



---

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

***CAMPUS* MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**ANATOMÍA, DEPOSICIÓN DE LIGNINA Y  
CULTIVO DE TEJIDOS EN ECOTIPOS DE  
*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.**

**ÁLVARO BERNAL FLORES**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE :

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2015**

---

La presente tesis titulada: Anatomía, Deposición de Lignina y Cultivo de Tejidos en Ecotipos de *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., realizada por el alumno: Álvaro Bernal Flores, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

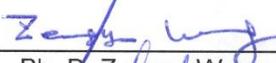
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

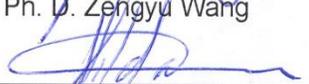
CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
Ph. D. Adrián Raymundo Quero Carrillo

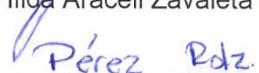
ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Ph. D. Zengyu Wang

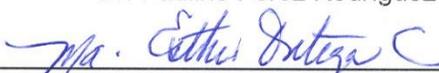
ASESORA

  
\_\_\_\_\_  
Ph. D. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

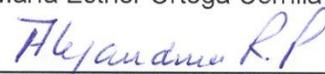
ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Paulino Pérez Rodríguez

ASESORA

  
\_\_\_\_\_  
Ph. D. María Esther Ortega Cerrilla

ASESORA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Aléjandrina Robledo Paz

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo del 2015

# **ANATOMÍA, DEPOSICIÓN DE LIGNINA Y CULTIVO DE TEJIDOS EN ECOTIPOS DE *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.**

**Álvaro Bernal Flores, Dr.**

**Colegio de Postgraduados, 2015**

Pasto banderita *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., es una gramínea perene de gran importancia en la alimentación de herbívoros en zonas áridas y semiáridas del Norte de México; por su resistencia al pastoreo, tolerancia a sequía y salinidad, ha sido una especie forrajera de gran utilidad en pastoreo extensivo. México es centro de origen de esta especie, cuenta con gran diversidad genética y constituye una fuente genética importante para el mejoramiento de ésta a futuro. Ecotipos sobresalientes identificados a partir de la anatomía foliar, mediante preparaciones histoquímicas y analizados mediante análisis de imágenes fueron estudiados a tres diferentes edades (20,45 y 65 días). Así mismo, el estudio de la deposición de lignina fue una variable importante para la identificación de los ecotipos sobresalientes. Un análisis mediante Componentes Principales en los treinta ecotipos estudiados, mostró que el ecotipo e-16 fue sobresaliente en las mejores áreas de tejidos, mostrando un contenido moderado de lignina en la hoja, la proporción de tejido digestible (mesófilo y floema) fue comparativamente mayor que el 50% de los ecotipos estudiados. Un sistema de cultivo de tejidos fue realizado en el ecotipo e-303 por ser el de mayor rendimiento mostrado en campo. Cariópsides usados como explantes, dieron origen a diferentes tipos de callo en *B. curtipendula*, obteniéndose siete diferentes tipos. Por su condición apomíctica recalcitrante en ésta especie, se realizó una estrategia de regeneración basada en el uso de sorbitol en el medio de cultivo para crear estrés osmótico y estimular embriogénesis somática. El uso de medios con 2,4-ácido diclorofenoacético ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), 6-benciladenina ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y sorbitol, propició las condiciones adecuadas para obtener embriones somáticos. Callos altamente embriogénicos fueron colocados en diferente medio de regeneración con diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento. El mayor porcentaje de plantas regeneradas (14%) se

obtuvieron en medio suplementado con cinetina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido naftalenacético ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ácido giberélico ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Plantas normales regeneradas a partir de embriones somáticos fueron obtenidas y, con ello se estableció el primer protocolo de regeneración *in vitro* de esta especie, sentando las bases para el mejoramiento genético mediante técnicas biotecnológicas.

**Palabras clave:** Pasto banderita, histología, lignina, embriogénesis somática, análisis de imágenes, sideoats grama.

## ANATOMY, LIGNIN DEPOSITION AND TISSUE CULTURE IN ECOTYPES OF *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.

Álvaro Bernal Flores, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015

Sideoat grama *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., is a native to México perennial summer bunch grass very important for grazing production within the arid and semi-arid lands of Mexico. Due to its drought conditions resistance it has been very valuable for extensive grazing production. Genetic diversity for this species is a good asset and important for future plant breeding programs. Outstanding sideoats grama ecotypes were identified through foliar structural anatomy evaluations using histology preparations and analyzed through image analysis based on three different leaf sprouting ages (20, 45, and 65 days). Lignin deposition was included as importance character to identify valuable plant materials. Principal Component Analysis showed that the ecotype 16 (e-16) was the most outstanding ( $P < 0.05$ ) with a conservative foliar lignin concentration and high (upper than 50% of the evaluated ecotypes) mesophile and phloem content. Also a plant tissue culture methodology was developed for ecotype 303 (e-303) due to its higher forage production under field conditions (Adrián R. Quero C, personal comm.). Caryopsis explants resulted on seven different *callus* type in *B. curtipendula*. Due to obligate apomictic reproductive system within this species, plant regeneration from callus was based on osmotic stress through sorbitol addition on the culture media in order to stimulate somatic embryogenesis. The use of culture media including 2,4-D ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), 6-benzyladenine ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ), and sorbitol, resulted on precise conditions to achieve somatic embryos. Highly embryogenic *calli* were placed under different plant regeneration media with several levels and plant growth regulators. The higher level of regenerated plants (14%) were achieved adding to the media kinetin ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), NAA ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ), and  $\text{GA}_3$  ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Normal *B. curtipendula* plants regenerated of from somatic embryogenesis and hence the first plant regeneration from *calli* protocol for this species was established for procedures based on tissue culture.

**Key words:** Sideoats grama, histology, somatic embryogenesis, image analysis.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado durante mis estudios doctorales.

Con gran orgullo al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de formar parte de su privilegiada comunidad estudiantil.

A mi consejo particular, por su apoyo, comentarios y por compartir sus conocimientos y plasmarlos en cada uno de los escritos que conforman ésta pequeña obra del conocimiento.

