J et al., 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying. *EMBO* 6:2513-1518.
- De Block M 1988. Genotype-independent leaf disease transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor Appl Genet* 76:767-774.
- Denchev, P. D.; Songstad, D. D.; McDaniel, J. K.; Conger, B. V. 1997.Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata*) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells. *Plant Cell Rep.*16:813–819
- De Wet J. M. J. 1954 Chromosome numbers of a few South African grasses. *Cytologia* 19:97-103.
- De Wet JMJ. 1968. Diploid- tetraploid- haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. *Evolution*;(22):394-397.
- De Wet JMJ, Stalker HT. 1974. Gametophytic apomixis and evolution in plants. *Taxon*;(23):689-697.

- De Wet MJM. Hybridization and polyploidy in the Poaceae. 1986. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth ME editors. Grass systematic and evolution 1st ed. Washington, DC USA; Smithsonian Institution Press; 188-194.
- De Winter, B. 1955. *Eragrostis* Beauv. En: The Grasses and Pastures of South Africa. D. Meredith (Ed.) Central News Agency (Sudáfrica): 132-184.
- De Guglielmo, Z; Fernandez, R; Hermoso, L; Altosaar, I; Menéndez, A. 2010. Optimización de los parámetros de transformación genética de café mediante biobalística con el gen reportero GUS. *Acta Biológica Venezolana*. Vol. 30 (1-2): 23-24
- De Guglielmo, Z. 2009. Ingeniería genética aplicada al café. *Revista UDO Agrícola* 9 (3): 475-486
- Dellaporta SL, Chomet PS, Mottinger JP, Wood JA, Yu SM, Hicks JB 1984. Endogenous transposable elements associated with virus infection in maize. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 49: 321-328.
- Desfeux C, Clough SJ, Bent AF 2000. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium* – mediated transformation by the Arabidopsis floral – dip method. *Plant, Physiol.* 123: 859-904.
- D'Halluin K, Botterman J y De Gref W 1990. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Science* 30: 866-871.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Di Renzo MA., Ibañez MA, Bonamico NC., Faricelli M.E, Poverene MM, Echenique CV. 2003. Effect of three environments on the efficiency of indirect selection in *Eragrostis curvula* (lovegrass) genotypes. *J Agric Sci* 140: 427–433.
- Di Renzo MA, Ibañez MA, Bonamico NC, Poverene MM. 2000. Estimation of repeatability and phenotypic correlations in *Eragrostis curvula*. *J Agric Sci* 134: 207-212.
- Diaz M, 2006. Biotecnología aplicada al mejoramiento de la calidad forrajera del pasto llorón, *Eragrostis curvula*. Tesis Doctoral UNS. Argentina
- Diaz, Zappacosta, Franzone, Ríos. 2010. II Capítulo 6 Aplicaciones de la transformación genética al mejoramiento vegetal. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*.

- Ding L, Li S, Gao J, Wang Y, Yang G, He G. 2007. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Molecular Biology Reports* 36:29-36.
- Ding, Li, Gao, Wang, Yang, He. 2009. Optimization of *Agrobacterium* – mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol Biol Rep* 36:29-36.
- Dong, S., and Qu, R. 2005. High efficiency transformation of tall fescue with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 168, 1453–1458.
- Drogue W, Brroer I y Puhler A 1992. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187:142-151.
- Du, Wu, Yan and Li. 2010. Effect of basal media, salt concentrations, antioxidant supplements and co-effects on the *Agrobacterium*- mediated transformation efficiency in maize. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (8), pp. 1135-1143.
- Duque, A; DE Sousa, S; Ataíde, M; Santos, D; Fevereiro, M. 2007. Use of fused gfp and gus reporters for the recovery of transformed *Medicago truncatula* somatic embryos without selective pressure. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90: 325-330 DOI 10.1007/s11240-007-9268-6
- Echenique y Curveto 1986. *Efecto del déficit hídrico en cinco cultivares de pasto llorón, Eragrostis curvula (Scharad.) Nees sens lat. Niveles de clorofila y prolina foliar y permeabilidad de membranas celulares.* *Phyton* 46:195-206.
- Echenique V, Curvetto NR. 1991. *Resistencia a sequía y temperaturas extremas. En: El pasto llorón, su Biología y Manejo.* Ed. Fernández O, Brevedan R, Gargano A. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina, p 217-250.
- Echenique, V. y P. Polci. 1994. *Efecto del estrés hídrico en el estado reproductivo en pasto llorón Eragrostis curvula (Schrad) Nees.* *Turrialba*, 44:189-204.
- Echenique V, Polci P, Mroginski L. 1996. *Plant regeneration in weeping lovegrass, (Eragrostis curvula) through inflorescence culture.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 123-130.
- Echenique V, Diaz M, Polci P and Mroginski, 2001. *Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of Eragrostis curvula (Schrad) Nees.* *Biocell* 25:131-138.
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, et al. 2005. *Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guinea grass (Panicum maximum Jacq.).* *Grassland Science* 51:71-78.

- El Rabey H et al., 2014. *Phylogeny of ten species of the genus Hordeum L as revealed by AFLP markers and seed storage protein electrophoresis*. MOL Biol Rep 41:365-372
- Engler, A. y L. Diels. 1936. *Syllabus der Pflanzenfamilien*, 11^a ed, Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino S et al., 2006. *Genetic characterization of Paspalum notatum accesions by AFLP markers*. PI Syst. Evol. 258:147-159.
- Fang, Y.-D.; Akula, C.; Altpeter, F. 2002. *Agrobacterium-mediated barley (Hordeum vulgareL.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA: barley genomic DNA junctions*. J. Plant Physiol. 159:1131–1138
- Fernández O. A. Brededan R. E. Gargano A. O. 1991. *El pasto llorón su biología y manejo*. Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) Departamento de Agronomía UNS Bahía Blanca (Bs. As.) Argentina.
- Ferreira ME, Gratrapaglia D 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético* MA-EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia.
- Forster J., Jones E., Kölliker R., Drayton M., Dumsday J., Dupal M., Guthridge K., Mohoney N., Van Zijl DE Jong E. & Smith K. 2001. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. En: *Molecular breeding of forage crops*. (ed. Spangenberg G.). Kluwer Academic Publishers.pp.101-133.
- Fores, Jr., I. and Burton, G.W 1961. Induction of tetraploidy and a rapid field method of detecting induced tetraploidy in Paspalum bahiagrass. CropSci. 1:383-384.
- Frame, B. R.; Shou, H.; Chikwamba, R. K.; Zhang, Z.; Xiang, C.; Fonger, T. M.; Pegg, S. E. K.; Li, B.; Nettleton, D. S.; Pei, D.; Wang, K. 2002. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system*. Plant Physiol. 129:13–22
- Frayssinet N., Cardone S., Polci P., Mroginski L. & Echenique C. 1999. *Cytological alterations in Eragrostis regenerants*. Cytologia, 64: 129-135.
- Fu, D.; Amand, P. C.; Xiao, Y.; Muthukrishnan, S.; Liang, G. H, 2006. *Characterization of T-DNA integration in creeping bentgrass*. Plant Sci. (in press)
- Fu Y-B, Williams DJ 2008. *AFLP variation in 25 Avena SPECIES*. Theor Appl Genet 117:333-342

Fulton, T., R. van der Hoeven, N. Eannetta y S. Tanksley. 2002. *Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants*. Plant Cell, 14:1457-67.

García A., Dalton S. & Humphreys M. 1994. Reproductive disturbances and phosphoglucoisomerase instability in *Festuca arundinacea* (tall fescue) plants regenerated from callus and cell suspension cultures. Heredity, 73: 355-362.

Garbus I, Romero J, Selva J, Pessino S, Echenique V. 2014. Construction of floral transcriptome and miRNA databases for apomictic and sexual genotypes of *Eragrostis curvula*. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario. Argentina ISSN N°1853-4333- Número XXIV Año 14-2014.

