

## **Presente y futuro de la biotecnología en especies forrajeras en sudamérica, especialmente en Argentina.**

**V. Echenique<sup>1,2</sup>, P. Polci<sup>2</sup> y E. Lutz<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup>CONICET - <sup>2</sup>Depto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. San Andrés 800 – 8000 Bahía Blanca, Argentina.**

**Email: [vechenique@ucadvis.edu](mailto:vechenique@ucadvis.edu), [echeniq@criba.edu.ar](mailto:echeniq@criba.edu.ar)**

### **Introducción**

Los avances realizados en los últimos 15-20 años en el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas han permitido complementar y brindar interesantes alternativas a los programas de mejoramiento de plantas, integrando técnicas moleculares que posibilitarán el tratamiento de caracteres considerados difíciles y el desarrollo de plantas forrajeras “diseñadas” que mejorarán la producción animal.

Entre las herramientas que han contribuido a estos desarrollos se encuentran el cultivo de tejidos, la transformación de plantas, la hibridación somática, la producción de plantas transgénicas y los marcadores moleculares.

El desafío actual es estudiar la base de caracteres cuantitativos complejos, realizar selección asistida por marcadores moleculares, evaluar el potencial de la transferencia de genes, generar variabilidad genética y nuevo germoplasma elite e incorporar estos factores en programas de mejoramiento. La utilización de marcadores moleculares permitirá entender y capturar la heterosis, identificar QTL, desarrollar detallados mapas genéticos, introgresar variación genética de fuentes convencionales y transgénicas, realizar selección y determinar los factores involucrados en las interacciones genotipo ambiente (Woodfield y Brummer, 2000).

En el área de las plantas forrajeras nos encontramos en el comienzo de la era genómica, con gran cantidad de tecnologías disponibles para el descubrimiento de genes a gran escala y para el análisis de su expresión a nivel global, lo cual brinda la posibilidad de identificar, caracterizar y utilizar genes de valor para mejorar la producción de forrajes (Spangenberg *et al.*, 2000).

### **Los problemas**

Los campos de pastoreo son básicamente pantallas solares capaces de transformar la energía radiante en energía química. Las máximas eficiencias de fijación medidas oscilan entre 2-3% en ambientes templados y 5-6% en ambientes tropicales. En las extensiones forrajeras de Argentina sólo se fija el 1% o menos por falta de genotipos adaptados, existencia de patógenos, baja fertilidad de suelos o problemas ambientales que limitan el crecimiento de las plantas. Para tener valor comercial, la energía del forraje debe transformarse en

tejido animal, lo cual implica su cosecha, digestión y transformación en tejido animal.

Debido a estas ineficiencias, la producción animal sólo convierte en producto 1/1000 de la energía solar recibida (Deregibus, 1992)

### **En Sudamérica**

En sudamérica las pasturas naturales y cultivadas tienen una gran importancia económica abarcando una superficie aproximada de 460 millones de has. con una población ganadera constituida por aproximadamente 143 millones de bovinos, 65 millones de ovinos y un considerable número de caprinos y camélidos, los cuales se hallan en pastoreo permanente, fundamentalmente sobre pasturas naturales, sin suplementos adicionales de forrajes (Silva, 1990).

Las características edafoclimáticas de la región dan lugar a una variación muy importante en los sistemas de producción, donde las pasturas implantadas o mejoradas no constituyen un porcentaje sustancial. Como consecuencia la productividad de las explotaciones ganaderas en la región es muy baja, con una reducida eficiencia global del stock bovino (la producción de carne oscila entre 15 y 50 kg de carne en canal/cabeza vacuna).

Las principales limitantes a la producción animal en la región, para un total de 9 ecosistemas sudamericanos, fueron señaladas en el informe final de la Reunión del Programa Cooperativo de Investigación Agrícola del Cono Sur (PROCISUR) (1990) realizada en Brasil en 1988. Estas serían:

- Baja producción de las pasturas
- Marcada estacionalidad de la producción
- Escasa persistencia
- Baja eficiencia de establecimiento
- Alto porcentaje de enmalezamiento
- Reducido número de consociaciones de especies forrajeras
- Falta de complementariedad con el pastizal natural
- Falta de germoplasma adaptado a las necesidades, especialmente para zonas marginales
- Falta de calidad del forraje
- Falta de resistencia a estreses bióticos y abióticos
- Problemas relacionados con la fertilidad de los suelos, especialmente con fósforo o con toxicidad a aluminio
- Problemas de manejo
- Problemas de erosión del material genético de las pasturas naturales.

### **Posibles soluciones**

En esa misma reunión se recomendó la búsqueda, recolección y caracterización del germoplasma nativo, y el mejoramiento de especies y cultivares, entre otras soluciones a dichas problemáticas.

## En Argentina

La República Argentina está ubicada en la porción templada del Continente Americano. Cuenta con 270 millones de has. de secano, con grandes superficies inhabitadas frente a la alta densidad poblacional de otras zonas de igual latitud en el mundo. Dichas superficies están cubiertas principalmente por pastos, alguna presencia de árboles y, en menor medida, cultivos extensivos. Se estima que el 60% de la superficie del país corresponde a pastizales nativos y el 10% a agricultura forrajera, distribuidas en una gran diversidad de ambientes, y representan la única fuente de alimento para millones de herbívoros.

Debido a ello, deberían encontrarse soluciones para cada ambiente integrando la inversión en insumos (semillas, fertilizantes, tratamientos químicos, etc.), las modificaciones de manejo (momento y sistema de siembra, mezclas apropiadas, frecuencia e intensidad de pastoreo, etc.), con los nuevos logros de la genética vegetal.

