

# Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras

## Biotechnological manipulation of forage grasses

Gerardo Armando Aguado-Santacruz<sup>a</sup>, Quintín Rascón Cruz<sup>a</sup>, José Luis Pons Hernández<sup>a</sup>,  
Oscar Grageda Cabrera<sup>a</sup>, Edmundo García-Moya<sup>b</sup>

### RESUMEN

Los avances biotecnológicos alcanzados en cultivos agrícolas y plantas modelo están siendo actualmente extendidos a prácticamente todas las gramíneas, sean éstas cereales, zacates forrajeros, pastos de césped, plantas ornamentales o especies con importancia en el sector industrial o farmacéutico. Se vislumbra una revolución sin precedente en las posibilidades para la manipulación de las gramíneas mediante las tecnologías actuales o emergentes, que impactarán todas las áreas y niveles del conocimiento y uso de estas especies. En esta contribución se establece la importancia, biología, perspectivas de estudio y los avances alcanzados en los zacates forrajeros dentro de la biotecnología global de las Poaceae. La posibilidad de analizar y alterar el genoma de las plantas a través del creciente número de técnicas de escrutinio y transferencia de ADN recibe especial atención, en vista de las contribuciones potenciales que pueden tener a la explicación de muchos de los enigmas hasta hoy no esclarecidos en la ecología y fisiología de estas plantas, así como al incremento de la productividad y manipulación de sus características agronómicas. En un último apartado, se describen algunos de los avances biotecnológicos logrados hasta el momento en una de las gramíneas forrajeras más importantes de México, navajita azul (*Bouteloua gracilis*). Se espera que los estudios biotecnológicos mejoren nuestro conocimiento sobre las bases de la variabilidad genética de las poblaciones nativas de navajita azul, y permitan el diseño de estrategias enfocadas a la transferencia de algunos de los genes que confieren a *B. gracilis* su elevada tolerancia al estrés hídrico, a especies pertenecientes al grupo de los cereales.

**PALABRAS CLAVE:** Zacates forrajeros, Pastos de césped, *Bouteloua gracilis*, Transformación genética, Plantas transgénicas, Cultivo de tejidos, Marcadores moleculares.

### ABSTRACT

Biotechnological advances achieved in basic crops and model plants are currently being applied to practically all grasses, being them cereals, forages, turfs, ornamentals or species having industrial or pharmaceutical importance. An unprecedented revolution in possibilities for manipulating graminaceous species through current and coming technologies can be expected which should impact all areas and levels of knowledge and use of these species. In the present study, the importance, biology, perspectives and scientific advances reached in forage grasses within global biotechnology of Poaceae are described. The possibility for analyzing and altering the genome through an ever increasing number of techniques for scrutiny and delivering DNA is emphasized, because of its potential contribution to help explain some of the ecological and physiological enigmas in these plants not yet cleared up, as well as to foster an increase in productivity and an improvement of their agronomic characteristics. Finally, some of the biotechnological advances accomplished in one of the most important forage grasses of Mexico, blue grama (*Bouteloua gracilis*), are described. Biotechnology is expected to improve our knowledge on the blue grama genetic variability base in native populations and to allow for the development of strategies aimed at the transfer into cereals of some of the genes that confer high tolerance to water stress in *B. gracilis*.

**KEY WORDS:** Forage grass, Turf grass, *Bouteloua gracilis*, Genetic transformation, Transgenic plant, Tissue culture, Plant regeneration, Nutritional quality, Molecular markers.

### INTRODUCCIÓN

Desde su origen, el principal uso que se ha dado a la familia de las gramíneas ha sido como fuente

### INTRODUCTION

Since the beginning, the main use of plants of the Gramineae has been as a forage source for animal

---

Recibido el 9 de junio de 2003 y aceptado para su publicación el 7 de noviembre de 2003.

a Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende. AP 112 Celaya, Guanajuato 38010 México. [gaguado@prodigy.net.mx](mailto:gaguado@prodigy.net.mx). Correspondencia al primer autor.

b Programa de Botánica, Colegio de Postgraduados.

de forraje para la alimentación del ganado. Es precisamente su utilización como fuente de energía para el ganado doméstico y fauna silvestre, lo que convierte a las gramíneas forrajeras en el grupo de plantas más importante para el hombre. En la economía de algunos países juega también un papel fundamental; por ejemplo, en EE.UU. el monto de la venta de semillas de pastos para forraje y césped ocupa un segundo lugar, después de la semilla de maíz híbrido<sup>(1)</sup>.

Debido a que muchas de las especies forrajeras más importantes son también las más empleadas para el establecimiento de céspedes y áreas verdes, así como para el control de la erosión (e.g. *Vetiveria zizanioides*, *Pennisetum alopecuroides*), es difícil establecer una separación clara en función de estos usos. Por esta razón, la mayoría de las revisiones bibliográficas desarrolladas sobre este grupo de plantas las refiere globalmente como “gramíneas forrajeras y para césped”.

Las gramíneas forrajeras pueden agruparse como zacates de clima templado y en zacates de clima tropical, aunque algunas gramíneas como *Festuca* y *Phalaris*, pueden desarrollarse en la transición entre las áreas subtropicales y templadas. Los zacates para praderas de clima templado más importantes son *Agropyron* spp (triguillos), *Bromus inermis* (bromo suave), *Dactylis glomerata* (zacate de huerta, zacate ovillo o dactilo), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Lolium multiflorum* (ballico italiano o anual), *Lolium perenne* (ballico inglés o perenne), *Poa pratensis* (zacate azul de Kentucky), *Phalaris arundinacea* (alpiste). Los zacates para praderas tropicales más importantes son *Cynodon dactylon* (zacate Bermuda), *Panicum maximum* (zacate Guinea), *Paspalum notatum* (zacate bahia o remolino), *Pennisetum clandestinum* (zacate kikuyu), *Pennisetum purpureum* (zacate elefante), *Sorghum halepense* (zacate Johnson) y *Sorghum sudanense* (zacate Sudán)<sup>(2)</sup>. En México, otras especies que son igualmente importantes incluyen a: *Hyparrhenia rufa* (jaragua), *Andropogon gayanus* (llanero), *Brachiaria brizantha* (insurgente), *B. decumbens* (chontalpo), *B. mutica* (pará) y *Digitaria decumbens* (pangola)<sup>(3)</sup>.

feeding. It is precisely their use as energy source for domestic and wild animals the reason why they are the most important plants for man. They play an important role in the economy of some countries, for example, in the USA, the total worth of forage and turf grass seed sales is second only to that of hybrid maize<sup>(1)</sup>.

Because most of the more important forage species are also utilized for turfs and for erosion control (e.g. *Vetiveria zizanioides*, *Pennisetum alopecuroides*), it is difficult to establish a clear division in their use. Owing to this, most of the bibliographical revisions carried out on these plants make reference to them globally as “forage and turf grasses”.

Forage grasses are classified as temperate or tropical, although some species, as *Festuca* and *Phalaris* can grow in the transition areas between the subtropics and temperate regions. The grasses of more importance for the temperate areas are *Agropyron* spp (wheat grass), *Bromus inermis* (sweet brome), *Dactylis glomerata* (orchard grass), *Festuca arundinacea* (tall fescue), *Lolium multiflorum* (Italian rye grass), *Lolium perenne* (perennial rye grass), *Poa pratensis* (Kentucky bluegrass), and *Phalaris arundinacea* (birdseed). The most important grasses for tropical pastures are *Cynodon dactylon* (Bermuda grass), *Panicum maximum* (Guinea grass), *Paspalum notatum* (Bahia grass), *Pennisetum clandestinum* (kikuyu grass), *Pennisetum purpureum* (elephant grass), *Sorghum halepense* (Johnson grass) and *Sorghum sudanense* (Sudangrass)<sup>(2)</sup>. Other species of importance in Mexico include *Hyparrhenia rufa* (Jaragua grass), *Andropogon gayanus* (Llanero grass), *Brachiaria brizantha* (Insurgente grass), *Brachiaria decumbens* (Chontalpo grass), *Brachiaria mutica* (Pará grass) and *Digitaria decumbens* (Pangola grass)<sup>(3)</sup>.

Worldwide, the most intensively used grasses in pastures and turfs include fescues (*Festuca* spp), rye grasses (*Lolium* spp), bent grasses (*Agrostis* spp), blue grasses (*Poa* spp), bromes (*Bromus* spp), orchard grasses (*Dactylis* spp), Bermuda grasses (*Cynodon* spp) and some *Panicum* species. Particularly, *Agrostis palustris* is the most commonly used grass to seed golf courses.