Al Dr. Adrián R. Quero C., al cual no tengo palabras para demostrarle mi agradecimiento por todo el apoyo incondicional que me brindó durante este periodo. ¡Muchas gracias Doctor!.

A The Samuel Roberts Noble Foundation, por las facilidades otorgadas y el apoyo incondicional en la realización de mi estancia de investigación sobre, cultivo de tejidos y transformación genética en *B. curtpendula*, en el área de Forage Improvement Division.

To The Samuel Roberts Noble Foundation, for open it its doors and expertise for the realization of this research. Especially to PhD Zengyu Wang and PhD Chunxiang Fu, for the opportunity of be part of their research team and sharing with me their abilities and facilities. To them ¡Thank you very much!.

A la empresa AGRIBEST por su participación en el tiraje de esta tesis para mi graduación, mediante el apoyo del proyecto CONACYT No. 217595 “Desarrollo de un prototipo a base de micro y nano encapsulados de un producto para la nutrición y protección de cultivos agrícolas”.

A mis amigos y compañeros, por su amistad y palabras de aliento en momentos difíciles.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

### **A mi esposa**

Con todo mi amor y cariño a mi compañera inseparable, Laura Patricia Aguilar Rodríguez, por formar parte en esta travesía del conocimiento y que sin percatarse, ha caminado a mi lado en los senderos de la ciencia y de la investigación, compartiendo conmigo los momentos más importantes en este viaje del conocimiento.

### **A mis hijos**

Alex Daniel, Ignacio, Héctor Gabriel y Emily Vanessa, porque ustedes han forjado un sentir diferente de lucha en el día a día, un impulso, motivación y ganas de superación que trasciende en mí ser y me estimula a ser mejor profesionalista. ¡Los amo!.

### **A mi familia**

En especial a mis padres Luisa Flores G y Amado Bernal B, a mis hermanos Maricruz, José Alberto, Rosa Elena y Amado, por todo lo que representan en mi vida y que sin darse cuenta los he llevado conmigo por doquier, en el emprendimiento de este largo camino de formación.

**CONTENIDO**

	<b>pág.</b>
<b>RESUMEN GENERAL</b>	<i>iii</i>
<b>GENERAL ABSTRACT</b>	<i>v</i>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<i>vi</i>
<b>DEDICATORIA</b>	<i>vii</i>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<i>xii</i>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<i>xiv</i>
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1.    PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2.    OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Particulares	3
3.    HIPÓTESIS	4
3.1. Hipótesis General	4
3.2. Hipótesis Particulares	4
4.    REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. Botánica y Estructura	5
4.1.1. Botánica y distribución de pasto banderita	5
4.1.2. Apomixis en gramíneas	6
4.1.3. Fotosíntesis y estructura anatómica C <sub>4</sub>	7
4.1.4. Importancia de la anatomía foliar y la digestibilidad	9
4.1.5. Importancia del mesófilo en el aporte nutricional de los forrajes	10
4.1.6. Lignina: pruebas histológicas, biosíntesis y su papel en la digestibilidad de plantas forrajeras	12
4.1.7. Análisis de imágenes	14
4.2. Cultivo de Tejidos	15

	<b>pág.</b>
4.2.1. Cultivo de tejidos y regeneración de plantas en pastos apomícticos	15
4.2.2. Embriogénesis somática	18
4.2.3. Tipos de callo inducidos en gramíneas	20
4.2.4. Auxinas y citocininas en la morfogénesis	22
4.2.5. Estrés osmótico en la embriogénesis somática	24
4.2.6. Totipotencia y recalcitrancia celular	26
5. LITERATURA CITADA	29
<b>CAPÍTULO I: TIPOS DE TEJIDO Y CONTENIDO DE LIGNINA EN GENOTIPOS DE <i>Bouteloua curtipendula</i> (MICHX.) TORR., RELACIONADOS CON SU DIGESTIBILIDAD.</b>	
RESUMEN	41
ABSTRACT	43
1. INTRODUCCIÓN	44
2. MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1. Procesamiento de Muestras	47
2.1.1. Material vegetal	47
2.1.2. Tinción	48
2.1.3. Microscopia y análisis de imágenes	48
2.1.4. Análisis estadístico	49
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4. CONCLUSIONES	65
5. LITERATURA CITADA	66

**CAPÍTULO II: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDUCIDA BAJO ESTRÉS OSMÓTICO EN *Bouteloua curtipendula* (MICHX.) TORR., RECALCITRANTE APOMÍCTICO.**

	<b>pág.</b>
RESUMEN	71
ABSTRACT	72
1. INTRODUCCIÓN	73
2. MATERIALES Y MÉTODOS	74
2.1. Desinfestación de Semilla	74
2.2. Inducción de Callos Embriogénicos	75
2.3. Regeneración de Plantas	75
2.4. Estudio Histológico	76
2.5. Diseño Experimental y Análisis Estadístico	77
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
3.1. Inducción de Callos	78
3.2. Regeneración de Plantas	78
3.3. Estudio Histológico	84
4. CONCLUSIONES	87
5. LITERATURA CITADA	88

**CHAPTER III: TISSUE CULTURE AND CITOKININS PRETREATMENT ON SIDEOATS GRAMA (*Bouteloua curtipendula* (MICHX.) TORR.) FOR INCREASING PLANT REGENERATION LEVELS.**

1. ABSTRACT	92
2. INTRODUCTION	94
3. MATERIALS AND METHODS	95
3.1. <i>Callus</i> Induction and Pretreatments	95
3.2. Plant Regeneration	96
3.3. Greenhouse	97
3.4. Statistical Analysis	97

	<b>pág.</b>
4. RESULTS	98
4.1. <i>Calli</i> induction and Growth Rate	98
4.2. Pretreatment and Plant Regeneration	102
4.3. Other Sideoats Grama Cultivars	104
5. DISCUSSION	105
6. CONCLUSIONS	108
7. REFERENCES	109
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>113</b>