Gargano A. O., Aduriz MA, Arelovich HM, Amela MI, 2001. *Forage yield and nutritive value of Eragrostis curvula and Digitaria eriantha in central-south semi-arid Argentina*. Trop Grassl 35: 161–167.

Gargano A, 1991. *Capítulo 9 Implantación y manejo durante el primer año*. En: *El pasto llorón, su Biología y Manejo*. Ed. Fernández O, Brededan R, Gargano A. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina

Gasparis, S., Bregier, C., Orczyk, W., and Nadolska-Orczyk, A. 2008. *Agrobacterium-mediated transformation of oat (Avena sativa L.) cultivars via immature embryo and leaf explants*. Plant Cell Rep. 27, 1721–1729.

Gao, Jayaraj, Muthukrishnan, Claflin and Liang. 2005. *Efficient genetic transformation of Sorghum using a visual screening marker*. Genome 48: 321-333.

Gao C, Liu J, Nielsen K K. 2009. *Agrobacterium-mediated transformation of meadow fescue (Festuca pratensis Huds.)*. Plant Cell Reports 28: 1431-1437.

Gao C, Long D, Lenk I, Nielsen K K. 2008. *Comparative analysis of transgenic tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment*. Plant Cell Reports 27:1601-1609.

Ge, Y.; Narton, T.; Wang, Z.-Y. 2006. *Transgenic zoysiagrass (Zoysia japonica) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation*. Plant Cell Rep. (in press)

- Ge Y, Cheng X, Hopkins A, Wang Z. 2007. *Generation of transgenic Lolium temulentum plants by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation*. Plant Cell Reports 26: 783-789.
- Giordano A, Cogan N, Kaur S, Drayton M, Mouradov A, Panter S, Schrauf G, Mason J, Spangenberg G. 2014. *Gene Discovery and Molecular Marker Development, Based on High-Throughput Transcript Sequencing of Paspalum dilatatum Poir*. Plos One 9: 1-10.
- Goldman, J. J.; Hanna, W. W.; Fleming, G. H.; Ozias-Akins, P. 2004. *Ploidy variation among herbicide-resistant bermudagrass plants of cultivar TifEagle transformed with the bar gene*. Plant Cell Rep.22:553–560
- Gondo, T.; Tsuruta, S.-I.; Akashi, R.; Kawamura, O.; Hoffmann, F. 2005. *Green, herbicide-resistant plants by particle inflow gun-mediated gene transfer to diploid bahiagrass (Paspalum notatum)*. J. Plant Physiol.162:1367–1375
- Gordon-Kamm, W.; Dilkes, B. P.; Lowe, K.; Hoerster, G.; Sun, X.; Ross, M.; Church, L.; Bunde, C.; Farrell, J.; Maddock, S.; Snyder, J.; Sykes, L.; Li, Z.; Woo, Y.-M.; Bidney, D.; Larkins, B. A. 2002. *Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99:11975–11980
- Gordon A. 1975. A comparison of some chemical and physical properties of alkali lignin from grass and lucerne hays before and after digestion by sheep. J. Sci. Food Agric., 26: 1551-1559.
- Gould, F. 1960. *Chromosome numbers in Southwestern grasses*. II. Am. J. Bot. 47:873-877.
- Gould, F. 1968. *Chromosome numbers of Texas grasses*. Can. J. Bot. 46:1315-1325.
- Guo, D. J.; Chen, F.; Inoue, K.; Blount, J. W.; Dixon, R. A, 2001a. *Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-Omethyltransferase 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 Sci., 41: 143-148.

- Ha, C. D.; Lemaux, P. G.; Cho, M. J. 2001. *Stable transformation of a recalcitrant Kentucky bluegrass (Poa pratensis L.) cultivar using mature seed-derived highly regenerative tissues*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37:6–11
- Ha, S. B.; Wu, F. S.; Thorne, T. K. 1992. *Transgenic turf-type tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) plants regenerated from protoplasts*. Plant Cell Rep. 11:601–604
- Hacker, J.B. 1988. *Sexuality and hybridization in signal grass, Brachiaria deumbens*. Trop. Grassl. 22(3):139-144
- Haddad A, El Rabey, et al., 2014. *Phylogeny of ten species of the genus Hordeum L as revealed by AFLP markers and seed storage protein electrophoresis*. Mol Biol Rep 41:365-372
- Hajdukiewicz P, et al., 1994. *The small versatile PpZP FAMILY OF Agrobacterium binary vectors for plant transformation*. Plant Molecular Biology 25:989-994
- Halpin C., Knight M., Foxon G., Campbell M., Boudet A., Boon J., Chabbert B., Tollier M. & Schuch W. 1994. *Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase*. Plant J., 6: 339-350.
- Han, N.; Chen, D.; Bian, H.-W.; Deng, M.-J.; Zhu, M.-Y, 2005.. *Production of transgenic creeping bentgrass Agrostis stolonifera var. palustris plants by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation using hygromycin selection*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 81:131–138
- Hanna WW and Bashaw EC. 1987. *Apomixis, its identification and use in plant breeding*. Crop Sci; 27(6):136-1139.
- Harlan JR, Brooks MH, Borgoankar D, de Wet JMJ, 1964. *Nature and inheritance of apomixis in Botriochloa and Dichantium*. Bot Gaz; (125):41-46.
- Harlan JR, JMJ de Wet. On Ö. Winge and a prayer: 1975. *The origins of Polyploidy*. Bot Review; 41(4):361-390.
- Hashizume F, Tsuchiya T, Ugaki M, Niwa Y, Tachibana N, Kowayama Y 1999. *Efficient Agrobacterium – mediated transformation and the usefulness of a synthetic GFP reporter gene in leading varieties of japonical rice*. Plant Biotechnol. 16:397-401.
- Hartman, C. L.; Lee, L.; Day, P. R.; Tumer, N. E. 1994. *Herbicide resistant turfgrass (Agrostis palustris Huds.) by biolistic transformation*. Bio/Technology 12:919–923
- Hauptmann, R. M.; Ozias-Akins, P.; Vasil, V.; Tabaeizadeh, Z.; Rogers, S.G.; Horsch, R. B.; Vasil, I. K.; Fraley, R. T. 1987. *Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species*. Plant Cell Rep. 6:265–270

- He Y, Jones H D, Chen S, Chen X M, Wang D W, Li K X, Wang D S, Xia LQ. 2010. *Agrobacterium-mediated transformation of durum wheat (Triticum turgidum L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency*. J Exp Bot. 61(6):1567-81.
- Hensel, G., Valkov, V., Middlefell-Williams, J., and Kumlehn, J. 2008. *Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions*. J. Plant Physiol. 165, 71–82.
- Henzi MX, Christey MC, McNeil DL 2000 *Factors that influence Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of broccoli (Brassica oleracea L. var. italica)*. Plant Cell Rep. 19:994-999
- Hensgens, L. A. M.; de Bakker, E. P. H. M.; van Os-Ruygrok, E. P.; Rueb, S.; van de Mark, F.; van der Maas, H. M.; van der Veen, S.; Kooman Gersmann, M.; Hart, L.; Schilperoort, R. A. 1993. *Transient and stable expression of gusA fusions with rice genes in rice, barley and perennial ryegrass*. Plant Mol. Biol. 23:643–669
- Hernández Villarreal AE, 2013. *Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos*. Revista BIO CIENCIAS 2(3):113-118
- Hisano, H.; Kanazawa, A.; Kawakami, A.; Yoshida, M.; Shimamoto, Y.; Yamada, T. 2004. *Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing*. Plant Sci. 167:861–868
- Hiei, Y., and Komari, T. 2008. *Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed*. Nat. Protoc. 3, 824–834. doi: 10.1038/nprot.2008.46
- Higuchi T. 1985. *Biosynthesis of lignin*. In: *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. (ed. Higuchi, T.). Orlando, FL: Academic Press, pp. 141-160.
- Holme, Pedersen, Lange, Holm. 2008. *Transformation of different barley (Hordeum vulgare L.) cultivars by Agrobacterium tumefaciens infection of in vitro cultured ovules*. Plant Cell Rep 27:1833-1840.
- Holsters M, Dewaffle D, de Messens E, Montagu M, van Schell j 1978. *Transfection and transformation of Agrobacterium tumefaciens*. Molecular and General Genetics, v. 163, p. 181-187.
- Hörandl E, Temsch EM 2009. *Introgression of apomixis into sexual species is inhibited by mentor effects and ploidy barriers in the Ranunculus auricomus complex*. Annals of Botany 104:81-89.