Según datos del año 1999 la población bovina total de la Argentina es de 49.057.000 de cabezas, de la cual el 75 % se encuentra en la Región Pampeana (19% de la superficie del país). Existen además 13.198.000 de ovinos (1997) y 4.978.000 caprinos (1994).

Las especies cultivadas que ocupan la mayor superficie son: *Medicago sativa*, 4.569.129 has.; *Festuca arundinacea*, 3.242.193 has; *Trifolium repens*, 3.241.075 has.; *Avena* y *Bromus unioloides*, 2.596.903 has (INTA, 1984).

La producción de semilla fiscalizada de las especies cultivadas en la Argentina es de 12.383 ton. y de algunas de ellas existe amplia demanda según los datos de importación existentes (Tabla 1).

Tabla 1- Producción fiscalizada (campana 99-00), Importación-Exportación Argentina (1/7/99-30/6/00) y Precio (Feb. '01) de las principales semillas forrajeras para clima templado.

Especie	Argentina(1y2)	Mundo (2)	Importacion (3)	Exportacion (3)	Precio (4) U\$S/Kgr
	Toneladas	Toneladas	Toneladas	Toneladas	
<i>Bromus</i> spp	3.888	5.698		146	0.7 - 1.0
<i>Medicago sativa</i>	1.991	88.962	7.992	139	3.0 - 4.0
<i>Festuca arundinacea</i>	1.646	80.153	650		1.8-3.0
<i>Lolium perenne</i>	1.423	203.180	1.128		1,8
<i>Lolium multiflorum</i>	1.038	143.658	2.150		1,2
<i>Dactylis glomerata</i>	942	7.809	851		2
<i>Triticale</i> spp	540				0,2

<i>Trifolium repens</i>	443	7.954	484	3
<i>Hordeum spp</i>	154			0,2
<i>Phalaris aquatica</i>	139	139		3,7

(1) Se excluyen producciones menores a 100 toneladas

(2) International Seed Federation - ISF

(3) Instituto Nacional de Semilla - INASE

(4) Cámara Semilleristas Bolsa Cereales -CSBC

## Posibles soluciones

Con la ubicación adecuada de ciertas especies forrajeras y la mejora genética de cultivares se puede aumentar la eficiencia de captación de la energía radiante, de cosecha y de digestión del forraje producido. Esto implica una labor conjunta de técnicos, comercializadores, extensionistas y productores. En esta revisión nos referiremos fundamentalmente a los problemas relativo al mejoramiento de especies forrajeras, los logros por métodos tradicionales, el potencial del mejoramiento biotecnológico y la situación actual de la investigación biotecnológica en Sudamérica y la Argentina.

## Problemas y logros obtenidos en el mejoramiento convencional de especies forrajeras

En el pasado y aun hoy varias circunstancias han dificultado y dificultan el mejoramiento de especies forrajeras debido a:

### Problemas inherentes al material obtenido.

- El producto obtenido se comporta distinto según el sistema de producción secundaria (carne, lana, leche) en el cual se aplica, ya que los índices de conversión difieren.
- Las interacciones con el manejo del pastoreo dificultan otorgar un único valor al forraje en cuestión.
- Los objetivos de mejora en producción de forraje y de semilla se contraponen por su correlación negativa.
- La producción de semillas suele ser escasa y/o de baja viabilidad
- La falta de vigor en la germinación de algunas especies hace difícil el establecimiento.

## 2- Problemas reproductivos que afectan la fertilización y producción semillas

- Dificultad en la propagación y la conservación de la identidad de los genotipos, pues la mayoría de las forrajeras importantes son alógamas.
- Limitaciones en la autofecundación ya que muchas de las especies son autoincompatibles.
- Dificultad de hibridación artificial por tener órganos florales muy pequeños.
- Limitadas posibilidades de mejora por vía sexual al presentar muchas de ellas reproducción apomíctica.

### **3- Problemas relacionados con la evaluación de nuevos genotipos.**

- Los programas son mas costosos que para otros cultivos.
- La evaluación del material seleccionado se basa en plantas espaciadas o en surcos, no representativos de las densidades utilizadas por el productor.
- Las especies se siembran generalmente en mezclas, lo que resta valor a la evaluación individual de especies.
- Se requiere de varios años para evaluar la persistencia y productividad de los nuevos genotipos en especies perennes.

### **4- Problemas económicos y culturales.**

- El productor no siempre justifica invertir en semillas caras para cultivos considerados de bajos ingresos.
- Se dedican menos esfuerzos al mejoramiento de especies forrajeras en respuesta a una escasa demanda del mercado.
- En la actualidad, el control de la calidad de las semillas forrajeras es escaso.

### **5- Problemas relacionados con la conservación de germoplasma.**

- Se carece de grandes colecciones de tipos de plantas forrajeras en las cuales seleccionar materiales.
- El número de colecciones de germoplasma forrajero es insuficiente, como lo es el de las especies y entradas de las mismas, para hacer frente a la erosión genética y a la pérdida de biodiversidad.
- Se ignoran cuáles serán las necesidades de germoplasma para las próximas décadas.

En la actualidad existen 205 cvs. Argentinos de 53 especies de clima templado obtenidos por métodos convencionales, en estaciones experimentales del INTA, criaderos de universidades, estaciones experimentales provinciales y empresas privadas (Ex – INASE, Mayo 2001).

Con éstos cultivares se han logrado mejoras en la persistencia y crecimiento invernal en trébol blanco, adaptación a períodos de estrés cortos y largos en *Festuca*, mejora del valor nutritivo y palatabilidad en falaris, resistencia a sequía en festulolium, resistencia a frío en raigrás perenne, capacidad de resiembra en tréboles anuales, digestibilidad en *Panicum*, etc.