---

**ÍNDICE DE CUADROS****CAPÍTULO I**

- Cuadro 1.** Determinación de áreas para tipos de tejido que conforman la hoja de *B. curtipendula*, con base en su digestibilidad. **pág. 53**
- Cuadro 2.** Áreas promedio de tejidos altamente digestibles en 30 ecotipos de *Bouteloua curtipendula*. **54**
- Cuadro 3.** Áreas promedio en tejidos de baja digestibilidad, en 30 ecotipos de *Bouteloua curtipendula*. **56**
- Cuadro 4.** Áreas promedio para tejidos no digestibles correspondientes a 30 genotipos de *Bouteloua curtipendula*. **58**
- Cuadro 5.** Contenido relativo de lignina a edad de 20, 45 y 65 días de rebrote en 30 ecotipos de *B. curtipendula*. **63**

**CAPÍTULO II**

- Cuadro 1.** Medios de inducción y regeneración usados en la embriogénesis somática de *Bouteloua curtipendula*. **76**
- Cuadro 2.** Características de los callos formados a partir de cariósides de *Bouteloua curtipendula*, cultivados en diferentes medios de inducción. **79**
- Cuadro 3.** Respuesta de los callos obtenidos a partir de cariósides de *Bouteloua curtipendula*, después de ser cultivados en cuatro medios de regeneración. **82**
- Cuadro 4.** Regeneración de plántulas y eficiencia de conversión a partir de callos embriogénicos de *Bouteloua curtipendula* obtenidos en el medio de inducción MI-14, cultivados en diferentes medios de regeneración. **83**

**CHAPTER III**

- Table 1** Comparison among treatments with reference to the treatment M2 for Maximum Likelihood estimates, using Logistic Regression procedure for variable calli induction. **99**

**Table 2** Calli induction frequency from Sideoats grama cv El Reno caryopses under three 2,4-dichlorofenoxyacetic acid (2,4-D) levels. **pág. 100**

**Table 3** Sideoats grama cv El Reno growth rates for testing effect treatment time effect and interaction time x treatment using a mixed model. **101**

**Table 4** Seedling regeneration for callus pretreated using three cytokinins 2,4-D levels in Sideoats grama cv. El Reno. **103**

**Table 5** Calli induction, pretreatment and plant regeneration in Haskell and Vaughn cultivars, supplemented with three levels of 2,4-D and BAP. **105**

---

**ÍNDICE DE FIGURAS****CAPÍTULO I**

- Figura 1.** Corte transversal de hoja en *Bouteloua curtipendula*. **pág. 49**
- Figura 2.** Componentes Principales (PC1 y PC2) para descriptores de composición de hoja entre ecotipos de *Bouteloua curtipendula*, mediante análisis multivariado. **51**
- Figura 3.** Explicación de la variabilidad total, en hoja de ecotipos en *Bouteloua curtipendula* usando un análisis multivariado. **52**
- Figura 4.** Proporción promedio de tejidos en hoja de *Bouteloua curtipendula* con base en su digestibilidad **60**
- Figura 5.** Relación mesófilo/vaina del haz (M/VH) entre genotipos de *Bouteloua curtipendula*. **61**
- Figura 6.** Corte transversal de la hoja del ecotipo e-04 y e-45 de *B. curtipendula* en los que puede compararse la deposición de lignina a los 65 días de rebrote. **62**

**CAPÍTULO II**

- Figura 1.** Callo obtenidos a partir de cariósides maduros de un ecotipo apomictico de *Bouteloua curtipendula* cultivados en diferentes medios de inducción de embriogénesis somática. **80**
- Figura 2.** Morfogénesis a partir de callos de *Bouteloua curtipendula* cultivados en los medios que contenían sorbitol. **81**
- Figura 3.** Embriogénesis somática en *Bouteloua curtipendula* inducida bajo estrés osmótico. **85**
- Figura 4.** Embriogénesis somática a partir de cariósides maduros de *Bouteloua curtipendula*. **86**

**CHAPTER III**

- Figure 1** Steps involved for tissue culture and plant regeneration for Sideoats grama. **96**

**Figure 2** Characteristic callus phenotype of Sideoats grama developed during the induction process. **pág. 100**

**Figure 3** Rates of growth at different levels of 2,4-D for evaluated sideoats grama cv El Reno calli during 100 days. **101**

**Figure 4** Sideoats grama cv. El Reno, pretreatments calli using three different media. **103**

**Figure 5** *Calli* regeneration of Sideoats grama cv. El Reno from mature caryopses. **104**

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es considerado centro de origen genético del pasto banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., con amplia diversidad de morfotipos y citotipos (Quero *et al.*, 2003), encontrándose especies diploides ( $2n=20$ ), tetraploides ( $2n=40$ ) y algunas aneuploides (Gould, 1979). Su importancia como fuente de forraje para animales domésticos, silvestres y su tolerancia al pastoreo, salinidad y resistencia a sequía, la han hecho una especie de gran valor, para el pastoreo de zonas áridas y semiáridas del Norte de México (González *et al.*, 2010). Es una especie con amplia distribución y adaptación (Freter y Brown, 1975), considerada una forrajera clave de los pastizales del norte y de gran importancia en la repoblación de zonas erosionadas (USDA, 2011). Su condición apomíctica ofrece amplias ventajas para el mejoramiento de la especie, debido a que la apomixis permite la fijación inmediata de algún genotipo deseable y éste procedimiento no es caro (Van Dijk y Van Dame, 2000).

Con la finalidad de obtener atributos forrajeros importantes, se empleó el uso de técnicas histológicas y análisis de imágenes. Las herramientas histoquímicas ofrecen grandes ventajas, para determinar la conformación anatómica de los genotipos. Con base en cortes transversales de hoja y análisis de imágenes para la determinación de especies sobresalientes en leñosas (Sokupová *et al.*, 2001). El empleo de estudios histológicos mediante análisis de imágenes, también permite determinar con gran detalle y precisión la deposición de lignina en los tejidos de hoja, similar a lo reportado por Sokupová y Albrechtová (2003) para *Picea abies*. Altas correlaciones han sido reportadas entre el resultado calculado mediante imágenes y la cuantificación química de lignina en la planta (Kuhbauch y Bestajovsky, 1985). Los estudios histológicos también son empleado para obtener información sobre el comportamiento de producción en especies cultivadas, dado que existe una estrecha correlación entre las dimensiones anatómicas y el potencial productivo de las especies y esto se ha documentado en arroz (Takai *et al.*, 2013) y *Lolium perenne* (Wilson y Cooper, 1970).