- Horn, M. E.; Shillito, R. D.; Conger, B. V.; Harms, C. T. 1988. *Transgenic plants of orchardgrass (Dactylis glomerata L.) from protoplasts*. Plant Cell Rep. 7:469–472.
- Howe, Sato, Dweikat, Fromm, Clemente. 2006. *Rapid and reproducible Agrobacterium – mediated transformation of Sorghum*. Plant Cell Rep 25:784-791.
- Hu, F.; Zhang, L.; Wang, X.; Ding, J.; Wu, D. 2005a *Agrobacterium-mediated transformed transgenic triploid bermudagrass (Cynodon dactylon x C. transvaalensis) plants are highly resistant to the glufosinate herbicide Liberty*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 83:13–19
- Hu, Y.; Jia, W.; Wang, J.; Zhang, Y.; Yang, L.; Lin, Z. 2005b. *Transgenic tall fescue containing the Agrobacterium tumefaciens ipt gene shows enhanced cold tolerance*. Plant Cell Rep. 23:705–709
- Hu, T.; Metz, S.; Chay, C.; Zhou, H.-P.; Biest, N.; Chen, G.; Cheng, M.; Feng, X.; Radionenko, M.; Lu, F.; Fry, J. E. 2003. *Agrobacterium-mediated largescale transformation of wheat (Triticum aestivum L.)*. Plant Cell. Rep. 21:1010–1019
- Huang X, Wei Z. 2005. *Successful Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Maize Elite Inbred lines*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 187-200.
- Hussey MA, Hatch SL, Bashaw EC 1993. *Evolución de las especies y transferencia de genes en el complejo asexual Cenchrus Pennisetum*. En: Clavero T editor. Producción e investigación en pastos tropicales. Univ. Venezuela;133-147
- Hwang, O.-J., Cho, M.-A., Han, Y.-J., Kim, Y.-M., Lim, S.-H., Kim, D.-S., et al. 2014. *Agrobacterium-mediated genetic transformation of Miscanthus sinensis*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 117, 51–63.
- Ibañez MA, Di Renzo MA, Samame SS, Bonamico NC, Poverene MM, 2001. *Genotype–environment interaction of lovegrass forage yield in the semi-arid region of Argentina*. j Agric Sci 137: 329–336.
- INDEC. 2002. *Encuesta Nacional Agropecuaria 2001*. Ministerio de Economía, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 15 pag.
- Inokuma, C.; Sugiura, K.; Imaizumi, N.; Cho, C. 1998. *Transgenic Japanese lawngrass (Zoysia japonica Steud.) plants regenerated from protoplasts*. Plant Cell Rep. 17:334–338;
- Ishida, Y.; Saito, H.; Ohta, S.; Hiei, Y.; Komari, T.; Kumashiro, T. 1996. *High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnol. 14:745–750

- Ishida, Y., Hiei, Y., and Komari, T. 2007. *Agrobacterium-mediated transformation of maize*. Nat. Protoc. 2, 1614–1621. doi: 10.1038/nprot.2007.241
- Ishida, Y., Tsunashima, M., Hiei, Y., and Komari, T. 2014. *Wheat (Triticum aestivum L.) transformation using immature embryos*, in *Agrobacterium Protocols: Vol. 1, Methods in Molecular Biology*, Vol. 1223, ed. K. Wang. (New York: Springer Science+Business Media), 189–198. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_15
- Jackson J. & Dale P. 1989. *Somaclonal variation in Lolium multiflorum L. and L. temulentum L.* Plant Cell Rep., 8: 161-164.
- Jefferson RA 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. Plant Molecular Biology Report, v5, p.387-405.
- Jeffreys, A., V. Wilson y S. Thein. 1985. *Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA*. Nature, 314:67-73.
- Jones, B. Ponti, J. Tavassoli, A. y Dixon, P. 1978. *Relationships of the Ethiopian cereal Tef (Eragrostis tef (Zucc.) Trottei): evidence from morphology and chromosome number*. Ann. Bot. 42:1369-1373.
- Jung H. & Allen M. 1995. *Characteristics of plant cell wall affecting intake and digestibility of forage by ruminants*. J. Anim. Sci. 2773-2774.
- Kaeppler S., Kaeppler H. & Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol. Biol., 43: 179-188.
- Khanna, H. K.; Daggard, G. E 2003. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium*. Plant Cell Rep. 21:429–436;
- Kalo P., Endre G., Zimnayl L., Csanádi G. & Kiss G. 2000. *Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (Medicago sativa)*. Theor. Appl. Genet., 100: 641-657.
- Keeler K 2004. *Impact of intraespecific polyploidy in Andropogon gerardii (Poaceae) Populations*. Am Midl Nat 152:63-74.

Kim K., Sung B., Rim Y., Choi G., Lim Y., Jang Y., Seo S., Yoon S., Park G. & Jo J. 2001. *Transformation of alfalfa by BcHSP17.6 gene using Agrobacterium tumefaciens*. J. Kor. Soc. Grassl. Sci., 21: 151-156.

Kim Y, Sharmin S A, Alam I, Kim K, Kwon S, Sohn J, Kim S, Liu G, Lee B. 2013. *Agrobacterium-mediated transformation of reed (Phragmites communis Trinicus) using mature seed-derived calli*. GCB Bioenergy 5: 73–80.

Kondo Y. et al. 1973. *Studies on a new antibiotic SF 1293. 1. Isolation and physicochemical and biological characterization of SF1293 substance*. Science Rep Meiji Seika 13:34-41

Koltunow A. 1993. *Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules*. Plant. Cell. 5: 1425-1437.

Koltunow A R. Bicknell and A. Chaudhury. 1995. *Apomixis: Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization*. Pant Physiol. 108: 1345-1352.

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.

Kondo T, Hasegawa H, Suzuki M 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Plant Cell Rep. 19:989-993.

Konieczny A. y F. Ausubel. 1993. *A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers*. Plant J., 4:403-10.

Kuai, B.; Dalton, S. J.; Bettany, A. J. E.; Morris, P. 1999. *Regeneration of fertile transgenic tall fescue plants with a stable highly expressed foreign gene*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 58:149–154

Kuai, B.; Morris, P. 1996. *Screening for stable transformants and stability of betaglucuronidase gene expression in suspension cultured cells of tall fescue (Festuca arundinacea)*. Plant Cell Rep. 15:804– 808

Kumar V, Campbell L M, Rathore K S. 2011. *Rapid recovery- and characterization of transformants following Agrobacterium-mediated T-DNA transfer to Sorghum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 104: 137-146.