A nivel mundial, los zacates más intensivamente usados para el establecimiento de praderas y céspedes incluyen a las festucas (*Festuca* spp.), los ballicos (*Lolium* spp.), las pajillas (*Agrostis* spp.), los pastos azules (*Poa* spp.), los bromos (*Bromus* spp.), los ovillos (*Dactylis* spp.), las bermudas (*Cynodon* spp.) y algunas especies de *Panicum*. En particular, *Agrostis palustris* es la gramínea más empleada para el establecimiento de campos de golf.

Algunos de los zacates forrajeros más importantes en comunidades naturales de pastizales incluyen a: *Bouteloua gracilis* (navajita azul) y *Buchloë dactyloides* (zacate búfalo) en el pastizal corto, y *Andropogon gerardii* (tallo azul gigante) y *Schizachyrium scoparium* (tallo azul pequeño) en el pastizal alto de Norteamérica; *Themeda triandra* (avena roja), *Pennisetum purpureum*, *Impetia cylindrica* (zacate alang-alang) y *Heteropogon contortus* (zacate pili) en África; los zacates Mitchell *Astrebula elymoides*, *A. lappacea* y *A. squarrosa*, *Plectrachne* spp., *Dimeria* spp. y los zacates Spinifex *Triodia pungens* y *T. scariosa* en Australia; *Festuca sulcata*, *Stipa gobica*, *S. pulcherrima* y *Koeleria gracilis* en Rusia; *Danthonia raouli* en Nueva Zelanda; *Nardus stricta*, *Alopecurus pratensis* y *Arrhenatherum elatius* en Inglaterra. Muy extendidos por toda Europa y Asia se encuentran *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *Festuca pratensis* (festuca de prado), *F. rubra* (festuca roja), *F. ovina* (festuca ovina), *F. arundinacea*, *Poa pratensis*, *Holcus lanatus* (Velvet grass), *Molinia caerulea* y algunas especies de bromos como *Bromus tectorum*. Particularmente a *L. perenne* se le considera como la especie forrajera más importante de Nueva Zelanda, Australia y Europa y a *Festuca arundinacea* como la gramínea predominante en EE.UU. En Sudamérica, *Paspalum dilatatum* y *P. alnum* (Dallisgrass) constituyen importantes especies forrajeras<sup>(4,5)</sup>.

La exitosa distribución y desarrollo de los zacates alrededor del mundo se debe, en gran parte, a la morfología de sus semillas que favorece su dispersión, a su alta capacidad reproductiva y a su elevada tolerancia a diferentes tipos de restricciones ambientales; por ejemplo, muchas de las plantas

Some of the most important forage grasses in native communities include *Bouteloua gracilis* (blue grama) and *Buchloë dactyloides* (buffalo grass) in low grasslands and *Andropogon gerardii* (giant bluestem) and *Schizachyrium scoparium* (creeping bluestem) in the tall grasslands of North America; *Themeda triandra* (red oats), *Pennisetum purpureum*, *Impetia cylindrica* (alang-alang grass) and *Heteropogon contortus* (pili grass) in Africa; *Astrebula elymoides* (Mitchell grass), *Astrebula lappacea*, *Astrebula squarrosa*, *Plectrachne* spp, *Dimeria* spp and *Triodia pungens* and *Triodia scariosa* (Spinifex grass) in Australia; *Festuca sulcata*, *Stipa gobica*, *Stipa pulcherrima* and *Koeleria gracilis* in Russia; *Danthonia raouli* in New Zealand; *Nardus stricta*, *Alopecurus pratensis* and *Arrhenatherum elatius* in the UK. Commonly found throughout Europe and Asia are *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Festuca pratensis* (meadow fescue), *Festuca rubra* (red fescue), *Festuca ovina* (sheep fescue), *Festuca arundinacea*, *Poa pratensis*, *Holcus lanatus* (velvet grass), *Molinia caerulea* and some bromes as *Bromus tectorum*. *Lolium perenne* could be considered as the most important forage species in New Zealand, Australia and Europe, and *Festuca arundinacea* in the USA. In South America, *Paspalum dilatatum* and *Paspalum alnum* (Dallisgrass) are important forage species<sup>(4,5)</sup>.

The successful global distribution and growth of grasses is owing to a great measure to seed morphology which favors dissemination, to a high reproduction rate and to high tolerance to diverse environmental constraints. Many of the more drought tolerant plants belong to the Poaceae family.

Nearly all temperate grasses have a basic chromosome number of 7 (also in the most common cereals, wheat, rye, oats and barley), while in tropical grasses the haploid genome is of 8, 9 or 10 chromosomes. Polyploidism is common in both types of grasses. Nearly 70 % of Poaceae species are polyploid, a very high value indeed when compared to all other families in which only 30 to 35 % of plants show this characteristic. Although some barriers exist which prevent intergeneric or even interspecific crossings, some *Agropyron* species have been crossed successfully with wheat, barley and rye<sup>(2)</sup>.

más tolerantes a la sequía se encuentran en esta familia Poaceae.

Casi todos los zacates de clima templado tienen un número cromosómico básico de siete (común también en cereales como trigo, cebada, avena y centeno), mientras que en zacates tropicales el genoma haploide es de 8, 9 ó 10 cromosomas. En ambos tipos de zacate, la poliploidía es muy común; casi el 70 % de las especies en Poaceae son poliploides, valor que resulta muy alto si se considera que en el resto de las familias de plantas con flores, solamente de un 30 a un 35% muestran tal característica. Aunque existen barreras que pueden impedir el entrecruzamiento intergenérico o aún interespecífico entre las gramíneas, algunas especies de *Agropyron* han sido cruzadas exitosamente con ciertas especies de trigo, cebada y centeno<sup>(2)</sup>.

La mayoría de los zacates forrajeros son de polinización cruzada, mediada por viento. Rara vez los zacates forrajeros son autopolinizables, e.g., *Agropyron trachycaulum* (triguillo delgado), *Lolium remotum* y *Lolium temulentum* (Ahloowalia, 1984). Por otro lado, solamente unas pocas especies de gramíneas forrajeras son apomícticas, e.g., *Paspalum notatum*, *P. alnum*, *Poa pratensis*, *Eragrostis curvula* (zacate llorón) y *Cenchrus ciliaris* (zacate buffel); este último zacate es, además, apomíctico facultativo. También en el género *Bothriochloa* es posible encontrar especies con apomixis obligada o facultativa<sup>(6)</sup>.

La presencia de polinización cruzada y autoincompatibilidad en muchas de las especies de zacates forrajeros, e.g., *Lolium perenne*, además de la complejidad genética inherente de muchas especies, complica el manejo de estas plantas, lo que genera esquemas de selección complejos que resultan en un avance muy lento en la obtención de variedades mejoradas. Esto ha llevado al reconocimiento de la biotecnología como una herramienta fundamental para el desarrollo de cultivares de gramíneas forrajeras mejoradas<sup>(7)</sup>.

### Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras

La biotecnología, en un sentido amplio, comprende un grupo de procedimientos y herramientas

Most grasses are cross- and wind-pollinated. Only rarely forage grasses are auto-pollinated, e.g. *Agropyron trachycaulum*, *Lolium remotum* and *Lolium temulentum* (Ahloowalia, 1984). On the other hand, only very few forage grasses are apomictic, e.g. *Paspalum notatum*, *Paspalum alnum*, *Poa pratensis*, *Eragrostis curvula* (weeping lovegrass) and *Cenchrus ciliaris* (buffel grass); this last one being facultative apomictic. Obligate or facultative apomixis can be found also in the genera *Bothriochloa*<sup>(6)</sup> and *Bouteloua*.

Cross-pollination and autoincompatibility in many forage grasses, e.g. *Lolium perenne*, on top of genetic complexity inherent to many species, hinders management of these plants which in turn is the cause of complex selection programs that slow development of new improved varieties. This has caused biotechnology to be recognized as an important tool to develop new cultivars of improved forage grasses<sup>(7)</sup>.

### Biotechnological management of forage grasses

Biotechnology, in its widest sense, comprises procedures and scientific and technological tools use to develop quickly and efficiently a great variety of products and processes, through manipulation of organisms or parts of them. Biotechnology unites a set of molecular and cellular biology tools, genetics, biochemistry and microbiology which allow manipulation of living organisms to modify their productivity or specific characteristics, produce new varieties, bring down production risks and develop new products or bioprocesses through biological systems.