Diferencias anatómicas entre especies forrajeras, han mostrado variación en la digestibilidad de tallos y hojas, entre las más importantes se encuentra el contenido de lignina en la planta (Akin, 1989; Wilson, 1993; Buxton y Redfearn, 1997). Esta correlación ha sido ampliamente estudiada en varias especies forrajeras (Akin, 1989; Akin y Burdick, 1981; Akin *et al.*, 1983). Las características anatómicas entre especies o genotipos, determina las cualidades forrajeras de una especie, la cuales pueden estar relacionadas con la digestibilidad (lignina; Akin, 1989; Wilson, 1993; Buxton y Redfearn, 1997), comportamiento productivo (proporción de mesófilo en la hoja; Hattersley y Watson, 1976) o habilidad de adaptación, entre las que destacan; estructura foliar, densidad de haces vasculares (Maiti y Rodríguez, 2010) y densidad estomatal (Xu y Zhou, 2008).

La variabilidad genética intraespecífica es esencial en programas de mejoramiento genético. Esta riqueza genética que ofrece nuestro país es crucial y debe ser aprovechada para el mejoramiento de *B. curtipendula*. Actualmente, herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos y la ingeniería genética ofrecen la posibilidad de mejorar diversas especies, incluyendo cultivos forrajeros. El cultivo de tejidos ha sido reportado en especies como; *Brachiaria brizantha* (Lenis-Manzano, 1998; Alves *et al.*, 2014), *Poa pratensis* (Hu *et al.*, 2006), pasto Kentucky (Stephens *et al.*, 2006), *B. ruziziensis* (Ishigaki *et al.*, 2009), pasto bahía (*Paspalum notatum*) (Grando *et al.*, 2002), Pasto bufel (*Cenchrus ciliaris*) (Carloni *et al.*, 2014), *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* (Cao *et al.*, 2006), entre otros.

El mejoramiento de forrajes es de gran importancia en la sustentabilidad de los sistemas ganaderos y de las industrias cárnicas y lácteas; por ello la producción y calidad forrajera representa un factor importante para éstas, así como para coadyuvar el suministro de satisfactores para la población. Por lo anterior, el objetivo de ésta investigación fue identificar ecotipos sobresalientes con potencial forrajero, con base en sus características anatómicas y deposición de lignina y desarrollar un protocolo de regeneración *in vitro* que sirvan como base a futuros trabajos de mejoramiento genético en esta especie.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Identificar y seleccionar ecotipos sobresalientes mediante anatomía foliar en *B. curtipendula* (Michx.) Torr., con base en herramientas histoquímicas y análisis de imágenes y desarrollar un protocolo de regeneración mediante cultivo de tejidos en el ecotipo seleccionado.

### 2.2. Objetivos Particulares

1. Identificar de treinta ecotipos, los tipos sobresalientes por su calidad forrajera, mediante la caracterización de la anatomía foliar de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.) y el uso de análisis de imágenes para la medición de tejidos relacionados con su digestibilidad.
2. Estudiar la deposición de lignina en el tejido foliar de treinta ecotipos de *B. curtipendula* a tres edades; 20, 45 y 65 días de rebrote para su identificación y selección.
3. Desarrollar un protocolo eficiente para la regeneración *in vitro* de un ecotipo sobresaliente de *B. curtipendula*.

### 3. HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis General

Existen diferencias anatómicas en la proporción de los tipos de tejidos relacionados con su digestibilidad a nivel foliar entre ecotipos de *B. curtipendula* (Michx.) Torr., que conlleven a la selección del mejor y a partir de éste, desarrollar un protocolo de regeneración mediante el empleo de estrategias de regeneración, basadas en el uso de reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones y niveles.

#### 3.2. Hipótesis Particulares

1. Es posible identificar ecotipos sobresalientes con base en atributos forrajeros, basados en su estructura anatómica foliar que sean potencialmente una alternativa para el mejoramiento de la especie a futuro.
2. Existen genotipos de mayor digestibilidad a consecuencia de una menor deposición de lignina en sus tejidos, que son independientes del potencial forrajero de la especie.
3. Las diferencias entre tratamientos, pueden ser viables para desarrollar un protocolo de regeneración, usando diferentes fuentes de reguladores de crecimiento que estimulen la totipotencia y el desarrollo de embriones somáticos en una especie apomíctica recalcitrante.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Botánica y Estructura

#### 4.1.1. Botánica y distribución de pasto banderita

El pasto banderita corresponde a la especie *Bouteloua curtipendula* (Michx.)Torrey del género *Bouteloua*, especie identificada en 1805 por Mariano Lagasca, llamado *B. racemosa*. Esta especie es un miembro característico de la tribu Chloridae de la subfamilia Eragrostoideae. Se distribuye ampliamente en todo el continente americano, desde el norte hasta Sudamérica y únicamente 39 especies son reconocidas, pero solo en 29 de ellas se ha reportado su número cromosómico, muchas especies son diploides ( $2n=20$ ) o tetraploides ( $2n=40$ ) y 9 especies han sido reportadas como aneuploides (Gould, 1979).

México es considerado centro de origen de esta especie con gran diversidad de morfotipos y citotipos (Quero *et al.*, 2003). Las plantas presentan fotosíntesis tipo  $C_4$  (USDA, 2011). Morfológicamente las espigas contienen muchas espiguillas aunque esta especie es extremadamente variable, presentando de 3-13 espiguillas y raramente 1, la arista de la lema es corta cuando está presente, el hábito es predominantemente amacollado y rara vez son estoloníferas. Especie con amplio rango de adaptación y distribución, se encuentra principalmente en planicies y praderas (Freter y Brown, 1955) de las regiones méxicas de las grandes planicies de Norte América (Major y Wright, 1974), su distribución es comúnmente observada en lugares con precipitación de 400-600 mm. *B. curtipendula* es una especie económica y ecológicamente importante: es ampliamente usada para repoblar áreas erosionadas, presenta resistencia a sequía y tolerancia al pastoreo (USDA, 2011), la producción forrajera puede alcanzar hasta  $2000 \text{ kg ha}^{-1}$ , es tolerante al fuego y en condiciones particulares éste factor puede estimular la producción de la planta (Ansley *et al.*, 2006).