## **Germoplasma**

En la actualidad existen aproximadamente 189 colecciones de tamaño muy variable en 73 países, con un total de 383.770 entradas (datos de 1992) que representan 3.664 especies únicamente. Las más importantes son las del New Zealand Germoplasm Centre (46.461), el Vavilov Institute (25.378) y el Ciat (23.432).

En general hay 188.987 gramíneas, 167.335 leguminosas, 8.438 brows y 19.019 no conocidos.

Dentro de cada país hay especies que requieren un plan de conservación de germoplasma nativo.

En Argentina, el compromiso con la FAO incluía cebadilla criolla (*B. catharticus*) y agropiro criollo (*Agropyron elongatum*). También se recomendó preservar otras especies entre las que se indígenas. Especies que requieren un plan de conservación de germoplasma. Ciencia e citan *Axonopus affinis*, *Bromus auleticus*, *Bromus brevis*, *Centrosema virginianum*, etc (Covas,1978)

## **Biotecnología**

¿Qué lugar ocupan estas técnicas en especies de plantas forrajeras?

Existen fundamentalmente 2 campos de aplicación:

### **1- En la Conservación de Recursos Genéticos:**

- Crioconservación de materiales *in vitro*.
- Bancos de genes o genotecas.

### **2- En el Mejoramiento Genético.**

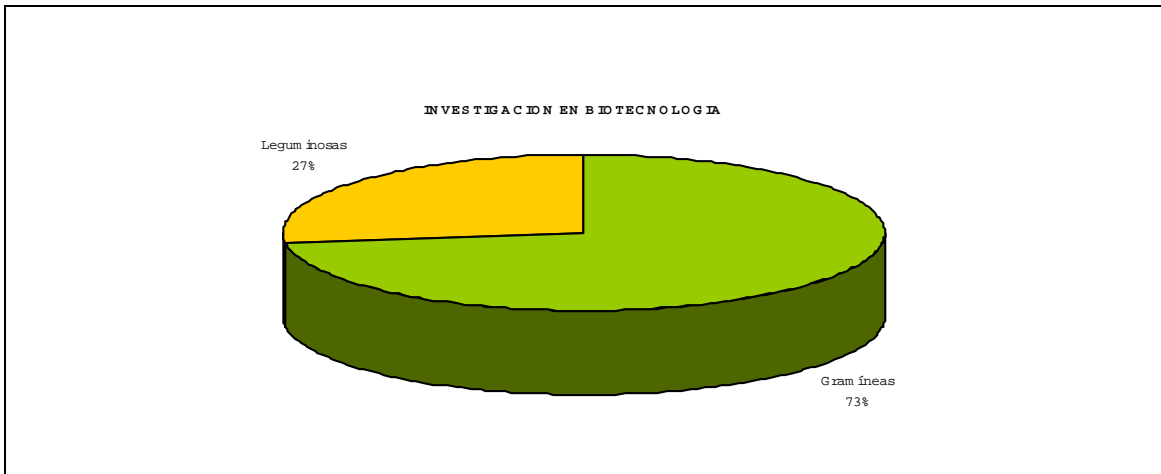
La primer pregunta que cabe hacerse es qué caracteres podrían modificarse por biotecnología en forrajeras. Volviendo a los puntos enunciados por PROCISUR podemos ver que muchos de ellos podrían tener soluciones biotecnológicas, ya que, entre los caracteres que se señalan como blanco para el mejoramiento molecular se mencionan el incremento de la calidad del forraje, de la persistencia, la resistencia a plagas y enfermedades, la tolerancia a estreses abióticos y la manipulación del crecimiento y desarrollo (Spangenberg *et al.*, 1998).

Entre las técnicas disponibles y que han sido utilizadas tradicionalmente se encuentran:

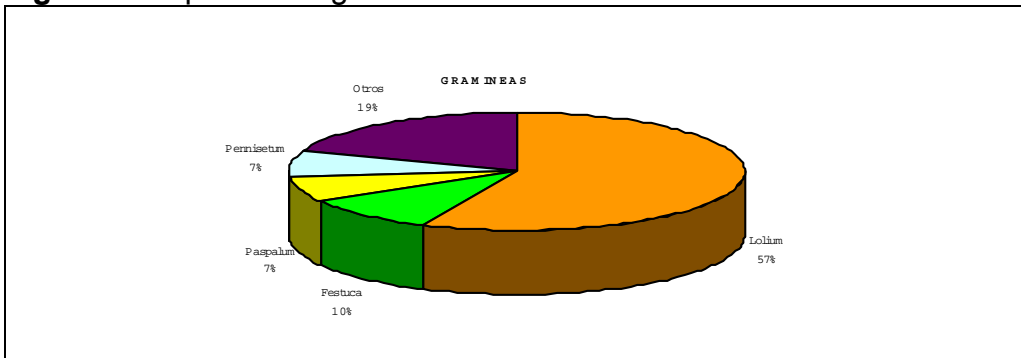
- Hibridación somática. Se encuentra limitada a especies que tengan buena capacidad de regeneración a partir de protoplastos. Se ha aplicado a *T. repens*, *T. alexandrinum*, *Medicago sativa*, *M. coerulea*, *M. glutinosa*, *M. falcata*, *Stylosanthes*, *Lotus* dentro de la leguminosas. En gramíneas ha sido más difícil de lograr pero existen varios ejemplos como *Poa pratensis*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea*. Es atractiva como técnica para transferir características citoplásmicas (esterilidad, vigor, aloplasmia).
- Rescate de embriones, en el caso de embriones híbridos que de otro modo abortarían.
- Variación somaclonal. No ha habido grandes logros. Sería una alternativa para especies apomícticas.
- Transformación: fundamentalmente para solucionar problemas de calidad, sanidad y resistencia a herbicidas.
- Obtención de doblehaploides: la haploidización es un medio para reducir el nivel de ploidía y realizar cruzamientos entre especies poliploides con especies relacionadas silvestres (alfalfa, pasto ovillo, festuca) o lograr homocigosis. No ha sido muy exitosa en especies forrajeras. Es altamente dependiente del genotipo y si bien se han realizado avances desde los primeros trabajos en que se informaban gran número de plantas albinas o escaso número de plantas verdes aún no se han logrado éxitos como para utilizarlas de manera eficiente en planes de mejoramiento como se ha hecho con el trigo por ejemplo.
- Propagación clonal: ha habido intentos de realizar semillas artificiales de alfalfa aprovechando la capacidad de producir embriones somáticos. También se ha logrado inducir embriogénesis somática en gramíneas forrajeras con relativa facilidad. Estos embriones somáticos son blancos apropiados para la transformación de plantas (Spangenberg *et al.*, 1998).