- Laborde H, 1991. *Calidad y valor nutritivo. en: el pasto llorón, su biología y manejo.* ed. Fernández O, Brevedan R, Gargano A. cerzos y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina, p 325-347.
- Lacuesta M, et al., 1992. *Effect of phosphinotricin (glufosinate) on photosynthesis and chlorophyll fluorescence emission by barley leaves illuminated under photorespiration and non-photorespiratory conditions* J Exp Bot 43:246-251
- Landegren, U., M. Nilsson y P. Kwok. 1998. *Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis.* Genome Res., 8:769-76.
- Lapierre C. 1993. *Application of new methods for the investigation of lignin structure. En: Forage Cell Wall Structure and Digestibility,* (eds. Jung H., Buxton D. Hatfield D. Ralph J.). ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA p. 133-166.
- Larkin P. & Scowcroft W. 1981. *Somaclonal variation -a novel source of variability from cell cultures for plant improvement.* Theor. Appl. Genet., 60: 197-214.
- Lascano C E. 2002. *Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal.* Arch. Latino am. Prod. Anim. 10(2): 126-132.
- Lee, D.; Meyer, K.; Chapple, C.; Douglas, C. J 1997. *Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition.* Plant Cell 9:1985–1998
- Lee, L. ;1996 *Turfgrass biotechnology.* Plant Sci. 115:1–8.
- Lee, L.; Laramore, C. L.; Day, P. R.; Tumer, N. E. 1996. *Transformation and regeneration of creeping bentgrass (Agrostis palustris Huds.) protoplasts.* Crop Sci. 36:401– 406
- Lee, K.-W., Choi, G. J., Kim, K.-Y., Yoon, S. H., Ji, H. C., Park, H. S., et al. 2010. *Genotypic variation of Agrobacterium-mediated transformation of Italian ryegrass.* Electron. J. Biotechnol.13, 8–9.
- Le VQ, Belles-Isles J, Dusabenyagasani M, Tremblay FM 2001 *An improved procedure for production of white spruce (Picea glauca) transgenic plants using Agrobacterium tumefaciens.* J. Exp. Bot.52:2089ñ2095
- Leigh, J. H. 1960. *Some aspects of the anatomy, ecology and physiology of Eragrostis.* Ph. D. Thesis, Witwatersrand Univ. Johannesburg (Sudáfrica). 369 pp.

- Leigh, J. H. 1961. *Leaf anatomy in certain strains of Eragrostis (Beauv.)*. J. S. Afr. Bot. 27:141-146.
- Li, Q.; Robson, P. R. H.; Bettany, A. J. E.; Donnison, I. S.; Thomas, H.; Scott, I. M 2004. *Modification of senescence in ryegrass transformed with IPT under the control of a monocot senescence-enhanced promoter*. Plant Cell Rep. 22:816–821
- Li, L.; Fei, S.; Qu, R. 2005 *Agrobacterium-mediated transformation of common bermudagrass (Cynodon dactylon)*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 83:223–229
- Li, L.; Qu, R. 2004. *Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass [Cynodon dactylon (L.) Pers.]*. Plant Cell Rep. 22:403–407
- Li, R., and Qu, R. 2011. *High throughput Agrobacterium-mediated switchgrass transformation*. Biomass Bioenergy 35, 1046–1054.
- Litt M y Luty JAA 1989. *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. Am J Hum Genet 44:398-401.
- Llop, P. 2003. *Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en Agrobacterium tumefaciens*. Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Universidad de Valencia. Servei de Publicacions. Valencia, España. 203 p
- Lopez SJ, Kumar RR, Pius PK, Muraleedharan N 2004 *Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation in tea (Camellia sinensis [L.]O. Kuntze)*. Plant Mol. Biol. Rep.22:201a-201j
- Lopez SJ, Kumar RR, Pius PK, Muraleedharan N 2004. *Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation in tea (Camellia sinensis [L.]O. Kuntze)*. Plant Mol. Biol. Rep.22:201a-201j
- Luo, H.; Hu, Q.; Nelson, K.; Longo, C.; Kausch, A. P.; Chandlee, J. M.; Wipff, J. K.; Fricker, C. R. 2004. *Agrobacterium tumefaciens-mediated creeping bentgrass (Agrostis stolonifera L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration*. Plant Cell Rep. 22:645– 652
- Martinez et al., 2010 *Análisis de las correlaciones en poblaciones cubanas de maiz*. Cultivos Tropicales Vol 31 2:82-91
- Martínez, E.J., Urbani, M.H., Quarín, C.L. and Ortiz, J.P.A. 2001. *Inheritance of apospory in bahiagrass, Paspalum notatum*. Hereditas 135:19-25.

- Martínez, M; Cabrera, J; Herrera, L. 2004. *Las plantas transgénicas: una visión integral*. E-Gnosis. Vol. 2. Universidad de Guadalajara, México.
- Matthews, P.; Wang, M.-B.; Waterhouse, P. M.; Thornton, S.; Fieg, S. J.; Gubler, F.; Jacobsen, J. V. 2001 *Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard Agrobacterium transformation vector*. Mol. Breed.7:195–202
- Mayavan, S., Subramanyam, K., Arun, M., Rajesh, M., Kapil Dev, G., Sivanandhan, G., et al. 2013. *Agrobacterium tumefaciens-mediated in planta seed transformation strategy in Sugarcane*. Plant Cell Rep. 32, 1557–1574.
- McClintock, B. 1984. *The significance of responses of the genome to challenge* Science 26:792-801.
- McCouch, S., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. Cho, N. Huang, T. Ishii y M. Blair. 1997. *Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding*. Plant Mol. Biol., 35:89-99.
- Mecchia M, Ochogavía A, Selva JP, Laspina 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.
- Meier M, Zappacosta D, Selva JP, Pessino S, Echenique V. 2011. *Different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, Eragrostis curvula (Schrad.) Nees*. Australian Journal of Botany, 59: 253-261.
- Meier M., Rodrigo J.M., Zappacosta D., Echenique V. 2012 *Efecto mentor en pasto llorón, Eragrostis curvula*. XV Congreso Latinoamericano de Genética. 28 -31 de octubre de 2012. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Miles, J.W. 2007. *Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses*. Crop Sci. 47(S3):S238-S249
- Miles, J.W., and do Valle, C.B. 1996. *Manipulation of apomixis in Brachiaria* Breeding. p. 164-177
- Minson D. 1990. *Forage in ruminant nutrition*. Academic Press, New York.
- Menz MA, Klein RR, Mullet JE et al., 2002. *A high-density genetic map of Sorghum bicolor (L) Moench base don 2926 AFLP, RFLP and SSR markers*. Plant Molecular Biology 48:483-499

- Mets T D, Dixit R, Earle E D 1995 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleraceavar. italica*) and cabbage (*B. oleraceavar. capitata*). *Plant Cell Rep.* 15:287-292
- Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PK 2001 *Transgenic tea (Camellia sinensis [L.] O. Kuntze cv. Kangra Jat) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos*. *Plant Cell Rep.* 20:712-720
- Montani T, Fernandez A, 1991. *Capítulo 6 Crecimiento y desarrollo. En: El pasto llorón, su Biología y Manejo*. Ed. Fernández O, Brevedan R, Gargano A. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Bahía Blanca, Argentina
- Monties B. 1985. *Recent advances on lignin in homogeneity. En: The Biochemistry of Plant Phenolics. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe.* (eds. Van Sumere C., Lea P.). Clarendon Press, Oxford. England. 25: 161-181.
- Morillo, S. 2011. *Evaluación del control de Agrobacterium tumefaciens mediante la aplicación de agentes antibióticos en rosas. Informe del proyecto de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agropecuario*. Sangolquí, Ecuador. 85 p
- Murakani T, et al., 1986. *The bialaphos biosynthetic genes of Streptomyces hugroscopicus: Molecular cloning and characterization of the gene cluster*. *Mol Gen Genet* 205:42-50
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. *A revise médium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture*. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Nadolska-Orczyk A, Przetakiewicz A, Kopera K, Binka A, Orczyk W. 2005. *Efficient Method of Agrobacterium-mediated Transformation for Triticale (x Triticosecale Wittmack)*. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 2-10.
- Ncanana, S.; Brandt, W.; Lindsey, G.; Farrant, J. 2005. *Development of plant regeneration and transformation protocols for the desiccationsensitive weeping lovegrass Eragrostis curvula*. *Plant Cell Rep.* 24:335–340
- Negrotto, D.; Jolley, M.; Beer, S.; Wenck, A. R.; Hansen, G. 2000 *The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (Zea mays L.) via Agrobacterium transformation*. *Plant Cell Rep.* 19:798–803
- Neguyen, Thu, Claeys, Angenon. 2007. *Agrobacterium-mediated transformation of Sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91:155-164.