In practice, plant biotechnology includes, among other applications, plant micro-propagation (to obtain pathogen free plants or to multiply massively particular genotypes), genetic transformation with all its possibilities (increase of nutritional quality, physiological or morphological modifications, or use as bioreactors for production of specific compounds), somatic hybridization for genome combination of sexually incompatible species, use of biofertilizers (growth promoting bacteria and mycorrhiza) to control pests and diseases or increase crop productivity or the use of molecular markers



científicas y tecnológicas utilizadas para desarrollar con rapidez y eficiencia una gran variedad de procesos y productos, mediante la manipulación de los seres vivos o partes de ellos. Aglutina un conjunto de herramientas de biología molecular y celular, genética, bioquímica y microbiología que permiten la manipulación de organismos para incrementar la productividad, mejorar características específicas de los seres vivos, producir nuevas variedades de organismos, disminuir riesgos en la producción y desarrollar nuevos productos, o bioprocesos para la obtención de estos, empleando sistemas biológicos.

En términos prácticos, la biotecnología vegetal incluye, entre otras aplicaciones, la micropropagación de plantas (para la obtención de plantas libres de patógenos o multiplicación masiva de genotipos particulares), la transformación genética con todas sus posibilidades (como el incremento de la calidad nutricional, la modificación de la arquitectura y fisiología de las plantas, o su empleo como biorreactores para la producción de compuestos específicos), la hibridación somática para la combinación de genomas de especies sexualmente incompatibles, el empleo de biofertilizantes (como micorrizas y bacterias promotoras de crecimiento) para controlar enfermedades o incrementar la productividad de las cosechas, o el uso de marcadores moleculares que coadyuven a la identificación de genotipos particulares, o seguimiento de caracteres fenotípicos deseables en plantas, como tolerancia a diversos factores ambientales.

#### **Cultivo de tejidos de gramíneas forrajeras**

La familia Poaceae ha sido tradicionalmente recalcitrante a la manipulación *in vitro* y transformación genética; las gramíneas forrajeras y los cereales se encuentran entre las especies más difíciles de manejar *in vitro*<sup>(8,9)</sup>. A la fecha se ha logrado, sin embargo, un avance significativo en la manipulación y transformación genética de cereales, si bien este progreso ha sido menos evidente en el caso de los zacates.

Aunque el establecimiento de cultivos asépticos de gramíneas fue intentado con éxito en los años 40,

to help identifying specific genotypes or to follow up certain desirable phenotypical characteristics, as tolerance to environment constraints.

#### **Forage grass tissue culture**

The Poaceae family has been traditionally recalcitrant to *in vitro* manipulation and to genetic transformation. Cereals and forage grasses are among the most difficult plants to manipulate *in vitro*<sup>(8,9)</sup>. However, to the present, significant progress has been obtained in manipulation and transformation of cereals but not so in forage grasses.

Although aseptic culture of grasses was attempted successfully in the 1940's, it was not until the end of the 1960's that complete regeneration of plants from callus in cereals was achieved, and at the beginning of the 1970's in forage grasses. Even in the 1980's, tissue culture techniques had not contributed significantly to genetic improvement of forage grasses<sup>(2)</sup>.

Meristem culture, haploid plant production (and therefore of homozygote diploid individuals), accelerated propagation of valuable clone material and plant fusion and hybridization are only some of the most evident applications of biotechnology to forage grasses within tissue culture technology.

Up to now, regeneration systems for some 70 forage and turf grass species have been developed<sup>(10-18)</sup>, as well as for ornamental<sup>(19)</sup> and bio-fuel grasses<sup>(20)</sup>. Compared to cell culture, protoplast and tissue culture methods developed for turf and forage grasses<sup>(1,4,21,22,23)</sup>, the number of genetic transformation systems established for these species is very low. Among the causes which could help explaining this discrepancy could be: low growth rate of the calli resulting in an incompatibility with genetic transformation systems, loss of regenerative potential of totipotent material with the passing of time or other technical difficulties related to regeneration and transformation systems<sup>(21)</sup>.

#### **Genetic transformation of forage grasses**

The interchange of genetic characteristics between non related species or even between different

no fue sino hasta finales de los años 60 que se logró la regeneración de plantas completas a partir de callos en cereales, y a principios de los 70 en el caso de zacates forrajeros. Todavía en los años 80 las técnicas de cultivo de tejidos no habían contribuido de manera significativa al mejoramiento genético de los zacates forrajeros<sup>(2)</sup>.

El cultivo de meristemas, la producción de plantas haploides, y por lo tanto de individuos diploides homocigotos, la rápida propagación de material clonal de valor y la fusión e hibridación de plantas son sólo algunas de las aplicaciones más evidentes a la biotecnología de zacates forrajeros dentro de la tecnología del cultivo de tejidos.

Al momento se han desarrollado sistemas de regeneración para alrededor de 70 especies de zacates forrajeros y de césped<sup>(10-18)</sup>, así como para ornamentales<sup>(19)</sup> y biocombustible<sup>(20)</sup>. En comparación con los métodos de cultivos celulares, protoplastos y tejidos desarrollados para zacates de césped o forraje<sup>(1,4,21,22,23)</sup>, el número de sistemas de transformación genética establecidos para estas especies resulta muy bajo. Entre las razones que pueden explicar esta discrepancia se encuentran: tasa de crecimiento lenta de los callos, que resulta incompatible con los sistemas de transformación genética, pérdida del potencial regenerativo del material totipotente con el tiempo, o dificultades técnicas relacionadas con los sistemas de transformación y regeneración empleados<sup>(21)</sup>.

### Transformación genética de gramíneas forrajeras

La introducción de características genéticas entre especies no relacionadas o incluso entre reinos distintos ha llegado a ser una realidad<sup>(24)</sup>. El alcance de las técnicas actuales para la manipulación del genoma de las plantas permite la consecución de objetivos cada vez más ambiciosos y específicos. La primera generación de plantas genéticamente modificadas, tolerantes a enfermedades o a herbicidas, ha dado paso a nuevas aplicaciones para las tecnologías relacionadas con la manipulación del genoma vegetal, y se encuentra en proceso una revolución tecnológica sin precedente, que impactará de manera decisiva la producción de alimentos y la vida humana en general.

kingdoms is possible<sup>(24)</sup>. Current plant genome manipulation techniques allow attaining more ambitious and specific objectives. The first generation of genetically modified plants, disease or herbicide tolerant, has opened the way to new applications for technologies related to plant genome manipulation and an unprecedented technological revolution is in process, which will impact decisively food production and, in general, our way of life.

The spectrum of possibilities offered by these technologies becomes wider with the passing of time, and the second generation of genetically modified plants has arrived. Some of these new advancements can be mentioned: a) development of plants with greater tolerance to different types of environmental stress, b) fruits possessing less allergenic properties, greater tolerance to cold and better nutritional value, c) flowers with modified colors, d) "bioremediation" plants, e) trees with a better lignin solubilization and fragmentation process to improve cellulose production, and with modified wood colors, f) plants able to produce colored fibers g) plants used as bioreactors for producing specific carbohydrates, proteins and oils, as well as of biodegradable plastics<sup>(25,26)</sup>.

Since the obtainment of the first genetically modified forage grass, *Dactylis glomerata*<sup>(27)</sup>, at least eleven systems for genetic transformation of forage grasses have been described: *Agrostis palustris*<sup>(28-33)</sup>, *Agrostis alba*<sup>(34)</sup>, *Agrostis stolonifera*<sup>(35)</sup>, *Festuca arundinacea*<sup>(35-41)</sup>, *Festuca pratensis*<sup>(42)</sup>, *Festuca rubra*<sup>(39,40,43)</sup>, *Lolium perenne*<sup>(35,44,45)</sup>, *Lolium multiflorum*<sup>(35,45,46)</sup>, *Lolium rigidum*<sup>(47)</sup>, *Panicum virgatum*<sup>(48)</sup>, *Psathyrostachys juncea*<sup>(49)</sup> and *Zoysia japonica* (Japanese lawngrass)<sup>(50)</sup>.

Studies on genetic transformation carried out until now have used protoplasts, embryogenic callus or cell suspensions as blank material for DNA direct introduction techniques as microprojectile bombardment, electroporation, polyethylene glycol (PEG), and more recently the silicon carbide fiber method<sup>(21)</sup>.

### Disease control

Biotechnology use in genetic improvement of forage

El espectro de posibilidades de estas metodologías cada vez se hace más amplio (y la segunda generación de plantas genéticamente modificadas está ya a la puerta); entre ellas se pueden mencionar: a) desarrollo de plantas con una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés ambiental, b) frutos con menores propiedades alergénicas, mayor resistencia al frío y mejor valor nutricional, c) flores con colores modificados, d) plantas “bio-remediadoras”, e) árboles con una mejor solubilización y fragmentación de lignina para el proceso de elaboración de celulosa, y con un color de madera modificado, f) plantas productoras de fibras coloreadas, g) uso de plantas como bio-reactores para la producción de proteínas, carbohidratos y aceites específicos, así como de plásticos biodegradables<sup>(25,26)</sup>.