Las tendencias actuales en investigación biotecnológicas en forrajeras (Second International Symposium of Molecular Breeding of Forage Crops 2000 y IX Plant and Animal Genome Conference, Enero, 2001) se centran en los siguientes géneros y especies (Fig. 2): 73% en gramíneas (*Lolium* 60%) (Fig. 3) y 33% en leguminosas (*Trifolium* 45.5%, *Medicago*, 33.3% y *Lotus*, 21.2%) (Fig. 4).

**Figura 1.** Especies en las cuales se centra la investigación actual en biotecnología de forrajeras.

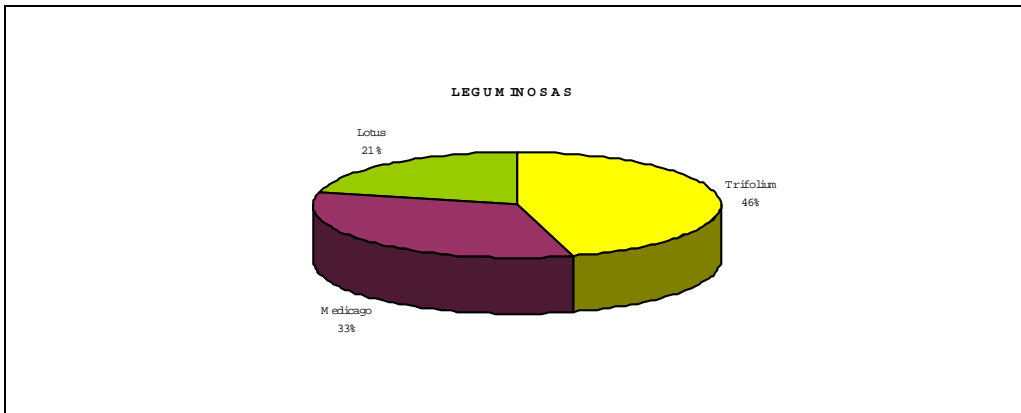


**Figura 2:** Especies de gramíneas estudiadas.



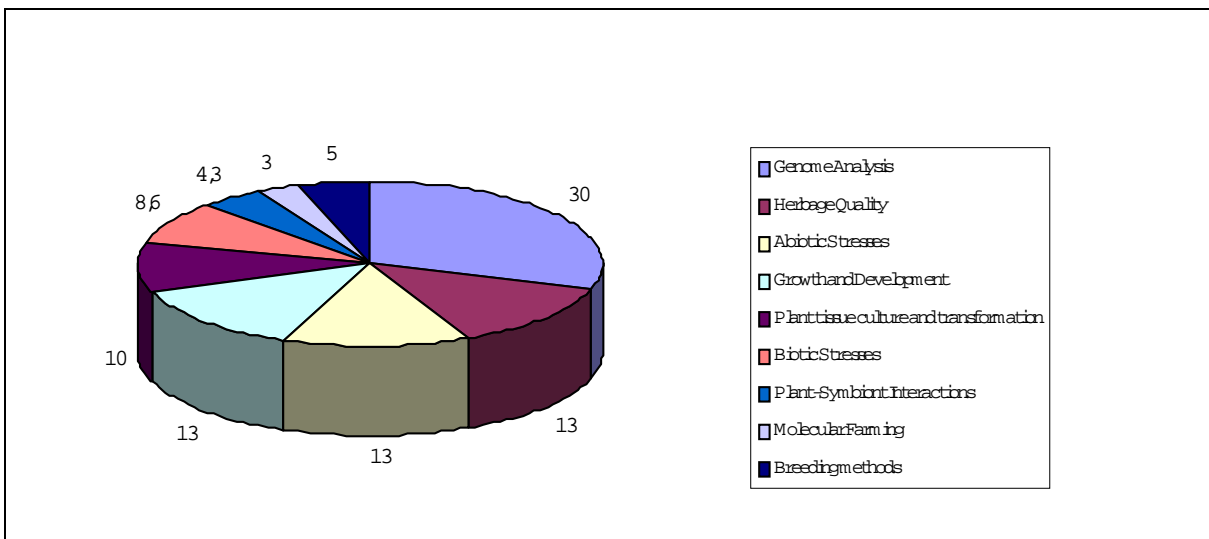
**Figura 3:** Especies de leguminosas estudiadas.





Los temas de investigación en biotecnología, según las referencias anteriores, se presentan en la Fig. 4.

**Figura 4.** Temas de investigación en biotecnología en especies forrajeras. Porcentajes en relación al número total de trabajos.