#### 4.1.2. Apomixis en gramíneas

La apomixis es un proceso natural que permite la reproducción clonal mediante semilla, resultando en una descendencia genéticamente igual a la de la planta madre (Van Dijk y Van Damme, 2000; Grimanelli *et al.*, 2001). Este proceso se lleva a cabo mediante cambios en la vía reproductiva de la hembra, tal que los gametos femeninos se desarrollan sin meiosis y los embriones sin fertilización (Grimanelli *et al.*, 2001). La apomixis puede ser facultativa u obligada y los apomícticos facultativos pueden producir híbridos con plantas anfímicticas. La poliploidía y apomixis pueden ser asociados, debido al vigor vegetativo y la esterilidad parcial o completa que poseen muchos poliploides. Es encontrada casi exclusivamente en poliploides, altamente heterocigotos y en especies caracterizadas pobres genéticamente (Savidan, 2000). La apomixis es rara en diploides, por ello la apomixis gametofítica es más probable de ser establecida a nivel poliploide que en diploides (Asker, 1979). La poliembrionia algunas veces se le ha asociado con la apomixis e instancias de poliembrionia han sido citadas en varias especies apomícticas (Carnahan y Hill, 1961).

La apomixis gametofítica es la forma de reproducción en muchos pastos tropicales (Van Dijk y Van Damme, 2000). Apomícticos gametófitos presentan sacos embrionarios no reducidos, las células huevo se desarrollan partenogenéticamente dentro de un embrión (Hojsgaard *et al.*, 2014) y la formación del endospermo puede requerir la fertilización de un núcleo polar (apomixis pseudogama) o puede desarrollarse independientemente (apomixis autónoma) (Hojsgaard *et al.*, 2014; Sailer *et al.*, 2014).

La apomixis preserva el genotipo maternal por el desarrollo de embriones partenogenéticos, manteniendo la heterocigocidad y epistasis (Van Dijk y Van Damme, 2000). Es de carácter complejo y consiste de diferentes elementos que pueden ser codificados por múltiples genes (Van Dijk y Van Damme, 2000) y la evidencia sugiere que puede ser heredable como un carácter mendeliano, aunque su control genético no es claro (Grimanelli *et al.*, 2001). No obstante, el desarrollo de gametos femeninos sin meiosis (apomeiosis) es el elemento de la apomixis que mayor interés ha despertado (Grimanelli *et al.*, 2001; Hojsgaard *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que la fertilidad apomictica es mucho más grande en apomícticos naturales que la fertilidad sexual efectiva, la fracción apomíctica de la progenie es más vigorosa que la sexual (Clausen, 1954). Por esto los apomícticos son generalmente más exitosos en competencia que los tipos sexuales. Aunque este efecto no fue observado en *Hieracium pilosella*, donde la sucesión apunta que las especies apomícticas podrían ser desplazadas por plantas sexuales (Sailer *et al.*, 2014).

La apomixis puede ser considerada un medio para comenzar una nueva era en el mejoramiento vegetal y producción de semilla, porque permite la fijación inmediata de algún genotipo deseable, incluyendo híbridos  $F_1$ , en general puede ser rápida, barata y una reserva de germoplasma que puede ser usada para crear variedades adaptadas localmente (Van Dijk y Van Damme, 2000). En la reproducción apomíctica, una línea celular no reducida se forma directamente del embrión y esto puede ser alcanzado mediante la formación de embriones somáticos dentro del ovulo (apomixis esporofítica) o mediante la formación de sacos embrionarios no reducidos (apomixis gametofítica) (Van Dijk y Van Damme, 2000; Sailer *et al.*, 2014). El prospecto de cambiar cultivos sexuales a especies cultivadas apomícticas mediante ingeniería genética, tecnología en apomixis ha causado recientemente un boom en la investigación de la apomixis. Teóricamente un gen dominante apomíctico será fijado rápidamente en una autocruza de poblaciones sexuales. Por esto, transgenes apomícticos podrían tener ventajas incondicionales que podrían resultar en transgenes incontrolables (Van Dijk y Van Damme, 2000). Sin embargo, no es garantía que los transgenes apomícticos puedan ser ecológicamente seguros porque existen diferencias esenciales entre apomícticos naturales y transgénicos (Van Dijk y Van Damme, 2000).

#### **4.1.3. Fotosíntesis y estructura anatómica $C_4$**

La eficiencia fotosintética en la asimilación de carbono en plantas superiores presenta limitaciones significativas, debido a la actividad de la oxigenasa de la enzima Rubisco (Edwards *et al.*, 2004). Las plantas terrestres y algunas plantas acuáticas macrófitas evolucionaron bioquímica y anatómicamente, hacia una ruta de fijación de  $CO_2$  llamada fotosíntesis  $C_4$ . El carbono atmosférico es fijado mediante la enzima fosfoenilpiruvato

carboxilasa (PEPC), en una molécula de tres carbonos para posteriormente formar una molécula de cuatro carbonos correspondiente al malato o ácido málico (C<sub>4</sub>; Cerling, 1999). El requerimiento general para la fotosíntesis C<sub>4</sub> es una función de la separación espacial de la fijación inicial del CO<sub>2</sub> atmosférico vía fosfoenilpiruvato carboxilasa (PEPC) que sucede en el mesófilo y la formación de ácido malato C<sub>4</sub> y aspartato, que es transportado a la célula de la vaina del haz vascular, en un compartimento cerrado para la asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico (Edwards *et al.*, 2004).

Con el descubrimiento de la fotosíntesis C<sub>4</sub> en los años 60's hasta nuestros días, la compartimentalización espacial en plantas terrestres C<sub>4</sub> fue consistentemente relacionado con la ocurrencia de la anatomía tipo Kranz. El término anatomía Kranz es comúnmente usado para describir un sistema dual celular, asociado con la fotosíntesis C<sub>4</sub>, que consiste en células de mesófilo que contienen enzimas para la generación de CO<sub>2</sub> de ácidos C<sub>4</sub> y una vía de reducción de carbono a C<sub>3</sub>, en la vaina del haz, incluyendo la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco; Edwards *et al.*, 2004).