A partir de la obtención del primer zacate forrajero genéticamente modificado, *Dactylis glomerata*<sup>(27)</sup>, se han descrito once sistemas más para la transformación genética de zacates forrajeros: *Agrostis palustris*<sup>(28-33)</sup>, *A. alba* (punta roja)<sup>(34)</sup>, *A. stolonifera*<sup>(35)</sup>, *Festuca arundinacea*<sup>(35-41)</sup>, *F. pratensis*<sup>(42)</sup>, *F. rubra*<sup>(39,40,43)</sup>, *Lolium perenne*<sup>(35,44,45)</sup>, *L. multiflorum*<sup>(35,45,46)</sup>, *L. rigidum*<sup>(47)</sup>, *Panicum virgatum*<sup>(48)</sup>, *Psathyrostachys juncea*<sup>(49)</sup> y *Zoysia japonica* (pasto japonés)<sup>(50)</sup>.

Los estudios de transformación genética llevados a cabo hasta el momento han empleado protoplastos, callos embriogénicos o suspensiones celulares como material blanco para las técnicas de introducción directa de ADN, tales como bombardeo de microproyectiles, electroporación, polietilenglicol y, más recientemente, el método de fibras de carburo de silicio<sup>(21)</sup>.

#### *Control de enfermedades*

La aplicación de la biotecnología al mejoramiento genético de zacates forrajeros tiene un gran potencial para complementar y, en ocasiones, reemplazar los métodos tradicionales de mejoramiento genético de plantas<sup>(44)</sup>, al crear puentes entre los grupos individuales de genes presentes en la naturaleza, y permitir la utilización de material genético proveniente de fuentes heterólogas. Uno de los primeros logros en la ingeniería genética de

grasses has great potential to complement and in some cases even replace traditional plant genetic improvement methods<sup>(44)</sup>, creating bridges between individual groups of genes found in nature and to allow for free use of genetic material coming from heterologous sources. One of the first achievements in genetic engineering of grasses was disease control<sup>(51)</sup>. Although diseases in forage grasses represent also a potential biotechnological target of importance, this problem should be tackled differently than in cereals, because in forage grasses most of the growth is removed through grazing or by cutting for hay or silage and, consequently the way the epiphytias occur is different as they develop in cereals.

Several diseases produce undesirable effects in forage grasses: *Drechslera festuca* (leaf spot) in *Bromus*, *Erysiphe graminis* (powdery mildew) in *Festuca*, *Puccinia coronata* (crown rust) in *Lolium*, *Scolletotrichum graminis* (brown stripe) in *Dactylis*, *Puccinia graminis* var. *phleipratensis* (stem rust) in *Phleum*<sup>(52)</sup> and *Claviceps paspali* (ergot) in *Paspalum dilatatum*<sup>(53)</sup>.

Agronomic interest in transformation of the genera *Festuca* and *Lolium* has centered, among other issues, in the necessity to control an endophytic fungus (*Acremonium* spp) which causes a cattle disease known as fescue summer toxicosis or ryegrass staggers. The relation of this fungus to these forage species seems to be of the mutualistic type, as its presence confers resistance to insects, increases the growth rate and dissuades grazing<sup>(54)</sup>. Therefore, any biotechnology management of this disease should take into account these aspects.

#### *Nutritional quality modification*

Milk, beef and wool production worldwide depends on to a great extent on the use of mixtures of legumes and grasses, being these last ones the main providers of energy for animal growth and development. Therefore, grass yield and quality improvement are critical to increase animal production through augmenting carrying capacity and nutritional value of grazing areas (rangelands and pastures). Thus, increasing the yield, persistence and nutritional quality of forage grasses are other

gramíneas fue el control de enfermedades<sup>(51)</sup>. Aunque en los zacates forrajeros las enfermedades también representan un blanco biotecnológico potencial muy importante, el problema se aborda de una manera distinta a la de los cereales, ya que, por ejemplo, la mayor parte del crecimiento de las gramíneas forrajeras es removido por el pastoreo o por el corte del forraje para utilizarlo como heno o silo, y, en consecuencia, las epifitias no ocurren de la misma manera que en cereales.

Existen una serie de enfermedades que representan un inconveniente en zacates forrajeros como *Drechslera festuca* (leaf spot) en *Bromus*, *Erysiphe graminis* (powdery mildew) en *Festuca*, *Puccinia coronata* (crown rust) en *Lolium*, *Scolletotrichum graminis* (brown stripe) en *Dactylis*, *Puccinia graminis* var. *phleipratensis* (stem rust) en *Phleum*<sup>(52)</sup>, Ergot (*Claviceps paspali*) en *Paspalum dilatatum*<sup>(53)</sup>.

El interés agronómico en la transformación de géneros como *Festuca* y *Lolium* se ha centrado, entre otros aspectos, en la necesidad de controlar un hongo endofítico muy común en estas especies (*Acremonium* spp), el cual ocasiona enfermedades en el ganado conocidas como “toxicidad de verano por festuca” (fescue summer toxicosis) o “tambaleo por ryegrass” (ryegrass staggers). Paradójicamente, la relación de este hongo con las especies forrajeras referidas parece ser de tipo mutualístico, ya que su presencia puede conferir resistencia a insectos, incrementar su tasa de crecimiento y, además, disuadir el pastoreo<sup>(54)</sup>. Por lo tanto, cualquier manejo biotecnológico que se haga de esta enfermedad deberá tener en consideración estos aspectos.

#### *Modificación de la calidad nutricional*

La producción de leche, carne y lana en el mundo, depende en gran medida de la utilización de mezclas de leguminosas y gramíneas, en las cuales el aporte de estas últimas constituye la principal fuente de energía para el crecimiento y desarrollo de los animales. Por lo tanto, el mejoramiento de la calidad y rendimiento de las gramíneas forrajeras es de crucial importancia para incrementar la capacidad de carga y la calidad del forraje de las áreas de

important challenges to be faced through genetic transformation technology<sup>(23)</sup>.

Nutritional quality of forage grasses directly affects animal nutrition, especially when animal production is carried out in extensive conditions, using native vegetation as the main feed source. In these cases, climate, mainly rainfall, plays a determinant influence on forage nutritional parameters, especially digestibility and protein content.

Nutritional quality of legumes and grasses is directly influenced by digestibility, which in turn is affected by carbohydrate, protein and fiber content<sup>(2)</sup>. Dry matter *in vitro* digestibility shows a negative correlation with lignin content<sup>(55)</sup>, but positive with soluble carbohydrate content<sup>(56)</sup>. Ni *et al.*<sup>(57)</sup> reduced the lignin content in transgenic plants by decreasing the production of *O*-methyltransferase using the antisense production technology. On their part, Heath *et al.*<sup>(58)</sup> cloned three cDNAs of this enzyme from *Lolium perenne* plants, which will allow to design *ad hoc* methodologies for lignin reduction in this and other grass species.

Manipulation of other enzymes related to lignin production in other plants has been crowned with success, resulting in a reduction of the content of this polymer<sup>(59,60)</sup>. Meanwhile, the first attempts to increase non structural carbohydrate concentration have been carried out through fructan metabolism manipulation<sup>(61)</sup>.

Sulphur amino acids are among the essential amino acids which are deficient in ruminant nutrition. Tabe *et al.*<sup>(62)</sup> introduced sunflower genes in alfalfa codifying a protein rich in sulphur amino acids (methionine and cysteine) that possess ruminal stability, with the object of increasing wool production in sheep. Later, subterranean clover (*Trifolium subterraneum*)<sup>(63)</sup> and tall fescue (*Festuca arundinacea*)<sup>(64)</sup> transgenic plants containing this protein were obtained. However, expression levels obtained with *Festuca arundinacea* were not able to contribute significantly to total protein content. New strategies to increase these levels should be designed, perhaps through stronger promoters or enhancers, or through transplastomic plants.



pastoreo (pastizales y praderas), y consecuentemente la producción animal. El incremento del rendimiento y persistencia de los zacates forrajeros son otros dos retos importantes a ser enfrentados mediante la tecnología de transformación genética<sup>(23)</sup>.

La calidad nutrimental de las gramíneas forrajeras afecta de manera determinante la nutrición animal, en especial cuando la producción de ganado se lleva a cabo en condiciones extensivas, empleando la vegetación nativa como fuente de forraje, debido a la influencia determinante que las condiciones climáticas, especialmente la lluvia, ejercen sobre la variación de los parámetros nutrimentales del forraje, en particular la digestibilidad y el contenido de proteína.