## Análisis temático

**1- Análisis Genómico:** Bajo esta denominación se incluyen aquellos trabajos de marcadores moleculares, mapeo, selección asistida por marcadores moleculares, DNA profiling, taxonomía molecular. El porcentaje asignado es una subestimación ya que muchos de los trabajos incluidos en otros rubros también utilizan marcadores moleculares. También se han incluido los trabajos en genomics, que consiste en realizar un análisis estructural y funcional del genoma utilizando metodologías a gran escala o de alto rendimiento (i.e. secuenciación del ADN a gran escala y tecnología de microarreglos (microarrays) combinado con bioinformática. Esto permitirá el descubrimiento a gran escala de genes y sus

funciones. En forrajeras estos estudios, con un enfoque preponderante en el descubrimiento de EST se llevan a cabo en dos leguminosas tipo: *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* (Cook *et al.*, 1997; Covitz *et al.*, 1998; Cook, 1999; Cook and Denarie, 2000).

Existen otros proyectos (Australia, Nueva Zelanda) que han generado aproximadamente 100.000 ESTs de forrajes clave para la agricultura de zonas templadas como raigrás perenne (*L. perenne*) y trébol blanco (*T. repens*) que representan distintos órganos, estados de desarrollo y tratamientos, muchas de las cuales se han clasificado funcionalmente (Spangenberg *et al.*, 2000a).

**2- Calidad del Forraje:** Las estrategias para mejorar la calidad del forraje mediante transgénesis estarían dirigidas a los subcaracteres involucrados como digestibilidad de la materia seca, contenido de carbohidratos solubles en agua, contenido de proteína, metabolitos secundarios, alcaloides, etc. Pueden incluir modificación del contenido y/o calidad de la lignina para incrementar la digestibilidad de la materia seca, manipulación del metabolismo de fructanos para incrementar el contenido de carbohidratos no estructurales, manipulación de la síntesis de taninos condensados para evitar problemas de meteorismo, y la expresión de proteínas 'rumen by-pass' para mejorar el aporte de proteínas y aminoácidos esenciales. Se incluyen trabajos de mapeo, por ejemplo en *Lolium perenne*, utilizando poblaciones que difieren en contenido de carbohidratos solubles y para otros componentes de la calidad del forraje como digestibilidad de la materia seca *in vitro*, fibra detergente neutro, proteína cruda. Encuentran marcadores RFLPs, AFLPs SSRs, RAPDs e isoenzimas asociados. En cuanto a lignina los trabajos se centran en el análisis de distintas enzimas involucrados en la biosíntesis de la misma a fin de regular su cantidad o calidad, como CAD, OMT, etc. mediante transgénesis.

**3- Estrés Abióticos:** Se trata de solucionar problemas de estrés ambientales, como sequía, temperaturas extremas, aluminio, deficiencias de fósforo. En la mayoría de los casos se trata de caracteres multigénicos, con entre 100-1000 genes involucrados. A medida que se logre una mejor comprensión de los mecanismos de tolerancia, la tecnología génica puede integrarse con las estrategias tradicionales de mejoramiento para localizar, secuenciar, clonar y mapear los genes responsables de las respuestas a estrés ambientales, con la esperanza de que en el futuro se pueda hacer selección asistida por marcadores moleculares para caracteres específicos e incrementar la tolerancia a estrés ambientales en las plantas forrajeras. Por ejemplo estudiando genes que confieren resistencia protoplasmática a la desecación en *Sporobolus stapfianus* que puede sobrevivir con menos del 5% del agua protoplasmática, reviviendo completamente 24 horas posthidratación (Neale *et al.*, 2000). Estos estudios permitirían estudiar la base de la resistencia a sequía y estos genes aislados podrían introducirse en especies cultivadas. Lo mismo podría hacerse con genes relacionados a otros estrés ambientales como frío por ejemplo. El nivel de expresión de algunos genes de proteínas de

choque térmico podrían ser indicadoras de la tolerancia a bajas temperaturas en plantas (Hisaoka y Shimamoto, 2000).

**1- Crecimiento y desarrollo:** incluye principalmente estudios de apomixis (56.25 %). En la Fig. 4 los trabajos de investigación en *Paspalum*, *Pennisetum* y varios de los géneros incluidos en otros están dedicados al mapeo de genes de apomixis. Barcaccia y Veronese (2001) han realizado esfuerzos en ensamblar un sistema funcional de producción apomíctica de semilla en alfalfa. Apomixis como un todo no se ha encontrado en el género *Medicago* pero se han documentado elementos de apomixis. El objetivo es obtener en el futuro variedades genéticamente uniformes. El clonado del gen (es) que controla la reproducción apomíctica en plantas ha recibido considerable atención en los últimos años. El uso más efectivo de la misma estaría en la producción comercial de cultivares híbridos que muestren heterosis o combinaciones heterogéneas de genes ventajosos.

Otros trabajos en este rubro se refieren a el control de la floración y de la senescencia. La disminución en el valor nutritivo de ciertas forrajeras está asociado con el desarrollo de tallos, la floración y la senescencia. El 31 % de los trabajos estuvieron dedicados a la manipulación de la floración. En general se busca regular negativamente la expresión de genes que determinan la iniciación del meristema floral como los ortólogos de *LEAFY* o *APETALA1* (Bowman *et al.*, 1993; Mandel y Yanofsky, 1995; Weigel y Nilsson, 1995). Otro blanco en forrajeras es el gen *INDETERMINATE1 (ID1)*, que juega un rol importante en el control del inicio de la floración en maíz (Colasanti *et al.*, 1998). La mutación de este gen es la única en monocotiledóneas que puede bloquear la transición del estado vegetativo al estado reproductivo e incrementar la producción de hojas. El evitar la floración también evitaría la presencia de alérgenos del polen (6.25% de los trabajos).