- Nijs A. and van Dijk G. 1993. *Apomixis*. In: Plant Breeding Principales and Prospects. Hayward M. D. Bosemark N. O. y Romagosa I. (Eds.) Chapman & Hall: London.
- Nogler G. 1984. *Gametophytics apomixis*. In Embryology of Angiosperms (Johri, B. M. ed.) Berlin, Germany: Springer, pp: 475-518.
- Nogler G. A. 1994 *Genetics of gametophytic apomixes: a historical sketch*. Pol Bot Stud; (8):5-11.
- Ochogavía, A., G. Cervigni, J. Selva, V. Echenique y S. Pessino. 2009. *Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversions in Eragrostis curvula*. Plant Mol. Biol., en prensa
- Olmedo-Monfil V, Duran-Figueroa N, Arteaga-Vazquez M, Demesa-Arevalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP 2010. *Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis*. Nature 464:628-632.
- Oram, R. N. 1982. *Register of Australian herbage plant cultivars*. 19. *Eragrostis*. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 48:186-188.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Bhat V, Hayward MD y Quarin CL 2001. *A genetic linkage map of diploid Paspalum notatum*. Crop Science 41:823-830.
- Ortiz, J. and Pessino, S. 2002. *Apomixis and its potential role in agriculture*. AgBiotechNet Vol. 4 February, ABN 081.
- Ortiz, J.; Pessino S. y Quarin C. 2004. *Manipulación de la apomixis y su aplicación en la agricultura*. En *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Echenique, V.; V. Rubistein, C. y Mroginsky, L. Editores. Ediciones INTA. Pp. 283-292.
- Ortiz, Martinez, Stein, Urbani, Siena, Pessino, Quarin. 2005. *Caracterización genética y molecular de la apomixis en gramíneas forrajeras*. BAIRES BIOTEC Buenos Aires Argentina 47pp.
- Pandey A K, Bhat B V, Balakrishna D, Seetharama N. 2010. *Genetic Transformation of Sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench.)*. International Journal of Biotechnology and Biochemistry 6: 45–53.
- Paran, I. y R. Michelmore. 1993. *Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce*. Theor. Appl. Genet., 85:985-93.
- Patel, M., Dewey, R., and Qu, R. 2013. *Enhancing Agrobacterium tumefaciens mediated transformation efficiency of perennial ryegrass and rice using heat and high maltose treatments during bacterial infection*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 114, 19–29.
- Peakall and Smouse. 2006. *GENALEX 6 genetic analysis in Excel population genetic software for teaching and Research*. Molecular Ecology y Notes 6, 288-295.

- Pérez-Vicente R., Wen X., Wang Z., 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.
- Petrovska, N.; Wu, X.; Donato, R.; Wang, Z.-Y.; Ong, E.-K.; Jones, E.; Forster, J.; 2004 *Emmerling, M.; Sidoli, A.; O'Hehir, R.; Spangenberg, G. Transgenic ryegrasses (Lolium spp.) with down-regulation of main pollen allergens.* *Mol. Breed.* 14:489–501
- Pessino SC, Ortiz JP, Leblanc O, do Valle CB y Hayward MD 1997 *Identification of a maize linkage group related to apomixis in Brachiaria.* *Theoretical and Applied Genetics* 94: 439-444.
- Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, do Valle CB y MD Hayward 1998. *A genetic map of the apospory-region in Brachiaria hybrids: Identification of two markers closely associated with the trait.* *Hereditas* 128:153-158.
- Pessino S., Ortiz J., Hayward M. & Quarín C. 1999. *The molecular genetics of gametophytic apomixis.* *Hereditas*, 130: 1-11.
- Pienaar, R. de V. 1955. *The chromosome numbers of some indigenous South African and introduced gramineae.* En: *The Grasses and Pastures of South African.* D. Meredith (Ed.) Central News Agency (Sudáfrica):551-570.
- Polci P. 2000. *Cultivo de tejidos para la obtención de variantes somaclonales de pasto llorón, Eragrostis curvula (Schrad.) Nees.* Tesis de Doctorado. UNS.
- Popelka J C, Altpeter F. 2003. *Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of rye (Secale cereale L.).* *Molecular Breeding* 11: 203-211.
- Poppi, D.P., Minson, D.J. y Thernouth, J.H. 1980. *Studies of cattle and sheep eating leaf and stem fractions of grasses. I. The voluntary intake, digestibility and retention time in the reticulo-rumen.* *Aust. J. agric. Res.* 32:99-108.
- 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. p 94.

- Posselt UK, Barre P, Brazauskas G y Turner LB 2006. *Comparative analysis of genetic similarity between perennial ryegrass genotypes investigated with AFLPs, ISSRs, RAPDs and SSRs*. Czech J. Genet. Plant Breed., 42 (3): 87-94
- Potrykus, I.; Saul, M. W.; Petruska, J.; Paszkowski, J.; Shillito, R. D. ; 1985. *Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot*. Mol. Gen. Genet. 199:183–188
- Poverene M., Curvetto N. y Rodriguez, R. 1985. *Estudios citogenéticos en pasto llorón, Eragrostis curvula (Schrud.) Nees. I. Recuentos cromosómicos*. Rev. Univ. Nac. Río Cuarto 5:67-72.
- Poverene M, 1988. *Contribución citogenética y quimiostática a la taxonomía del pasto llorón, Eragrostis curvula (Scharad.) Nees s. lat.* Tesis de Doctorado de Biología. Universidad Nacional del Sur 218p.
- Poverene M., Curvetto N. 1991. *Citogenética. El pasto llorón su biología y manejo*. Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) Departamento de Agronomía UNS Bahía Blanca (Bs. As.) Argentina.3:19-38.
- Poverene M. y Voigt, P, 1995. *Identificación de híbridos apomícticos o sexuales de Eragrostis curvula (Schrud.) Nees mediante análisis isoenzimático*. Mendeliana. Vol 11 (1):29-36.
- Poverene M. y Voigt,PW 1997. *Isozyme variation and germoplasm relationships in the Eragrostis curvula complex*. Biotechnical Systematics and Ecology, Vol 25:N°1 p:21-32.
- Poverene M M, Di Renzo M A, Tiranti N I. 1987. *Poliembrionía en pasto llorón, Eragrostis curvula (Schrud.) Nees s. lat.* XXI Jornadas Argentinas de Botánica.
- Puliga S, Vazzana c, Davies W 1996. *Control of crops leaf growth by chemical and hydraulic influences*. J Exp Bot 297:529-537.
- Pupilli F, Busti A, Quarín CL y Arcioni S 2001. *The chromosome segment related to apomixis in Paspalum simplex is homologous to the telomeric región of the long arm of rice chromosome 12*. Molecular Breeding 8:53-61.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL y Arcioni S 2004. *Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in Paspalum sp.* Molecular Genetics and Genomics 270:539-548.
- Quarín CL, Hanna WW y Fernández A 1982. *Genetic studies in diploid and tetraploid Paspalum species. Embryo sac development, chromosome behavior, and fertility in P. cromoerhizon, P. laxum, and P. proliferum*. The Journal of Heredity 3: 254-256.