La calidad nutricional de los zacates y leguminosas está influenciada por su digestibilidad, la cual, a su vez, es afectada por el contenido de carbohidratos, proteína y fibra<sup>(2)</sup>. La digestibilidad *in vitro* de la materia seca observa, por otro lado, una correlación negativa con el contenido de lignina<sup>(55)</sup>, pero positiva con el contenido de carbohidratos solubles<sup>(56)</sup>. Ni *et al.*<sup>(57)</sup> redujeron el contenido de lignina en plantas transgénicas al disminuir la producción de la enzima O-metil transferasa, mediante la producción de antisentidos. Por su parte Heath *et al.*<sup>(58)</sup> clonaron tres cADN's de esta enzima a partir de plantas de *Lolium perenne*, las cuales permitirán diseñar metodologías *ad hoc* tendientes a reducir el contenido de lignina en ésta y otras especies de gramíneas.

La manipulación de otras enzimas relacionadas con la producción de lignina ha resultado exitosa en otras plantas, lográndose reducir el contenido de este polímero<sup>(59,60)</sup>; mientras que ya se han llevado a cabo los primeros intentos para incrementar la concentración de carbohidratos no estructurales, mediante la manipulación del metabolismo de fructanos<sup>(61)</sup>.

Los aminoácidos azufrados se encuentran entre los aminoácidos esenciales más limitantes para la nutrición de rumiantes. Tabe *et al.*<sup>(62)</sup> introdujeron genes de girasol en alfalfa que codifican una proteína rica en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) con estabilidad ruminal, con el objetivo

### **Other possibilities for genetic manipulation of forage grasses**

One of the goals of genetic improvement of ornamental or golf course grasses is to increase disease tolerance, lengthen the green period of lawns<sup>(50)</sup> and to reduce their allergenic properties<sup>(47)</sup>. Obtaining herbicide resistant grasses is of great importance and shows great potential for the lawn and golf links industry owing to the possibility of lowering maintenance costs.

Due to the ability shown by many grasses to tolerate diverse types of environmental stresses and therefore to be able to grow under environments which result limitative for growth of most plants, it should be equally important to consider the possibility of using grasses with ability to grow in marginal areas as biorreactors for the production of vaccines, biodegradable plastics or certain types of proteins, thus generating new production alternatives for urban areas.

Finally, the high plasticity and tolerance to diverse environmental constraints (salinity, drought, aluminum in soil, etc.) shown by some forage grasses, convert these plants into an important gene reservoir from which new genes can be incorporated into cereals.

### **Molecular characterization and genotype selection**

Practically all methodological variants for molecular marker analysis have been applied in forage grass studies: isozymes, restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), microsatellites and single nucleotide polymorphism (SNP).

Use of these methodologies in forage grasses has resulted, among other applications, in the study of population structure, the detection of intra and inter population genetic variability, the study of the effect of environmental factors on population differentiation, the establishment of phylogenetic relationships, construction of genetic maps, assessment of somaclonal variation in regenerated plants cultured *in vitro*, follow up of agronomic characters (marker assisted selection; MAS) and hereditary pattern analysis<sup>(21,23)</sup>.

de incrementar la producción de lana en borregos. Posteriormente se obtuvieron plantas transgénicas de *Trifolium subterraneum*<sup>(63)</sup> y *F. arundinacea*<sup>(64)</sup> con esta misma proteína. En el caso de *F. arundinacea*, sin embargo, los niveles de expresión alcanzados no lograron contribuir sustancialmente al contenido total de proteína. Nuevas estrategias deberán trazarse para incrementar estos niveles, ya sea mediante promotores, intensificadores más potentes o mediante la obtención de plantas transplastómicas.

### Otras posibilidades para la manipulación genética de gramíneas forrajeras

Una de las metas del mejoramiento genético de los zacates ornamentales o destinados al establecimiento de campos de golf es el de incrementar la tolerancia a enfermedades, extender el período verde de los céspedes<sup>(50)</sup> y reducir sus propiedades alergénicas<sup>(47)</sup>. La obtención de pastos con tolerancia a herbicidas tiene un gran potencial de aplicación en la industria del establecimiento de campos de golf y céspedes, en general, ya que esta capacidad supone un menor costo de mantenimiento.

Dada la capacidad de muchos zacates para tolerar diferentes tipos de estrés ambiental y, por lo tanto, crecer en ambientes limitantes para la mayoría de las plantas, sería igualmente importante el considerar la utilización de zacates con capacidad para crecer en áreas marginales como bioreactores para la producción de vacunas, plásticos biodegradables o proteínas de importancia industrial, y de esta manera generar nuevas alternativas de producción para las áreas urbanas de nuestro país.

Finalmente, la gran plasticidad y tolerancia a diversas restricciones ambientales mostradas por algunas especies de gramíneas forrajeras (salinidad, sequía, aluminio, entre otras) convierte a este grupo de plantas en una importante fuente de genes a incorporarse en los cereales.

### Caracterización molecular y selección de genotipos

Prácticamente todas las posibles variantes metodológicas para el análisis de marcadores moleculares han sido aplicados al estudio de los zacates forrajeros: isoenzimas, análisis del

### *Bouteloua gracilis* biotechnological management

Blue grama (*Bouteloua gracilis* [H.B.K.] Lag. ex Steud.) is the most important grass of the native grasslands in Center and North Mexico<sup>(65,66)</sup> and also of the short grass prairie of the USA<sup>(67)</sup>, where it contributes between 75 to 90 % of primary net productivity<sup>(68)</sup>, being a good forage source for all types of cattle and native wildlife<sup>(69)</sup> and constituting the main pillar sustaining extensive cattle production in the ranges of Mexico's central highland<sup>(70)</sup>. It also is the most promising grass for repopulation of the dry ranges in the Great Plains of the USA<sup>(71)</sup> and has been considered for use in golf links<sup>(72)</sup> under rainfed conditions.

This grass is widely distributed in North America from 305 to 2,131 m above sea level. It spreads from southern Saskatchewan, Alberta, central British Columbia, western and southern Manitoba, northeastern Indiana, southern Illinois, central Missouri, western Texas and southern Arkansas to Mexico's central highlands<sup>(74,75)</sup>. It has also been found in South America<sup>(76)</sup>, where it was probably introduced<sup>(77)</sup>.

Although this grass is by itself important and a model for studying the establishment of grasses in dry environments<sup>(78)</sup>, the genetic information which has allowed this plant to survive to stringent selection forces, such as high grazing pressure, fires, drought, frosts and other environment factors which characterize the stochastic North American semiarid environment, should be analyzed and exploited to benefit other grasses of primary importance for mankind, such as cereals, especially those genes that confer this grass a high tolerance to drought and grazing<sup>(79,80)</sup> and also those genes controlling apomixis in this specie<sup>(81)</sup>.

The first biotechnological outlines for *Bouteloua gracilis* management have already been developed. As a starting point, the first systems for plant regeneration from tissue culture are already established<sup>(22,82)</sup>. Afterwards, through a *sui generis* system based on a highly chlorophyllic embryogenic cell line, the first transgenic plants were obtained from microprojectile bombardment<sup>(83)</sup>.

polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), análisis del polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados al azar (RAPDS), microsátelites y análisis del polimorfismo de nucleótidos sencillos (SNPs).

La utilización de estas metodologías en los zacates forrajeros han resultado, entre otras aplicaciones, en el estudio de su estructura poblacional, la detección de variabilidad genética intra e interpoblacional, el estudio del efecto de factores ambientales sobre la diferenciación de poblaciones, la diferenciación de especies y biotipos, el establecimiento de relaciones filogenéticas, la construcción de mapas genéticos, la evaluación de la variación somaclonal en plantas regeneradas de cultivo de tejidos, seguimiento de características agronómicas (SAMM; Selección asistida por marcadores moleculares) y análisis de patrones hereditarios(21,23).

### Manejo biotecnológico de *Bouteloua gracilis*

El zacate navajita azul (*Bouteloua gracilis* [H.B.K.] Lag. ex Steud.) es la gramínea más importante de los pastizales naturales del centro y norte de México(65,66) y también del pastizal corto de los Estados Unidos(67), donde contribuye con un 75 a 90 % a la productividad primaria neta(68). Constituye una buena fuente de forraje para todas las clases de ganado y para la fauna silvestre(69), constituye el sustento de la ganadería extensiva de muchos de los agostaderos del altiplano central mexicano(70), es el zacate más promisorio para la repoblación de los pastizales secos de las Grandes Llanuras de Norteamérica(71) e incluso se le ha llegado a considerar como una alternativa para el establecimiento de campos de golf en tierras de temporal(72).