En monocotiledóneas pertenecientes a la familia poaceae, 4,600 especies son C<sub>4</sub>, clasificadas bioquímicamente como; NAD-enzima málica (NAD-ME), NADP-enzima málica (NADP-ME) y PEP-carboxiquinasa (PEP-CK) (Edwards *et al.*, 2004; Sage *et al.*, 1999). En cada caso la PEPC está localizada en las células del mesófilo, NADP-ME en cloroplastos, NAD-ME en mitocondrias y PEP-CK en el citosol (Edwards *et al.*, 2004).

Los estudios botánicos informan que las especies de *Bouteloua* son plantas C<sub>4</sub> con típica anatomía foliar tipo Kranz. Caracterizada por la presencia de grandes células de la vaina del haz con grandes cloroplastos. En estas especies la epidermis está unida a las células de la vaina del haz vascular de paredes gruesas y con frecuencia existe extensión de la vaina del haz con fibras de pared gruesa, a veces lignificada (Buxton y Redfearn, 1997), consideradas de baja degradabilidad (Akin, 1989). En contraste, en pastos C<sub>3</sub>, la epidermis se une a las células de parénquima y generalmente tienen más mesófilo y son más digestibles que los pastos C<sub>4</sub> (Buxton y Redfearn, 1997).

Las diferencias en la estructuras anatómica de las gramíneas  $C_4$ , puede estar relacionada con las rutas fotosintéticas y directamente con la proporción del mesófilo en la hoja (Hattersley y Watson, 1976). La tasa fotosintética de algunas especies han mostrado una alta correlación ( $r= 0.965$ ) con el nivel de ploidía, debido a las altas concentraciones de clorofila presente en el mesófilo (Warner y Edwards, 1989).

Debido a diferencias anatómicas entre especies forrajeras, las gramíneas presentan una menor digestibilidad en la hoja y tallos, que las leguminosas. Estas características estructurales han sido identificadas como las principales que limitan la digestibilidad de la hoja y la más importante es la deposición de lignina en las paredes celulares (Buxton y Redfearn, 1997).

#### **4.1.4. Importancia de la anatomía foliar y la digestibilidad**

Investigaciones en las que se relaciona la anatomía y la digestibilidad de forrajes han demostrado interacciones entre el grosor de la pared celular, lignificación y otras características anatómicas, interacciones útiles para determinar la digestibilidad entre diferentes tipos de células (Wilson, 1993), también con rutas fotosintéticas y área del mesófilo (Hattersley y Watson, 1976).

Así mismo el potencial productivo de los forrajes está asociado a diferentes caracteres anatómicos que le brindan la habilidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, entre ellos puede mencionarse; densidad de haces vasculares (Maiti y Rodríguez, 2010), estomas pequeños, alta densidad estomatal (Xu y Zhou, 2008) y densidad y distribución de células buliformes y bisagra.

En pastos  $C_4$ , la epidermis y las células de la vaina del haz del parénquima son lenta o parcialmente degradadas (Akin, 1989). El esclerénquima, tejido vascular, parénquima y epidermis del tallo presentan el mismo patrón de degradabilidad (Akin, 1989; Buxton y Redfearn, 1997). En general, las gramíneas  $C_4$  presentan menor digestibilidad en hoja que las gramíneas  $C_3$ , debido a que las hojas de los pastos  $C_3$  contienen más células en el mesófilo que la de los pastos  $C_4$ . (Buxton y Redfearn, 1997). Las diferencias en la conformación celular en tejidos de epidermis, mesófilo, esclerénquima, xilema y floema,

está relacionada con su función, por ello su composición de monosacáridos y polisacáridos es diferente, lo cual puede estar asociada con su digestibilidad (Casler y Hatfield, 2006).

Los tipos celulares altamente lignificados como; esclerénquima y los elementos traqueales del xilema son los principales elementos estructurales que limitan la degradabilidad de los forrajes. La presencia de barreras químicas como; compuestos fenólicos de bajo peso molecular en la pared celular, del parénquima de la vaina del haz y epidermis, disminuyen la degradación de la fibra en esos tejidos (Akin, 1989). Los tejidos altamente lignificados como el esclerénquima y los elementos traqueales del xilema en pastos con anatomía tipo Kranz, constituyen una barrera a la degradación del tejido; este fenómeno es más acentuado en pastos de climas cálidos (Akin, 1989).

El tallo y elementos traqueales del xilema en hojas y tallos, son los tejidos más resistentes a la colonización microbiana y degradación, formando una barrera inerte a la digestión (Akin, 1989). Las células del floema y mesófilo en pastos y leguminosas son fáciles y rápidamente degradados. El mesófilo en diferentes plantas varía en digestibilidad, los pastos de climas cálidos presentan una menor degradabilidad que los de clima templado o frío, además la presencia de compuestos fenólicos en el mesófilo de algunos pastos (*Cynodon dactylon* L. Pers. y *Dactylis glomerata* L.) reducen la digestibilidad de ese tejido (Akin, 1989).

Ciertos tejidos identificados como no degradables (esclerénquima y xilema) se han descrito como recalcitrante, porque muestran resistencia a la degradación microbiana (Akin y Burdick, 1981). La epidermis y la vaina del haz de pastos C<sub>4</sub>, generalmente son considerados parcialmente digestibles. Las condiciones de estrés tienden a reducir la digestibilidad de las hojas (Akin *et al.*, 1983), ya que las señales del estrés promueven la acumulación de lignina (Zavaleta-Mancera, 2015, Comunicación personal).

#### **4.1.5. Importancia del mesófilo en el aporte nutricional de los forrajes**

El mesófilo es considerado esencialmente un componente en la difusión de la conductancia del CO<sub>2</sub> y el principal factor en la fotosíntesis de la hoja e inclusive más

importante que la conductancia estomatal (Flexas *et al.*, 2008), ya que las células del mesófilo en la hoja son el principal sitio de la fotosíntesis (Takai *et al.*, 2013).

La enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) encargada de la fijación del CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis, es una enzima clave para incrementar la eficiencia de la carboxilación y consecuentemente la tasa de la fotosíntesis (Takai *et al.*, 2013). Por su importancia en la fotosíntesis, el mesófilo es de gran consideración, dado que más del 90% de la biomasa del cultivo es derivada de productos fotosintéticos (Makino, 2011).

En la hoja, mucho del nitrógeno contenido, es distribuido en los cloroplastos, principalmente en proteínas fotosintéticas, cuando la hoja senesce gran parte del nitrógeno es liberado y reusado en el desarrollo de nuevos tejidos (Wada *et al.*, 2015). Con la senescencia de la hoja, las proteínas se degradan y el nitrógeno queda libre para traslocarse a otras partes de la planta, dos vías de autofagia en cloroplastos se han reportado, denominado clorofagia (Ishida *et al.*, 2014).

Además de la gran importancia que tiene el mesófilo en la fotosíntesis, es una fuente importante de proteína, ya que en plantas C<sub>3</sub>, el 75-80% del nitrógeno de la hoja se encuentra en los cloroplastos, principalmente como proteínas fotosintéticas (Makino y Osmond, 1991; Makino *et al.*, 2003), siendo la Rubisco, la enzima que contiene la mayor cantidad de nitrógeno en la hoja (12-35%) y más del 50% de la proteína soluble (Lawlor *et al.*, 1989). Su área celular tiende a incrementarse con el nivel de ploidía (Byrne *et al.*, 1981) y la mayor pérdida de clorofila en el mesófilo, es debido al estrés hídrico (Alberte y Thornber, 1977).

El mesófilo no se lignifica por lo que es un tejido altamente digestible y es rápidamente digerido (Akin y Burdick, 1975; Alves de Brito *et al.*, 1999). Su contenido celular puede ser determinante en la digestibilidad en pastos C<sub>4</sub> (Buxton y Redfearn, 1997) y es un atributo forrajero altamente correlacionado con la digestibilidad de la materia seca (Campos *et al.*, 2001). De manera similar, un alto contenido de clorofila en las células está relacionado con el peso y capacidad fotosintética de la hoja y éste puede ser un

carácter a considerar en el mejoramiento de especies forrajeras (Wilson y Cooper, 1970).

La importancia del mesófilo en el proceso fotosintético es una característica que ha tenido un gran impacto en cereales como arroz para identificar variedades con alto potencial de rendimiento (Takai *et al.*, 2013) y en especies forrajeras es un atributo importante a considerar en programas de mejoramiento. Wilson y Cooper (1970) realizaron un estudio de mejoramiento en *Lolium perene*, usando como criterio de selección el tamaño de las células de mesófilo, encontrando que aquellas plantas con células de mesófilo pequeñas, produjeron semillas pesadas, mayor rendimiento de hoja y tallo que aquellas plantas de células grandes.

#### **4.1.6. Lignina: pruebas histológicas, biosíntesis y su papel en la digestibilidad de las plantas forrajeras**

La detección histoquímica proporciona información útil, acerca de la distribución y acumulación de un determinado compuesto en células y tejidos, pero la cuantificación de los resultados histoquímicos no es tarea sencilla (Sokupová y Albrechtová, 2003). Mediante la técnica de análisis de imágenes, se puede medir el área de las células o tejidos que reaccionaron positivamente a una prueba histoquímica determinada. Por ejemplo, la deposición de lignina en el tejido foliar puede calcularse con gran precisión, constituyendo una herramienta útil para nutricionistas y mejoradores en programas genéticos (Wittenberg *et al.*, 1993).

Las dos técnicas más comunes para la detección de lignina en diferentes tejidos vegetales son: a) La prueba de Wiesner, la cual involucra el tratamiento de los tejidos con una solución de fluoroglucinol y ácido clorhídrico (Jensen, 1962). El ácido fluoroglucinol reacciona con los grupos coniferaldehídos de la lignina, dando un color rojo oscuro o púrpura, pero no reacciona fuertemente con las unidades siringilo (Stafford, 1962; Sarkanen y Hergert, 1971) y b) la prueba con cloruro de sulfito, la cual reacciona con las unidades siringilo de la lignina, dando un color rojo (Stafford, 1962; Sarkanen y Hergert, 1971).

La lignina es el segundo compuesto orgánico más abundante sobre la tierra después de la celulosa (Lewis y Yamamoto, 1990; Monties, 1991). La lignina son polímeros de compuestos fenólicos presentes en todas las plantas vasculares, que proporcionan rigidez a los elementos conductores del xilema y fibras celulares (Piquemal *et al.*, 2002), creando una matriz densa que une a las microfibrillas de celulosa y hemicelulosa a otros componentes de la pared (Ralph *et al.*, 2004). La lignina en pastos forrajeros está compuesta de unidades  $C_6C_3$ , principalmente *p*-hidroxyphenilo (H) derivadas del alcohol *p*-cumarilo, unidades guaiacil (G) derivadas del alcohol coniferilo y unidades siringil (S) derivadas del alcohol sinapilo (Jung, 1989; Lewis y Yamamoto, 1990) y están presentes en varias proporciones de acuerdo a los criterios botánicos, fisiológicos y citológicos (Lewis y Yamamoto, 1990).

La biosíntesis de lignina comprende una serie de eventos metabólicos altamente regulados y coordinados y muchas enzimas se involucran en esta vía (Dixon *et al.*, 2001). La biosíntesis de monómeros se produce mediante dos vías: una vía tirosina (encontrada en monocotiledóneas) y la vía fenilalanina (encontrada en todas las plantas), siendo la biosíntesis por tirosina la que presenta una mayor eficiencia en la formación de monómeros (Amthor, 2003).