- Quarín, C., M. Pozzobon y J. Valls. 1996. *Cytology and reproductive of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: Paspalum compressifolium*. Euphytica, 90:345-9
- Quero Carrillo A. R. Quiroz J. F. E. Morales Nieto C.R. Miranda Jimenez L. 2010. Rev. Mex. Cienc Pecu; 1(1): 25-42.
- Ramadevi, R., Rao, K. V., and Reddy, V. D. 2014. *Agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation and production of stable transgenic pearl millet (Pennisetum glaucum(L.) R. Br.)*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 50, 1–9.
- Ramakrishnan A, Meyer SE, Waters J, Stevens MR, Coleman CE and Fairbanks DJ 2004. *Correlation between molecular markers and adaptively significant genetic variation in Bromus tectorum (Poaceae), an inbreeding annual grass*. American Journal of Botany 91(6):797-803.
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K 1996. *Transgenic plant production mediated by Agrobacterium in indica rice*. Plant Cell Rep. 15:727-730.
- Reeves J. 1985a. *Lignin composition of chemically treated feeds as determined by nitrobenzene oxidation and its relationship to digestibility*. J.Dairy Sci. 68: 1976-1983.
- Reeves J. 1985b. *Lignin composition and in vitro digestibility of feeds*. J. Anim. Sci. 60: 316-322.
- Renganayaki K, Read JC, Fritz AK 2001. *Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (Poa arachnifera Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers*. Theor Appl Genet 102:1037-1045.
- Reyno R, Narancio R, Speranza P, et al., 2012. *Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (Paspalum notatum Flugge) native to Uruguay*. Genet Resour Crop Evol 59:1823-1832
- Richards, A. 1986. *Plants Breeding Systems*. George, Allen and Uniwin. London. Chapman & Hall pp403-456.
- Richards, H. A.; Rudas, V. A.; Sun, H.; McDaniel, J. K.; Tomaszewski, Z.; Conger, B. V. 2001. *Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation*. Plant Cell Rep. 20:48–54
- Ríos R., Gómez C., Ferri A., Ciancio J., Ardila F. & Franzone P. 2001. *Transformación genética de alfalfa*. Abstracts of the VI Latin-American Meeting on Plant Biotechnology. Brazil. REDBIO. p.52.

- Rodrigo J M 2014. *Estrés genómico y expresión de la apomixis en pasto llorón (Eragrostis curvula (Schrad.) Nees.)*. Tesis de Doctorado en Biología Universidad Nacional del Sur. Argentina.
- Roodt-Wilding, R. y J. Spies. 2006. *Phylogenetic relationships in southern African chloroid grasses (Poaceae) based on nuclear and chloroplast sequence data*. Syst. Biod., 4:401-15.
- Rosellini D. & Veronesi F. 2002. *Potential of biotechnology for alfalfa*. AgBiotechNet., 4: 1-3.
- Roylance J., Hill N. & Parrot W. 1994. *Detection of somaclonal variation in tissue culture regenerants of tall fescue*. Crop Sci., 34: 1369-1372.
- Ruiz MA, Golberg AD, Martinez O 2008. *Water stress and forage production in Tetrachne dregei Nees, Panicum coloratum L. and Eragrostis curvula (Schrad) Nees*. Phytion 77:7-20
- Rúgolo de Agrasar Z. E. Steibel P. E. Troiani H. O. 2005. *Manual ilustrado de las gramíneas de la provincia de La Pampa*. Universidad Nacional de La Pampa, Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
- Salehi, H., Seddighi, Z., Kravchenko, A. N., and Sticklen, M. B. 2005. *Expression of the cry1Ac in 'Arizona Common' common bermudagrass via Agrobacterium mediated transformation and control of black cutworm*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 130, 619–623.
- Sato, H.; Takamizo, T. 2006 *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of forage-type perennial ryegrass (Lolium perenneL.)*. Grassland Sci. (in press)
- Savidan, Y.H. 2000. *Apomixis: Genetics and breeding*. PlantBreed. Rev. 18:10-86.
- Savidan, Y. 1975. *Hérédité del'apomixie. Contribution à l'étude del'hérédité del'apomixie sur Panicum maximum Jacq. (analyse des sacs embryonnaires)*. Cahiers O.R.S.T.O.M., Ser. Biol. 10(2):91-95.
- Savidan, Y.H. 1983. *Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (Panicum maximum Jacq.)*. p. 182-184. In: J.A. Smith and V.W. Hays (ed.) Proc. Intl. Grassl. Congr. 14, Lexington, KY. 15-24 June 1981.
- Savidan YH, Pernés J. 1982. *Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of Panicum maximum Jacq.* Evolution; (36):596-600. Centre National de la Recherche Scientifique, France.
- Sawahel, W. A.; Hassan, A. H. 2002 *Generation of transgenic wheat plants producing high levels of osmoprotectant proline*. Biotech. Lett. 24:7121–7125

Seto H, et al., 1982. *Studies on the biosynthesis of bialaphos and incorporation of ¹³C and ³H labeled into bialaphos* J. Antibiotics 35:1719-1721

Shull, G.H. 1909. *A pure line method of corn breeding*. Amer. Breeders Assoc. Rep. 5:51-59.

Sherwood, R.T., Berg, C.C. and Young, B.A. 1994. *Inheritance of apospory in buffelgrass*. Crop Science 34:1490-1494.

Shopp MC, 1977 *Foliage and root growth of weeping lovegrass*. Ph. D. Thesis Colorado State Univ., Fort Collins, Colorado (EEUU)217pp.

Smith, R. L.; Grando, M. F.; Li, Y. Y.; Seib, J. C.; Shatters, R. G. 2002 *Transformation of bahiagrass (Paspalum notatum Flugge)*. Plant Cell Rep. 20:1017–1021

Somleva, M. N.; Tomaszewski, Z.; Conger, B. V 2002. *Agrobacterium-mediated genetic transformation of switchgrass*. Crop Sci. 42:2080–2087

Spangenberg G, et al., 2010. *V Capitulo 2, Mejoramiento de plantas forrajeras en la era genómica*. Libro Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II.

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*. Berlin: Springer

Spangenberg, G.; Wang, Z.-Y.; Valles, M. P.; Potrykus, I. 1995a *Genetic transformation in Festuca arundinacea Schreb. (tall fescue) and Festuca pratensis Huds. (meadow fescue)*. In: Bajaj, Y. P. S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 34. Berlin: Springer;:183–203.

Spangenberg, G.; Wang, Z.-Y.; Wu, X. L.; Nagel, J.; Iglesias, V. A.; Potrykus, I. 1995b. *Transgenic tall fescue (Festuca arundinacea) and red fescue (F. rubra) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells*. J. Plant Physiol. 145:693–701

Spangenberg, G.; Wang, Z.-Y.; Wu, X. L.; Nagel, J.; Potrykus, I. 1995c *Transgenic perennial ryegrass (Lolium perenne) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells*. Plant Sci. 108:209–217

Spies, J. J. 1982. *Stomatal areas as an anatomical criterion for the determination of chromosome number in the Eragrostis curvula complex*. Bothalia 14:119-122.

Stalker, H. T. y Wright, L. N. 1975. *Reproduction of Eragrostis curvula (Schrad.) Nees*, J. Arizona Acad. Sci. 10:106-110.