*Bouteloua gracilis* se encuentra ampliamente distribuido en Norteamérica desde 305 a 2,131 msnm(73); se extiende desde el sur de Saskatchewan, Alberta, centro de Columbia Británica, oeste y sur de Manitoba, noreste de Indiana, sur de Illinois, centro de Missouri, oeste de Texas y sur de Arkansas, hasta las mesetas centrales de

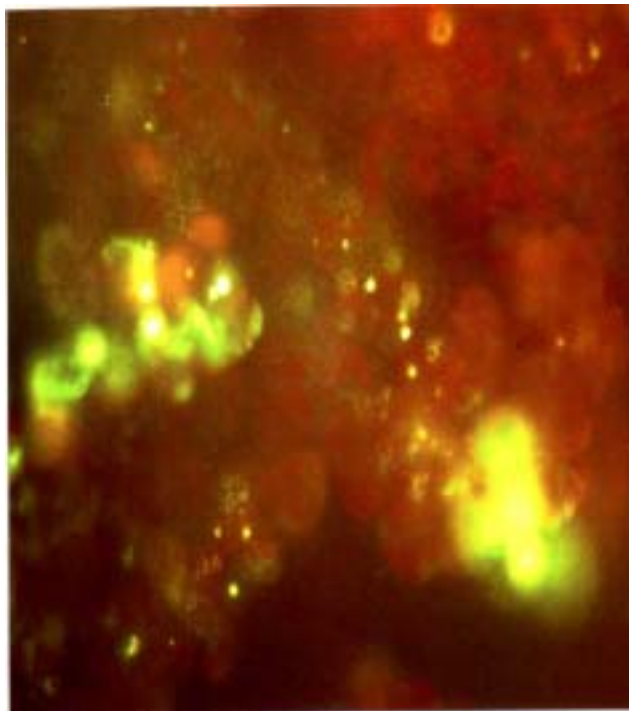
Currently, other methodological alternatives for genetic transformation of this plant are being assessed, such as the use of fluorescent green protein as reporter gene in *Bouteloua gracilis* genetic transformation studies (Aguado-Santacruz *et al.*, unpublished; Figure 1).

Through RAPD type analysis the effect of grazing on genetic variability of four *Bouteloua gracilis* population has been studied(84), and among other important results, overgrazing was found to have contributed to a reduction of genetic variability in ranges in the central highlands of Mexico.

Ongoing research projects in INIFAP's Biotechnology Unit in collaboration with the Genetic

Figura 1. Expresión transitoria de la proteína verde fluorescente en la línea celular clorofílica 'TIAN SJ98' de *Bouteloua gracilis*

Figure 1. Fluorescent green protein transient expression in the chlorophyllous 'TIAN SJ98' cell line of *Bouteloua gracilis*



When excited by means of ultraviolet light, the chloroplasts are seen as orange colored ovals.

México<sup>(74,75)</sup>. También se le ha encontrado en América del Sur<sup>(76)</sup>, donde probablemente fue introducida<sup>(77)</sup>.

Aunque esta gramínea es por sí misma importante y un modelo para estudiar el establecimiento de gramíneas en ambientes secos<sup>(78)</sup>, la información genética que le ha permitido sobrevivir a las astringentes fuerzas de selección, como las altas presiones de pastoreo, incendios, sequía, heladas y otros factores ambientales que caracterizan al estocástico ambiente semiárido de Norteamérica, amerita ser analizada y explotada en beneficio de otras gramíneas importantes para el hombre, como son los cereales; particularmente los genes que le confieren una alta tolerancia a la sequía y al pastoreo<sup>(79,80)</sup>, y los genes que controlan la apomixis en esta especie<sup>(81)</sup>.

Se han desarrollado ya los primeros esquemas biotecnológicos para el manejo de *B. gracilis*. Como punto de partida se establecieron los primeros sistemas para la regeneración de plantas en cultivo de tejidos<sup>(22,82)</sup>; posteriormente, usando un sistema *sui generis* basado en una línea celular embriogénica con alto contenido de clorofila, se obtuvieron las primeras plantas transgénicas de esta gramínea mediante la técnica de bombardeo de micropartículas<sup>(83)</sup>.

Actualmente, se evalúan otras alternativas metodológicas para la transformación genética de esta especie, como la utilización de la proteína verde fluorescente (Figura 1) como gen reportero en estudios de transformación genética de *B. gracilis* (Aguado-Santacruz *et al.*, no publicado).

Mediante análisis tipo RAPD se ha estudiado el efecto del pastoreo sobre la diversidad genética de cuatro poblaciones de *B. gracilis*<sup>(84)</sup>, y entre otros resultados importantes, se encontró que el sobrepastoreo ha contribuido a reducir la variabilidad genética de esta gramínea en pastizales del altiplano central mexicano.

Proyectos actualmente en desarrollo en la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en colaboración con el Departamento de Ingeniería

Engineering Department of CINVESTAV-Irapuato, attempt to identify and isolate through microarrays and subtractive hybridization some of the most important genes responsible for water stress tolerance in *Bouteloua gracilis*.

### Ecologic considerations

Strategies for genome manipulation in plants should take into account environment compatible approaches, especially in those plants growing in natural habitats.

As cattle feeds on forage plants, the problem raised by use of GMO's is different to the one present in plants consumed directly by man. For example the public concern related to the presence of allergens in transgenic foods and the possible development of pathogens resistant to antibiotics because of the transfer of selection genes through food to pathogens normally present in man<sup>(85)</sup>. In forage grasses, this issue raises difficulties maybe of a less relative importance than those linked to environment and ecologic considerations, as could be an escape of transgenes to related species. Among these, the use of the "terminator" system has been a source of keen controversy, because, in accordance with opponents to this technology, pollen of genetically modified plants, could fertilize wild related species not selected originally and cause an ecologic disaster of unknown consequences<sup>(86)</sup>.

Co-transformation approaches or the introduction of a selection marker between two transposition elements together with a transposase gene, and a later selection of segregants carrying the characteristic of interest, as well as the utilization of the chloroplast transformation technology (based on chloroplast uniparental inheritance) should be considered as viable alternatives<sup>(86)</sup>. More recently, Zubko *et al*<sup>(87)</sup> proposed a new strategy based on introduction of a construction containing the selectable marker gene (NPTII) between two 352 pb fragments of the lambda bacteriophage (attP regions). Afterwards, the somatic tissue which has suffered deletions, product of an intrachromosomal recombination between the two attP regions, is identified. Other strategies for the production of genetically modified plants free of selectable markers seem to be equally promising<sup>(88)</sup>.



Genética del CINVESTAV-Unidad Irapuato, pretenden identificar y aislar mediante técnicas de hibridación substractiva y microarreglos, algunos de los genes más importantes implicados en la respuesta al estrés hídrico de esta importante gramínea.

### Consideraciones ecológicas

Las estrategias para la manipulación del genoma de las plantas deberán considerar enfoques ambientalmente compatibles, particularmente en plantas que requieran ser cultivadas en su ambiente natural.

Por ser el ganado quien consume las plantas forrajeras, el problema que plantea la utilización de organismos genéticamente modificados es distinto al que se presenta en los cultivos que son consumidos directamente por el hombre; por ejemplo, las preocupaciones de la sociedad relacionadas con la presencia de factores alergénicos en los alimentos transgénicos, y el posible desarrollo de patógenos más resistentes a los antibióticos por la transferencia de genes de los alimentos, que acarrear los agentes de selección a los patógenos que están normalmente presentes en el humano<sup>(85)</sup>. Este tema plantea dificultades de una importancia relativa menor a aquéllas vinculadas con consideraciones de tipo ambiental y ecológico, como el escape de los transgenes a especies relacionadas; entre estos, el sistema 'terminator' ha causado gran controversia, debido a que de acuerdo a los detractores de esta tecnología, el polen de plantas genéticamente modificadas podría fertilizar a especies silvestres relacionadas, pero que no fueron seleccionadas originalmente, y causar un desastre ecológico<sup>(86)</sup>.