A fin de retardar la senescencia también por transgénesis (6,25%) se utiliza un promotor específico, el SAG12 de *Arabidopsis thaliana* que controla la expresión del gen de la isopentenyl transferasa (*ipt*) de *Agrobacterium tumefaciens*, involucrado en la biosíntesis de citocininas. De esta manera se retarda o impide la formación de cañas que disminuyen la calidad del forraje.

**5- Cultivo de Tejidos y Transformación.** Algunos trabajos se encuentran en etapa de poner a punto protocolos, como por ejemplo de cultivo de tejidos y/o transformación (*Zoysia japonica*, *Paspalum dilatatum*, *Paspalum notatum*, *Lolium multiflorum*, *Eragrostis*, *Thinopyron ponticum*, *Psathyrostachys juncea*, etc.) y evaluación de los materiales obtenidos por cultivo de tejidos vegetales (*Lolium perenne*, *Eragrostis*). Schrauf *et al.* (2000) informaron variación en plantas derivadas de raigrás perenne obtenidas a partir de suspensiones celulares. Parte de esta variación fue de origen epigenético pero algunos clones mostraron diferencias en altura de la planta, con una heredabilidad ( $h^2$ ) de 0.92. Polci (2000) también informó cambios en plantas de *Eragrostis curvula* obtenidas por cultivo *in vitro* de inflorescencias.

En la actualidad, la única especie de gramínea donde se ha liberado un cultivar obtenido a través de variación somaclonal es *Cynodon dactylon* cv Brazos R3, donde se logró incrementar la resistencia a la oruga militar (Croughan et al., 1994).

**6- Estréses Bióticos:** Las plagas y enfermedades pueden reducir considerablemente la calidad del forraje, su persistencia, valor nutritivo y palatabilidad (Reed, 1994). En los últimos años se han desarrollado estrategias para la obtención de plantas transgénicas que expresen resistencia a estos estrésés. Incluyen quitinasas, glucanasas, defensinas, fitoalexinas, proteínas inactivadoras de los ribosomas, proteínas de la cápside viral, replicasa viral, proteínas de movimiento viral, toxinas *Bt*, inhibidores de proteinasa y de  $\alpha$ -amilasa. Algunas de estas tecnologías se han aplicado a plantas forrajeras, fundamentalmente leguminosas (Hill et al., 1991; Voisey et al., 1994; 2000; Masoud et al., 1996; Strizhov et al., 1996; Garrett and Chu, 1997; Kalla et al., 2000a).

Entre los principales virus que afectan a las leguminosas se citan el del mosaico de la alfalfa alfamovirus (AMV), el del mosaico del trébol blanco, potexvirus (WCMV) y el virus del amarillamiento de las nervaduras de los tréboles, potyvirus (CYVV) (Guy et al., 1980; Garrett, 1991; Johnstone and Chu, 1993; Forster et al., 1997; Dudas et al., 1998).

Los insectos pueden reducir considerablemente la producción de materia seca en las pasturas (East and Pottinger, 1984). Entre las estrategias utilizadas por transgénesis se encuentran disponibles *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e inhibidores de proteinasa (PIs) (Burgess and Gatehouse, 1997).

**7- Interacciones Simbióticas:** En general se trata de estudios básicos que intentan esclarecer las interacciones planta-patógeno, leguminosa/bacterias fijadoras de nitrógeno, asociaciones leguminosa/micorriza y planta/endófito simbiosis, y utilizar estos estudios a fin de aplicar los conocimientos para desarrollar resistencia a patógenos y mejorar las asociaciones beneficiosas para la plantas forrajeras.

**8- Molecular Farming:** Se trata de aprovechar determinadas características de algunas plantas forrajeras, particularmente leguminosas, como son el hábito perenne de crecimiento, el potencial de producción de biomasa, la capacidad de fijar nitrógeno y la habilidad para crecer en áreas marginales para utilizarlas en la producción de ciertas biomoléculas. Las plantas transgénicas serían entonces una interesante alternativa frente a los sistemas microbianos para expresar proteínas recombinantes heterólogas (Goddijn and Pen, 1995). Estos bioreactores producirían enzimas industriales, vacunas, antibióticos, etc.

Se incluyeron tres trabajos, uno de ellos de la Universidad de Winsconsin donde produjeron plantas de alfalfa que expresan en hoja diferentes enzimas bacterianas

en condiciones de campo, en algunos casos en cantidades suficientes como para considerar el sistema eficiente (Austin-Phillips, 2000). Raskin (2000) menciona la posibilidad de utilizar las raíces como fuentes de producción de fármacos. El tercer trabajo, de la Universidad de Minnesota, obtuvieron plantas transgénicas de alfalfa que producen, a través de tres genes bacterianos, un polímero biodegradable, polihidroxibutirato (Purev *et al.*, 2000).

## **Situación actual de la investigación biotecnológica en Sudamérica y Argentina**

A fin de brindar un panorama del estado de la investigación en Biotecnología de Especies Forrajeras en Argentina y en general en Sudamérica nos remitimos a los abstracts de Reuniones anteriores de la REDBIO Argentina y Latinoamericana y de la comunicación con diferentes grupos de investigación en el tema.

En **REDBIO95** sobre un total de 332 trabajos solo 6 trataban sobre forrajeras y todos en cultivo de tejidos. En *Eragrostis curvula* (2), *Brachiaria* (1), *Setaria* (1), *Medicago* (1) y *Desmodium* (1).  
5 de Argentina y uno de Brasil.