- Steinwand, M. A., Young, H. A., Bragg, J. N., Tobias, C. M., and Vogel, J. P. 2013. *Brachypodium sylvaticum*, a model for perennial grasses: transformation and inbred line development. PLoS ONE 8:e75180.
- Strauch E, Wohlleben W y Puhler A 1988. Cloning of the phosphinotricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Gene 63:65-74
- Streetman, L. J.1963. Reproduction of the lovegrass, the genus *Eragrostis*. *E.chloromelas* Steud., *E. curvula* (Schrad.) Nees, *E. lehmanniana* Nees and *E. superba* Peyr. Wrightia 3:41-51.
- Streetman, L. J.1970. Cytogenetics of *Eragrostis*. Proc. First Weeping Lovegrass Symp. R. L. Dalrymple (Ed.). The Noble Foundation. Ardmore, Oklahoma, (EE. UU.): 10-14.
- Stritzler NP, Pagella JH, Varinia VJ , Ferri CM, 1996. Semi-arid warm-season grass yield and nutritive value in Argentina. J. Range Management 49:121-125.
- Swenne,A., B.-P. Louant, and M. Dujardin.1981. Induction parla colchicine de formes autotétraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). Agron. Trop. 36:134-141.
- Tachibana J, Watanabe T, Seikisawa Y y Takematsu T 1986b. Accumation of ammonia in plants treated with bialaphos J Pest Sci 11:33-37
- Taliaferro CM, Bashaw EC. 1966; Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare*. Crop Sci (6):473-476.
- Taliaferro CM, Horn, et al., 1975. Performance of thre warm season grasses and a native range mixture as influenced by N and P fertilizer. Agron J 67:289-292
- 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. Appl. Gen., 103: 648-658.
- Takahashi, W.; Fujimori, M.; Miura, Y.; Komatsu, T.; Nishizawa, Y.; Hibi, T.; Takamizo, T. ; 2005 Increased resistance to crown rust disease in transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*Lam.) expressing the rice chitinase gene. Plant Cell Rep. 23:811–818
- Thompson C, et al., 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J 6:2519-2523
- Tingay, S.; McElroy, D.; Kalla, R.; Fieg, S.; Wang, M.; Thornton, S.; Brettell, R 1997. *Agrobacterium*-mediated barley transformation. Plant J.11:1369–1376

- Tomas PA, 2008. *Análisis y caracterización citogenética, morfológica y molecular en líneas experimentales, cultivares e híbridos de Elymus scabrifolius (Doll) JH Hunz.* Tesis Doctoral de Biología. Universidad Nacional del Sur. Argentina.
- Toyama, K.; Bae, C.-H.; Kang, J.-G.; Lim, Y.-P.; Adachi, T.; Rui, K.-Z.; Song, P.-S.; Lee, H.-Y. 2003. *Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by Agrobacterium-mediated transformation.* Mol. Cells 16:19– 27
- Trifonova, A.; Madsen, S.; Olesen, A. 2001. *Agrobacterium-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of in vitro culture conditions.* Plant Sci. 161:871–880;
- Tzfira T and Citovsky V 2006. *Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology* Science Direct 17:147-154.
- Upadhyaya, Surin, Ramm, Gaudron, Schunman, Taylor, Waterhouse, Wang. 2000. *Agrobacterium – mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers.* Aust. J. Plant Physiol. 27:201-210.
- Valle,C.B. do, and Savidan,Y.H. 1996. *Cytogenetics and reproductive biology of Brachiaria* Genetics. p. 147-163.
- Valle,C.B., Bitencourt, G.A., Arce, A.Q., Chiari, L.,Jank, L.,Resende, R.M .S. and Calixto,S. 2008. *Preliminary evaluation of Brachiaria humidicola hybrids.* [Abstract]. p. 418. In:(Organizing Committee ofIGC/IRCCongress,eds.) Multifuntional grasslands in a changing world, Vol II. [Proceedingsofthe21stInternational Grassland Congress. Hohhot, Inner Mongolia, China.29 Jun. – 05 Jul.,2008. (Guandong People's Publishing House)]
- Vallés M., Wang Z., Montavon P., Potrykus I. & Spangenberg G. 1993. Analysis of genetic stability of plants regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). Plant Cell Rep., 12: 101-106.
- van der Maas, H. M.; de Jong, E. R.; Rueb, S.; Hensgens, L. A. M.; Krens, F. A. ; 1994. Stable transformation and long-term expression of the gusA reporter gene in callus lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Plant Mol. Biol. 24:401–405
- van der Meer, I. M.; Ebskamp, M. J. M.; Visser, R. G. F.; Weisbeek, P. J.;Smeekens, S. C. M. ; 1994. Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. Plant Cell 6:561–570

- Varshney, R., A. Graner y M. Sorrells. 2005. *Genic microsatellite markers in plants: features and applications*. Trends Biotechnol., 23:48-55.
- Vignols F., Rigau J., Torres M., Capellades M. & Puigdomenech, P. 1995. *The brown midrib 3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase*, Plant Cell, 7: 407-416.
- Vogel, K.P. y Sleper D.A. 1994. *Alterations of plants via genetics and plant breeding*. In: Fahey George Jr. (editor). *Forage quality, evaluation and utilization. National Conference on Forage quality, evaluation and utilization*, U. of Nebraska, Lincoln, 1994, pp. 891-921
- Voigt P. W. 1971. *Discovery of sexuality in Eragrostis curvula (Schrad) Nees*. Crop Sci. 11: 424-425.
- Voigt P. W. and Bashaw E 1972. *Apomixis y sexuality in Eragrostis curvula*. Crop Sci. 12:843-847.
- Voigt, P. 1976. *Registration of OTA-S weeping lovegrass germplasm (Reg. No. GP8)*. Crop Sci., 12:843-7.
- Voigt P. W. and Bashaw E 1976. *Facultative apomixis in Eragrostis curvula*. Crop Science. Vol. 16 803-806.
- Voigt P. W., Burson, B. L. Engelke M. C. 1977. *Breeding apomictic grasses*. Proceed. 34 th. Southern Pasture & Forage Crop Improvement Conf.: 104-112.
- Voigt P. W., Burson B. L. 1983. *Breeding of apomictic Eragrostis curvula*. Proceed. 14 th. Internat. Grassl. Congr.: 160-163. Eds. J. A. Smith and V. W. Hays.
- Voigt P. W.. 1991. *Eragrostis curvula: Sus características y potencial para el mejoramiento a través de la hibridación*. En: El Pasto Llorón: Su Biología y Manejo. Eds. O. Fernández, R. Brevedan Y A. Gargano, CERZOS y UNS, Bahía Blanca, Argentina, pp. 39-53.
- Voigt, P., N. Rethman y M. Poverene. 2004. *Lovegrasses*. En: Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph no. 45, American Society of Agronomy, USA.
- Vorster, T. B. y Liebenberg, H. 1977. *Cytogenetic studies in the Eragrostis curvula complex*. Bothalia 12:215-221.
- Vos PR, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters, A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M 1995 *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.
- Wang Z, Hopkins A, Mian R, 2001. *Forage and turf grass biotechnology*. Crit Rev Plant Sci 20: 573-619.

- 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, M.-Z., Pan, Y.-L., Li, C., Liu, C., Zhao, Q., Ao, G.-M., et al. 2011. *Culturing of immature inflorescences and Agrobacterium-mediated transformation of foxtail millet (Setaria italica)*. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 16466–16479.
- Wang, G. R.; Binding, H.; Posselt, U. K. 1997. *Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of Lolium perenne L. and Lolium multiflorum Lam.* *J. Plant Physiol.* 151:83–90
- Wang, Z.-Y.; Bell, J.; Ge, Y. X.; Lehmann, D. 2003a. *Inheritance of transgenes in transgenic tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.)*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39:277–282
- Wang, Z.-Y.; Bell, J.; Hopkins, A. 2003b *Establishment of a plant regeneration system for wheatgrasses (Thinopyrum Agropyron and Pascopyrum)*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 73:265–273
- Wang, Z.-Y.; Ge, Y. 2005a. *Agrobacterium-mediated high efficiency transformation of tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.)*. *J. Plant Physiol.* 162:103–113
- Wang, Z.-Y.; Ge, Y. 2005b. *Rapid and efficient production of transgenic bermudagrass and creeping bentgrass bypassing the callus formation phase*. *Funct. Plant Biol.* 32:769–776
- Wang, Z.-Y.; Ge, Y.; Mian, R.; Baker, J. 2005. *Development of highly tissue culture responsive lines of Lolium temulentum by anther culture*. *Plant Sci.* 168:203–211
- Wang, Z.-Y.; Ge, Y. X.; Scott, M.; Spangenberg, G. 2004b. *Viability and longevity of pollen from transgenic and non-transgenic tall fescue (Festuca arundinacea)(Poaceae) plants*. *Am. J. Bot.* 91:523–530
- Wang, Z.-Y.; Hopkins, A.; Lawrence, R.; Bell, J.; Scott, M. 2004c. *Field evaluation and risk assessment of transgenic tall fescue (Festuca arundinacea) plants*. In: Hopkins, A.; Wang, Z. Y.; Mian, R.; Sledge, M.; Barker, R. E., eds. *Molecular breeding of forage and turf*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 367–379.
- Wang, Z.-Y.; Hopkins, A.; Mian, R. ; 2001a *Forage and turf grass biotechnology*. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20:573–619.
- Wang, Z.-Y.; Lawrence, R.; Hopkins, A.; Bell, J.; Scott, M. 2004d *Pollen-mediated transgene flow in the wind-pollinated grass species tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.)*. *Mol. Breed.* 14:47–60