Los enfoques de co-transformación, o introducción del marcador de selección entre dos elementos de transposición junto con un gen de transposasa, y selección posterior de segregantes portadores de la característica de interés, así como la estrategia de transformación de cloroplastos (basada en la herencia uniparental de estos plástidos), se erigen como alternativas viables<sup>(86)</sup>. Más recientemente, Zubko *et al.*<sup>(87)</sup> han propuesto una estrategia nueva basada en la introducción de una construcción que

### CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Currently available biotechnological tools are contributing significantly to increase productivity in basic crops. Basic research on forage grasses of the genera *Lolium* and *Festuca* has been critical to attain many achievements currently exploited in cereals. However, at this time, scientific activities directly focused to increase the value of these forage species are already in process, either changing their nutritional quality or aesthetic qualities or through increasing tolerance to diseases. The spectrum of possibilities for plant manipulation grows wider with new emerging technologies. The high tolerance shown by some forage to a great diversity of environmental constraints raises the possibility of using these plants as biorreactors for production of specific compounds in marginal areas and also as a source for isolation of genes with potential for cereal manipulation. Use of genetically modified forage grasses should require a comprehensive assessment of the potential risks of the technologies being studied, considering all the advantages and disadvantages relative to traditional methods. In forage grasses, ecologic considerations acquire new dimensions, because of their possible use in natural areas, where conservation issues could become the main obstacle, although factors owing to urban growth could lessen the force of these arguments.

### ACKNOWLEDGMENTS

To Q.A. Pablo Delgado Sánchez for the revision of the first version of this paper.

*End of english version*

---

contiene el gen de selección (NPTII) entre dos fragmentos de 352 pb del bacteriófago lambda (regiones attP). Posteriormente se identifica el tejido somático que haya sufrido deleciones, producto de la recombinación intracromosomal entre las dos regiones attP. Otras estrategias para la producción de plantas genéticamente modificadas libres de

marcadores de selección parecen ser igualmente promisorias<sup>(88)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Las herramientas biotecnológicas actualmente disponibles están contribuyendo de manera muy significativa a incrementar la productividad de los cultivos básicos. La investigación básica generada en zacates forrajeros como *Lolium* y *Festuca* ha sido fundamental para la consecución de muchos de los logros que actualmente se explotan en los cereales; sin embargo, en este momento se encuentran ya en proceso actividades científicas directamente enfocadas a incrementar el valor de estas especies, ya sea alterando la calidad nutricional o incrementando su tolerancia a enfermedades o cualidades estéticas. El espectro de posibilidades para la manipulación de estas plantas se amplía a la luz del desarrollo de tecnologías emergentes; la elevada tolerancia de algunas gramíneas forrajeras a una gran diversidad de restricciones ambientales plantea la posibilidad de utilizar estas plantas como bioreactores para la producción de compuestos específicos en áreas marginales, y también como fuentes para el aislamiento de genes con potencial para la manipulación de cereales. La utilización de gramíneas forrajeras genéticamente modificadas requerirá una evaluación exhaustiva de los riesgos potenciales de las tecnologías en estudio, considerando siempre las ventajas o desventajas con relación a procesos tradicionales en uso. En los zacates, las consideraciones de tipo ecológico adquieren una mayor dimensión, en vista de su empleo potencial en áreas naturales, donde el espíritu conservacionista podría convertirse en el principal obstáculo para su empleo, si bien algunos factores tales como las proyecciones del crecimiento urbano podrían, a su vez, mermar la fortaleza de estos argumentos.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Químico Agrícola Pablo Delgado Sánchez la revisión de una de las primeras versiones del artículo.

## LITERATURA CITADA

1. Lee L. Turfgrass biotechnology. *Plant Sci* 1996;115:1-8.
2. Ahloowalia BS. Cereals. Forage grasses. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y editors. Handbook of plant cell culture. New York, USA: Mcmillian Publishers Co.; 1984:91-125.
3. Enríquez QJF, Meléndez NF, Bolaños AED. Tecnología para la producción y manejo de forrajes tropicales en México. Veracruz, México: INIFAP, Centro de Investigación Regional Golfo Centro; 1999.
4. Casa AM, Mitchell SE, Lopes CR, Valls JFM. RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomictic *Paspalum dilatatum* Poiret biotypes. *J Heredity* 2002;93:300-302.
5. Bovo OA, Quarin CL. Obtención de plantas de *Paspalum alnum* (Gramineae) a partir del cultivo in vitro de ovarios jóvenes. *Phyton* 1983;43:29-34.
6. Metzinger BD, Taliaferro CM, Johnson BB. In vitro regeneration of apomictic bluestem grasses. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1987;10:31-38.
7. Bingham TB, Conger BV. Forage crop development: Application of emerging technologies. In: Barns RF, Miller DA, Nelson CJ editors. Forages, vol. 2. The science of grassland agriculture. 5th ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1995:21-27.
8. Vasil IK. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology* 1988;6:397-402.
9. Potrykus I. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 1990;8:535-542.
10. Chen CH, Stenberg NE, Ross JG. Clonal propagation of big bluestem by tissue culture. *Crop Sci* 1977;17:847-850.
11. Lo PF, Chen CH, Ross JG. Vegetative propagation of temperate forage grasses through callus culture. *Crop Sci* 1980;20:363-367.
12. Bajaj YPS, Sidhu BS, Dubey VK. Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass- *Panicum* sps. *Euphytica* 1981;30:135-140.
13. Songstad DD. Tissue culture of the forage grass little bluestem [*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash] [MSc thesis]. South Dakota State University; 1983.
14. Johnson BB, Worthington M. Establishment of suspension cultures from seeds of Plains bluestem [*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng] and regeneration of plants via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Devel Biol Plant* 1987;23:783-787.
15. Straub PF, Decker DM, Gallagher JL. Tissue culture and regeneration of *Distichlis spicata* (Gramineae). *Amer J Bot* 1989;76:1448-1451.
16. Franklin CI, Trieu TN, Gonzales RA. Plant regeneration through somatic embryogenesis in the forage grass Caucasian bluestem (*Bothriochloa caucasica*). *Plant Cell Rep* 1990;9:443-446.
17. Akashi R, Adachi T. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). *Plant Sci* 1992;82:213-218.
18. Chakravarty T, Norcini, JG, Aldrich JH, Kalmbacher RS. Plant regeneration of creeping bluestem (*Schizachyrium scoparium*) (Michx.) Nash var. *stoloniferum* (Nash) J. Wipff) via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Devel Biol Plant* 2001;37:550-554.
19. Robacker CD, Corley WL. Plant regeneration of pampasgrass from immature inflorescences cultured in vitro. *Hort Science* 1992;27:841-843.