**REDBIO98** sobre un número total de 621 trabajos nuevamente encontramos 6 en forrajeras y nuevamente, 3 en cultivo de tejidos: *Arachis pintoii*, *Panicum maximum*, *Vigna luteola*, uno donde duplican el número cromosómico de plantas de *Brachiaria* y estudian el modo reproductivo de las mismas. El quinto es de marcadores moleculares para identificación de especies de *Bromus* y el último de transformación: *Sorghum*. Trabajos presentados por Argentina, Cuba, Brasil y Chile.

En función de los trabajos presentados en REDBIO2001 podemos decir que los temas se han desplazado desde la puesta a punto de trabajos en cultivo de tejidos a marcadores moleculares y transformación de plantas. De 424 trabajos se presentaron 19 en especies forrajeras.

El análisis de las Actas de Congresos o Reuniones en Argentina o el conocimiento previo nos permitieron realizar la siguiente nómina de grupos y líneas de investigación en biotecnología de plantas forrajeras (en orden alfabético):

### **- Instituto de Botánica del Nordeste (y Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE)**

Responsable: Luis Mroginski.

Técnicas: Cultivo de Tejidos

Especies: *Paspalum*, *Desmodium*, *Arachis pintoii*

Responsable: Camilo Quarin.

Técnicas: Marcadores Moleculares en relación a la apomixis

Especies: *Paspalum notatum*.

En colaboración con la Facultad de Ciencias Agrarias y el Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario (Estela Valle, Juan Pablo Ortiz, Silvina Pessino) y CICV y A (Esteban Hopp).

#### **- INTA Castelar**

##### **Instituto de Biotecnología, CICV**

Responsable: Esteban Hopp.

Técnicas: Acumulación de fructanos.

Especies: *Bromus pictus*.

##### **Instituto de Genética “Ewald A. Favret”**

Responsables: Pascual Franzone y Raúl D. Rios.

Técnicas: Transformación

Especies: Alfalfa.

#### **- Departamento de Agronomía (Universidad Nacional del Sur)**

Responsable: Viviana Echenique.

Técnicas: Cultivo de tejidos, variación somaclonal, transformación.

Especies: *Eragrostis curvula*.

#### **- Facultad de Agronomía (Universidad de Buenos Aires)**

Responsable: Gustavo Schrauf.

Técnicas: Variación somaclonal, transformación.

Especies: *Lolium perenne*, *Paspalum dilatatum* y *notatum*.

#### **- Universidad Nacional de San Luis.**

Responsable: E. Jorquera y P. Verdes.

Técnicas: Cultivo in vitro

Especies: Especies nativas entre las que se encuentran *Trichloris crinita* (pasto hoja) y *Schizachyrium plumigerum* (pasto escoba).

En función del panorama descrito, es de esperar que en los próximos años el número de nuevos genotipos en especies forrajeras se incremente sustancialmente como producto de la complementación del mejoramiento tradicional y biotecnología, y que estas reuniones sirvan para fomentar la cooperación entre los diferentes grupos a fin de encarar proyectos conjuntos que permitan solucionar problemas de interés común.

#### **Bibliografía**

- AUSTIN-PHILLIPS S. AND ZIEGELHOFFER T. (2000) The production of value-added proteins in transgenic alfalfa. In: Spangenberg G. (ed.) *Molecular breeding of forage crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. Chapter 18 (*in press*).
- BOWMAN J.L., ALVAREZ J., WEIGEL D., MEYEROWITZ E.M. AND SMYTH D.R. (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* 119, 721-743.
- BURGESS E.P.J. AND GATEHOUSE A.M.R. (1997) Engineering for insect pest resistance. In: McKersie B.D. and Brown D.C.W. (eds.) *Biotechnology and the improvement of forage legumes*. *Biotechnology in Agriculture Series, No. 17*. CAB International, New York, 1997. pp 229-258.
- COLASANTI J., YUAN Z. AND SUNDARESAN V. (1998) The *indeterminate* gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell*, 93, 593-603.
- COOK D.R. (1999) *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 301-304.
- COOK D.R. AND DENARIE J. (2000) Progress in the genomics of *Medicago truncatula* and the impact for grain legume crops. *Grain Legumes Magazine (in press)*.
- COOK D.R., VANDENBOSCH A., DE BRUIJN F. AND HUGUET T. (1997) Model legumes get the nod. *Plant Cell*, 9, 275-281.
- COVAS, G. (1978) Forrajas Investigaci3n, 34:209-213
- COVITZ P., SMITH L.S. AND LONG S.R. (1998) Expressed sequence tags from a root hair enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiology* 117, 1325-1332.
- CROUGHAN, S.S.; QUISENBERRY, S.S.; EICHHORN, M.M.; COLYER, P.D. AND BROWN, T.F. (1994) Registration of Brazos-R3 bermudagrass germplasm. *Crop Sci.* 34: 542.
- DUDAS B., WOODFIELD D.R., TONG P.M., NICHOLLS M.F., COUSINS G.R., BURGESS R., WHITE D.W.R., BECK D.L., LOUGH T.J. AND FORSTER R.L.S. (1998) Estimating the agronomic impact of white clover mosaic virus on white clover performance in the North Island of New Zealand. *New Zealand J. Agr. Res.* 41, 171-178.
- EAST R. AND POTTINGER R.P. (1984) The cost of pasture pests. *New Zealand Agricultural Science*, 18, 136-140.
- FORSTER R.L.S., BECK D.L. AND LOUGH T.J. (1997) Engineering for resistance to virus diseases. In: McKersie B.D. and Brown D.C.W. (eds.) *Biotechnology and the improvement of forage legumes*. *Biotechnology in Agriculture Series, No. 17*. CAB International, New York, 1997. pp 291-315.
- GARRETT R.G. (1991) Impact of viruses on pasture legume productivity. In: *Proceedings of Department of Agriculture Victoria White Clover Conference, 1991*. pp 50-57.
- GARRETT R.G. AND CHU P.W.G. (1997) White clover expressing the coat protein of alfalfa mosaic virus: field trial issues. In: McLean G.D., Waterhouse P.M., Evans G. and Gibbs M.J. (eds.) *Commercialisation of transgenic crops*:

- risks, benefit and trade considerations. Australian Government Publishing Service, Canberra. pp 125-136.*
- GODDIJN O.J.M. AND PEN J. (1995) Plants as bioreactors. *TIBTECH*, 13, 379-387.
- GUY P.L., GIBBS A.J. AND HARROWER K. (1980) The effect of white clover mosaic virus on nodulation of white clover (*Trifolium repens* L. cv. Ladino). *Aust. J. Agric. Res.* 31, 307-311.
- HILL K.K., JARVIS-EAGAN N., HALK E.L., KRAHN K.J., LIAO L.W., MATHEWSON R.S., MERLO D.J., NELSON S.E., RASHKA K.E. AND LOESCH-FRIES L.S. (1991) The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *Bio/Technology*, 9, 373-377.
- HISAOKA Y AND SHIMAMOTO Y. 2000. Difference in gene expression of heat shock protein for hardening among perennial ryegrass cultivars with differing freezing tolerance. Book of Abstracts Molecular Breeding of Forage Crops - Second International Symposium, Victoria, Australia
- JOHNSTONE G.R. AND CHU P.W.G. (1993) Viral diseases of white clover. In: Mason W. (ed.) *White clover. A key to increase milk yields. 1993.* pp 83-86.
- KALLA R., CHU P. AND SPANGENBERG G. (2000a) Molecular breeding of forage legumes for virus resistance. In: Spangenberg G. (ed.) *Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.* Chapter 13 (in press).
- MANDEL M.A. AND YANOFSKY M.F. (1995) A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, 377, 522-524.
- MASOUD, S.A., ZHU Q., LAMB C. AND DIXON R.A. (1996) Constitutive expression of an inducible  $\beta$ -1,3-glucanase in alfalfa reduces disease severity caused by the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*, but does not reduce disease severity of chitin-containing fungi. *Transgenic Research*, 5, 313-323.
- NEALE A, BLOMSTEDT C, LE T, BRONSON P, GAFF D AND HAMILL J. 2000. Molecular control of extreme drought tolerance in the resurrection grass *Sporobolus stapfianus*. Book of Abstracts Molecular Breeding of Forage Crops - Second International Symposium, Victoria, Australia
- POLCI, P.A. (2000) Cultivo de tejidos para la obtención de variantes somaclonales de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (schrad.) nees. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Sur. 151 pp.
- PUREV S, SOMERS D AND SAMAC D. 2000. Synthesis of biodegradable plastics in alfalfa plants. Book of Abstracts Molecular Breeding of Forage Crops - Second International Symposium, Victoria, Australia
- RASKIN I. 2000. Use of plants for biochemical manufacturing of pharmaceuticals, specialty chemicals and recombinants proteins. Book of Abstracts Molecular Breeding of Forage Crops - Second International Symposium, Victoria, Australia
- SCHRAUF G, PADILLA J, CORNAGLIA P, BARTOLONI N, WANG Z AND SPANGENBERG G. 2000. Field performance of cell suspension-derived perennial ryegrass regenerants and their half-sib progenies. Book of



- Abstracts Molecular Breeding of Forage Crops - Second International Symposium, Victoria, Australia
- SPANGENBERG G., BAERA K., BARTKOWSKI A., HUXLEY H., LIDGETT A., LYNCH D., MCINNES R. AND NAGEL J. (2000b) The manipulation of lignin biosynthesis in pasture grasses. *Abstracts 2<sup>nd</sup> International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria, 2000.* p 41.
- SPANGENBERG G., KALLA R., LIDGETT A., SAWBRIDGE T., ONG, E.K. AND JOHN U. (2000a) Breeding forage plants in the genome era. In: Spangenberg G. (ed.) *Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.* Chapter 1 (*in press*).
- SPANGENBERG, G.; WANG, Z.-Y.; POTRYKUS, I. (1998) Biotechnology in Forage and Turf Grass Improvement. Monographs on Theor. Appl. Genet. 23.
- STRIZHOV N., KELLER M., MATHUR J., KONCZKALMAN Z., BOSCH D., PRUDOVSKY E., SCHELL J., SNEH B., KONCZ C. AND ZILBERSTEIN A. (1996) A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 15012-15017.
- VOISEY C.R., DUDAS B., BIGGS R., BURGESS E.P.J., WIGLEY P.J., MCGREGOR P.G., LOUGH T.J., BECK D.L., FORSTER R.L.S. AND WHITE D.W.R. (2000) Transgenic pest and disease resistant white clover plants. In: Spangenberg G. (ed.) *Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.* Chapter 14 (*in press*).
- VOISEY C.R., WHITE D.W.R., WIGLEY P.J., CHILCOTT C.N., MCGREGOR P.G. AND WOODFIELD D.R. (1994) Release of transgenic white clover plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes - an ecological perspective. *Biocontrol Sci. Technol.*, 4, 475-481.
- WEIGEL D. AND NILSSON O. (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, 377, 495-500.
- WOODFIELD D AND BRUMMER C. 2000. Integrating molecular techniques to maximise the genetic potential of forage legumes. Book of Abstracts Molecular Breeding of Forage Crops - Second International Symposium, Victoria, Australia