- Wang, Z.-Y.; Scott, M.; Bell, J.; Hopkins, A.; Lehmann, D. 2003c *Field performance of transgenic tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) plants and their progenies*. Theor. Appl. Genet. 107:406–412
- Wang, Z.-Y.; Takamizo, T.; Iglesias, V. A.; Osusky, M.; Nagel, J.; Potrykus, I.; Spangenberg, G. 1992. *Transgenic plants of tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts*. Bio/Technology 10: 691–696
- Wang, Z.-Y.; Ye, X. D.; Nagel, J.; Potrykus, I.; Spangenberg, G. 2001b *Expression of a sulphur-rich sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.) plants*. Plant Cell Rep. 20:213–219
- Weir, B.; Gu, X.; Wang, M.-B.; Upadhyaya, N.; Elliott, A. R.; Brettell, R. I. ; 2001 *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker*. Aust. J. Plant Physiol. 28:807–818
- Wild A y Manderscheid R, 1987. *The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants*. Naturforsch 39c:500-504
- Wilkins PW, Humphreys MO, 2003. *Progress in breeding perennial forage grasses for temperate agriculture*. J Agric Sci 140: 129-150.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak DL, Rafalski JA y Tingey SV 1990 *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers*. Nucleic Acids Research 18:6531-6536.
- Wilson J. 1994. *Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants*. J. Agric. Sci., 122: 173-182.
- Wilson J. & Minson D. 1980. *Comparative digestibility of tropical and temperate forage - A contrast between grasses and legumes*. J. Aust. Inst. Agric. Sci., 247-249.
- Wohlleben W, et al., 1988. *Nucleotide sequence of the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene from Streptomyces viridochromogenes Tu 944 and its expression in Nicotiana tabacum*. Gene 70:25-37
- Wu, E., Lenderts, B., Glassman, K., Berezowska-Kaniewska, M., Christensen, H., Asmus, T., et al. 2014. *Optimized Agrobacterium-mediated Sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic Sorghum plants*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 50, 9–18. doi: 10.1007/s11627-013-9583-z

- Wu, Y. Y.; Chen, Q. J.; Chen, M.; Chen, J.; Wang, X. C. ; 2005. *Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (Lolium perenne L.) obtained by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the vacuolar antiporter gene*. Plant Sci. 169:65–73
- Wu, H.; McCormac, A. C.; Elliott, M. C.; Chen, D.-F. ; 1998. *Agrobacterium mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (Hordeum vulgare)*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 54:161–171
- Wu, H.; Sparks, C.; Amoah, B.; Jones, H. D.; 2003. *Factors influencing successful Agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat*. Plant Cell Rep. 21:659–668
- Wu H, Doherty A, Jones H D. 2009. *Agrobacterium-Mediated Transformation of Bread and Durum Wheat Using Freshly Isolated Immature Embryos*. Transgenic Wheat, Barley and Oats. Methods in Molecular Biology 478: 93-103.
- Wu Y Y, Chen Q J, Cui X H, Chen H, Chen J, Wang X C. 2007. *Efficient regeneration and Agrobacterium-mediated stable transformation of perennial ryegrass*. Russian Journal of Plant Physiology 54: 524-529.
- Wu YQ, Taliaferro CM, Bai GH, Martin DL, Anderson JA, Anderson MP and Edwards RM 2006. *Genetic analyses on Chinese Cynodon accessions by flow cytometry and AFLP markers*. Plant Genetics Resources Crop Sci. 46:917-926.
- Wu, Doherty, Jones. 2008. *Efficient and rapid Agrobacterium – mediated genetic transformation of durum wheat (Triticum turgidum L. Var. durum) using additional virulence genes*. Transgenic Res 17:425-436.
- Xi Y, Fu C, Ge Y, Nandakumar R, Hisano H, Bouton J, Wang Z Y. 2009. *Agrobacterium-Mediated Transformation of Switchgrass and Inheritance of the Transgenes*. BioEnergy Research 2: 275-283.
- Xiao, L.; Ha, S. B. 1997. *Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment*. Plant Cell Rep. 16:874–878;
- Xu, J. P.; Schubert, J.; Altpeter, F. ; 2001. *Dissection of RNA-mediated ryegrass mosaic virus resistance in fertile transgenic perennial ryegrass (Lolium perenne L.)*. Plant J. 26:265–274
- Ye, X.; Wang, Z.-Y.; Wu, X.; Potrykus, I.; Spangenberg, G. ; 1997. *Transgenic Italian ryegrass (Lolium multiflorum) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells*. Plant Cell Rep. 16:379–384

- 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 Bacillus subtilis sacB gene*. Plant Cell Rep. 20:205–212
- Ye G-N, Stone D, Pang SZ, Creely W, Gonzalez K, Hinchee M 1999. *Arabidopsis ovule is the target for Agrobacterium in planta vacuum infiltration transformation*. Plant J. 19:249-257.
- Yu, T. T., Skinner, D. Z., Liang, G. H., Trick, H. N., Huang, B., and Muthukrishnan, S. 2000 *Agrobacterium-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene*. Hereditas 133, 229–233.
- Yu, T. T.; Skinner, D. Z.; Liang, G. H.; Trick, H. N.; Huang, B.; Muthukrishnan, S . ; 2000. *Agrobacterium-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene*. Hereditas 133:229–233
- Zappacosta D. 2009. *Tesis Doctorado en Agronomía “Contribución al conocimiento de la taxonomía y del modo reproductivo del pasto llorón, Eragrostis curvula (Scrad.) Nees*. Universidad Nacional del Sur.
- Zappacosta D., Meier M., Carrera A., Pacheco G., Cardone S., Selva J. P., Echenique V. 2011. *Molecular markers to study the variability within the Eragrostis curvula complex*. Phyton, 80: 211-220.
- Zhang, G.; Lu, S.; Chen, T. A.; Funk, C. R.; Meyer, W. A. ; 2003. *Transformation of triploid bermudagrass (Cynodon dactylon C. transvaalensis cultivar TifEagle) by means of biolistic bombardment*. Plant Cell Rep. 21:860–864
- Zhao, Z.-Y.; Cai, T.; Tagliani, L.; Miller, M.; Wang, N.; Pang, H.; Rudert, M.; Schroeder, S.; Hondred, D.; Seltzer, J.; Pierce, D. ; 2000. *Agrobacterium mediated sorghum transformation*. Plant Mol. Biol. 44:789–798
- Zhao, Z.-Y.; Gu, W.; Cai, T.; Tagliani, L.; Hondred, D.; Bond, D.; Schroeder, S.; Rudert, M.; Pierce, D. ; 2001 *High throughput genetic transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens in maize*. Mol. Breed. 8:323– 333
- Zhong, H.; Bolyard, M. G.; Srinivasan, C.; Sticklen, M. B. ; 1994 *Transgenic plants of turfgrass (Agrostis palustris Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus*. Plant Cell Rep. 13:1–6
- 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. p. 92.