20. Denchev PD, Conger BV. Plant regeneration from callus cultures of Switchgrass. *Crop Sci* 1994;34:1623-1627.
21. Chai B, Sticklen MB. Applications of biotechnology in turfgrass genetic improvement. *Crop Sci* 1998;38:1320-1338.
22. Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Olalde-Portugal V, Sánchez-González MR, Márquez-Guzmán J, Herrera-Estrella L. Tissue culture and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. *In Vitro Cell Devel Biol Plant* 2001;37:182-189.
23. Wang Z, Hopkins A, Mian R. Forage and turf grass biotechnology. *Crit Rev Plant Sci* 2001;20:573-619.
24. DeBlock M. The cell biology of plant transformation: Culture, state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica* 1993;71:1-14.
25. Hammond J. Overview: The many uses and applications of transgenic plants. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1999;240:1-19.
26. Dunwell JM. Transgenic crops: The next generation, or an example of 2020 vision. *Ann Bot* 1999;84:269-277.
27. Horn ME, Shillito RD, Conger BV, Harns CT. Transgenic plants of Orchardgrass (*Dactylis glomerata*) from protoplasts. *Plant Cell Rep* 1988;7:469-472.
28. Zhong H, Srinivasan C, Sticklen MB. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.). *Plant Cell Rep* 1991;10:435-456.
29. Hartman CL, Lee I, Day PR, Tumer NE. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Bio/Technology* 1994;12:919-923.
30. Lee L, Hartman C, Laramore C, Tumer N, Day P. Herbicide-resistant creeping bentgrass. *USGA Green Section Record* 1995;33:16-18.
31. Sugiura K, Inokuma C, Imaizumi N, Cho C. Transgenic creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) plants regenerated from protoplasts. *J Turf Manage* 1997;2:43-53.
32. Asano Y, Ito Y, Fukami M, Sugiura K, Fujie A. Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Rep* 1998;17:963-967.
33. Yu TT, Skinner DZ, Liang GH, Trick HN, Huang B, Muthukrishnan S. *Agrobacterium* mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene. *Hereditas* 2000;133:229-233.
34. Asano Y, Ugaki M. Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Rep* 1994;13:243-246.
35. Dalton SJ, Bettany AJE, Timms E, Morris P. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures. *Plant Sci* 1998;132:31-43.
36. Wang ZY, Takamizo T, Iglesias VA, Osusky M, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G. Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Bio/Technology* 1992;10:691-696.
37. Ha SB, Wu F-S, Thorne TK. Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Rep* 1992;11:601-604.
38. Dalton SJ, Bettany AJE, Timms E, Morris P. The effect of selection pressure on transformation frequency and copy number in transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Sci* 1995;108:63-70.
39. Spangenberg G, Wang ZY, Wu XL, Nagel J, Iglesias VA, Potrykus I. Transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) and red fescue (*F. rubra*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *J Plant Physiol* 1995;145:693-701.
40. Cho MJ, Ha CD, Lemaux PG. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. *Plant Cell Rep* 2000;19:1084-1089.
41. Wang ZY, Ye XD, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G. Expression of a sulphur-rich sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) plants. *Plant Cell Rep* 2001;20:213-219.
42. Spangenberg G, Wang ZY, Vallés MP, Potrykus I. Transformation in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). In: Bajaj YPS editor. *Plant protoplasts and genetic engineering VI, Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1995:183-203.
43. Spangenberg G, Wang ZY, Nagel J, Potrykus I. Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Sci* 1994;97:83-94.
44. Spangenberg G, Wang ZY, Nagel J, Wu XL, Potrykus I. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Sci* 1995;108:209-217.
45. Wang GR, Binding H, Posselt UK. Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam. *J Plant Physiol* 1997;151:83-90.
46. Ye X, Wang ZY, Wu X, Potrykus I, Spangenberg G. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep* 1997;16:379-384.
47. Bhalla PL, Swoboda I, Singh MB. Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1999;96:11676-11680.
48. Richards HA, Rudas VA, Sun H, McDaniel JK, Tomaszewski Z, Conger BV. Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation. *Plant Cell Rep* 2001;20:48-54.
49. Wang ZY, Bell J, Lehmann D, Auh C, Hopkins A. Genetic transformation of cool-season forage grasses. In: *Plant and animal genome IX. The International Conference of the status of plant and animal genome research*. San Diego, California; USA 2001:25.
50. Inokuma C, Sugiura K, Imaizumi N, Cho C. Transgenic Japanese lawngress (*Zoysia japonica* Steud.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Rep* 1998;17:334-338.
51. Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, et al. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 1993;11:194-200.
52. O'Rourke CJ. *Diseases of grasses and forage legumes in Ireland*. Dublin, Ireland: Agric Inst; 1976.
53. Bennett HW. Variations in Johnsongrass and Dallisgrass. *Assoc South Agric Workers Proc* 1940;41:81-86.
54. Siegel MR, Latch GC, Johnson MC. *Acremonium* fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: significance and control. *Plant Disease* 1985;2:179-183.
55. Jung HG, Deetz DA. Cell wall lignification and degradability. In: Jung H, Buxton D, Hatfield R, Ralph J editors. *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy; 1993:315-346.

56. Radojevic I, Simpson RJ, St. John JA, Humphreys MO. Chemical composition and in vitro digestibility of lines of *Lolium perenne* selected for high concentrations of water-soluble carbohydrates. Aust J Agric Res 1994;45:901-912.
57. Ni W, Paiva NL, Dixon RA. Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid *O*-methyltransferase antisense gene. Transgenic Res 1994;3:120-126.
58. Heath R, Huxley H, Stone B, Spangenberg G. cDNA cloning and differential expression of three caffeic acid *o*-methyltransferase homologues from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). J Plant Physiol 1998;153:649-657.
59. Sewalt VJH, Ni WT, Blount JW, Jung HG, Masoud SA, Howles PA, Lamb C, Dixon RA. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine amonial-lyase or cinnamate 4-hydrolase. Plant Physiol 1997;115:41-50.
60. Sewalt VJH, Ni W, Jung HG, Dixon RA. Lignin impact on fiber degradation: increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content. J Agric Food Chem 1997;45:1977-1983.
61. Ye XD, Wang ZY, Wu XL, Potrykus I, Spangenberg G. Altered fructan accumulation in transgenic *Lolium multiflorum* plants expressing a bacterial levansucrase gene. Plant Cell Rep 2001;20:205-212.
62. Tabe LM, Wardley-Richardson T, Ceriotti A, Aryan A, McNabb W, Moore A, Higgins TJV. A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa. J Anim Sci 1995;73:2752-2759.
63. Khan MRI, Ceriotti A, Tabe L, Aryan A, McNabb W, Moore A, Craig S, Spencer D, Higgins TJV. Accumulation of a sulphur-rich seed albumin from sunflower in the leaves of transgenic subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). Transgenic Res 1996;5:179-185.
64. Wang ZY, Ye XD, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G. Expression of a sulphur-rich protein sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) plants. Plant Cell Rep 2001;20:213-219.
65. Vázquez HB. Respuestas demográficas y esfuerzo reproductivo de *Bouteloua gracilis* bajo pastoreo continuo y exclusión en "El Gran Tunal", San Luis Potosí [tesis licenciatura]. San Luis Potosí, S.L.P., México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 1988.
66. Orozco AMS. Efecto de la profundidad de siembra y la fertilización en el establecimiento de tres zacates forrajeros [tesis maestría]. Montecillo, Edo. México, México: Colegio de Postgraduados; 1993.
67. Sims PL, Lang'at RK, Hyder DN. Developmental morphology of blue grama and sand bluestem. J Range Manage 1973;26:340-344.
68. Coffin DP, Lauenroth WK. Spatial variability in seed production of the perennial bunchgrass *Bouteloua gracilis* (Gramineae). Am J Bot 1992;79:347-353.
69. Stubbendieck J, Hatch SL, Hirsch KJ. North American range plants. 3<sup>rd</sup> ed. Lincoln, Nebraska, USA: University of Nebraska Press; 1986.
70. Jaramillo VV. La importancia de los coeficientes de agostadero y de las gramíneas en el manejo de los agostaderos del país. En: Gutiérrez CJ editor. Segundo congreso nacional sobre manejo de pastizales. Saltillo, Coah. 1986:8-15.
71. Wilson AM, Briske DD. Seminal and adventitious root growth of blue grama seedlings on the Central Plains. J Range Manage 1979;32:209-213.
72. Forage Information System, Oregon State University, 2000; <http://forages.orst.edu>.
73. Wolfe HG, Oaks WR, Hooks RF. 'Hachita' blue grama. Coop. Ext. Serv. New Mexico State University. Circular 501; 1982.
74. Hitchcock AS. Manual of the grasses of the United States. USDA Misc. Publ.; 1950.
75. Weaver JE, Clements FE. Plant Ecology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, USA: McGraw-Hill; 1938.
76. Gould FW. Grasses of southwestern United States. Univ. Ariz. Biol Sci Bull 7; 1951.
77. Beetle AA. Noteworthy grasses from México V. Phytologia 1977;37:317-407.
78. Elbersen HW, Ocumpaugh WR, Hussey MA, Sanderson MA, Tischler CR. Crown node elevation of switchgrass and kleingrass under low light. Crop Sci 1998;38:712-716.
79. Hoover MM, Hein MA, Dayton WA, Erlanson CO. The main grasses for farm and home. In: Stefferud A editor. Grass Yearbook of Agriculture. USDA; 1948.
80. Waller SS, Lewis JK. Occurrence of C3 and C4 photosynthetic pathways in North American grasses. J Range Manage 1979;32:12-28.
81. Gustafsson A. Apomixis in higher plants. Leipzig, Germany: Otto Harrassowitz; 1946.
82. Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Ramírez-Chávez E, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Olalde-Portugal V. Establishment, initial characterization and plant regeneration from chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex. Steud. Plant Cell Rep 2001;20:131-136.
83. Aguado-Santacruz GA, Rascón-Cruz Q, Cabrera-Ponce JL, Martínez-Hernández A, Olalde-Portugal V, Herrera-Estrella L. 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 2002;104:763-771.
84. Aguado-Santacruz GA, Leyva-López NE, Pérez-Márquez KI, García-Moya E, Arredondo-Moreno JT, Martínez-Soriano JP. Genetic variability of *Bouteloua gracilis* populations differing in forage production at the southernmost part of the North American Graminetum [in press]. Plant Ecology 2003.
85. Vega M, Bontoux L, Llobell A. Biotechnology for environmentally safe agriculture. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 1999;35:432-435.
86. Daniell H. Environmentally friendly approaches to genetic engineering. In Vitro Cell Dev Biol Plant 1999;35:361-368.
87. Zubko E, Scutt C, Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. Nat Biotechnol 2000;18:442-445.
88. Ebinuma H, Komamine A. MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. In Vitro Cell Devel Biol Plant 2001;37:103-113.