La biosíntesis de monolignoles se inicia con la desaminación de la fenilalanina e involucra reacciones sucesivas de hidroxilación del anillo aromático, metilación-O-fenólica, y la conversión de la cadena carboxil lateral a un alcohol (Boerjan *et al.*, 2003). En el más puro sentido, la lignina se origina a partir de reacciones de acoplamiento de un radical de tres precursores iniciales, los monolignoles de alcohol *p*-cumarilo, coniferilo y sinapilo, debido a que este proceso origina un polímero polidisperso con secuencias no extendidas de unidades regularmente repetidas correspondiendo a; H, G y S (Ralph *et al.*, 1999).

Los monolignoles son derivados del 4-cumarato, el cual es sintetizado por la vía originada con prefenato (Amthor, 2003), tanto el alcohol *p*-cumarilo, coniferilo y sinapilo son formados en el citosol, pero su biosíntesis ocurre en el apoplasto. En angiospermas, los monolignoles pueden ser transferidos al apoplasto inmediatamente

después de que han sido formados, donde ellos participan en la formación de lignina. En gimnospermas, éstos pueden ser almacenados en formas estables, tal vez en vacuolas antes de ser transportados al apoplasto (Whetten y Sederoff, 1995).

Como es conocido, la lignina es uno de los principales factores que afectan la digestibilidad del forraje en los rumiantes y su constitución monomérica también afecta la tasa de digestión de la pared celular (Buxton y Russell, 1988; Jung, 1989; Piquemal *et al.*, 2002). Aunque es claro que el contenido de lignina afecta negativamente la degradabilidad enzimática de los polisacáridos de la pared celular, el impacto de la estructura de la lignina sobre este importante parámetro es pobremente entendido y difícil de establecer una clara relación entre la digestibilidad y la composición de la pared, tal como la relación de S a G o el contenido de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico (Piquemal *et al.*, 2002). Lo que ya es bien conocido es que la estructura de la lignina es influenciada por factores genéticos y ecofisiológicos (Monties, 1989).

La concentración de lignina por si sola es un pobre predictor de la digestibilidad de los forrajes. Esto ha llevado a examinar otros aspectos de la lignificación, entre estos se menciona la digestibilidad de la pared celular y su relación siringil:guaiacil la cual es considerada como potencialmente benéfica en la digestibilidad de la pared celular (Jung, 1996). El mejoramiento de la digestibilidad de la pared celular a través de la modificación genética de los forrajes es el método más efectivo para mejorar la disponibilidad de energía de los forrajes para el ganado lechero (Jung, 1996).

Algunos estudios citoquímicos y químicos en alfalfa, demuestran que el proceso de lignificación de fibras secundarias del esclerénquima se origina a partir del cambium y la deposición de monómeros inicia en la pared primaria de las fibras secundarias del xilema (Vallet *et al.*, 1996).

#### **4.1.7. Análisis de imágenes**

El análisis de imágenes (AI) es una herramienta científica de gran utilidad para medir longitudes, áreas y formas, que reemplaza métodos viejos de cuantificación que requieren medidas laboriosas en microscopio (Sokupová *et al.*, 2001). El empleo de la

histoquímica mediante el análisis de imágenes permite obtener mayor precisión y datos detallados, con ellos mejores comparaciones pueden ser realizadas en diferentes tejidos, tratamientos, etc., (Sokupová y Albrechtová, 2003).

Kuhbauch y Bestajovsky (1985) mencionan que la cantidad de tejido lignificado en plantas, puede ser estimado mediante el uso de una tinción de lignina y calculado mediante análisis de imágenes. Altas correlaciones ( $r=0.90-0.96$ ) fueron reportadas entre los resultados obtenidos con este método y con la cuantificación química de lignina.

En un estudio realizado sobre la digestibilidad en tallos y hojas de nueve ecotipos de *Phalaris arundinacea* L., permitió determinar diferencias entre digestibilidades en diversos tejidos de hoja y tallo, usando pruebas histoquímicas y análisis de imágenes (Wittenberg *et al.*, 1993). Recientemente se reportó el empleo de la microscopia y análisis de imágenes para caracterizar fibras de pasto de Rye grass perene (*Lolium perenne* L.) y Alta Festuca (*Festuca arundinacea*), midiendo el ancho y longitud de fibras individuales lignificadas en tallo y hoja, para fines industriales (King *et al.*, 2013)

El empleo del análisis de imágenes es un método sencillo que no requiere de equipo sofisticado y ha sido utilizado ampliamente en investigaciones agronómicas a nivel anatómico, pero su principal uso ha sido reportado en diversos campos de la medicina (Prasad y Prabhu, 2012).

## **4.2. Cultivo de Tejidos**

### **4.2.1. Cultivo de tejidos y regeneración de plantas en pastos apomícticos**

El cultivo de tejidos es definido como el cultivo aséptico de células, tejidos y órganos bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas (Thorpe, 2007) y constituye una herramienta de gran importancia en estudios de transformación genética en muchas especies forrajeras, también se puede llevar a cabo la combinación total o parcial de genomas mediante hibridación somática y cibrización mediante la fusión de protoplastos (Forster *et al.*, 2000; Spangenberg *et al.*, 2000).

Diferentes partes de las plantas son utilizados en cultivo de tejidos tales como; embriones, semillas, células, meristemos, raíces, vástagos, nucela, endospermo, anteras, ovarios, microsporas (IMC), yemas y protoplastos (Jain y Brar, 2010; Sikdar y Kim, 2010).

El cultivo de tejidos ofrece una alternativa de mejoramiento a futuro en especies forrajeras apomícticas. En ese tenor, la apomixis recientemente ha sido considerada un medio para la preservación de genes deseables, sin la cual varios de éstos se perderían por recombinación y segregación durante la reproducción sexual (Kultonow y Tucker, 2008). Asimismo, ha sido una alternativa en programas de mejoramiento genético en *Brachiaria* (syn. *Urochloa*) un pasto apomíctico de gran importancia forrajera.

Los pastos apomícticos presentan una buena formación en la inducción de callos (Mancini *et al.*, 2014), pero la regeneración de plantas ha sido reducida y esta constituye el cuello de botella en trabajos de mejoramiento por transformación genética. Respuestas variables en la regeneración de plantas han sido reportadas para diferentes especies de gramíneas. Algunos factores como; tipo y edad de explantes, medio de cultivo, pretratamientos, fuentes de auxinas y citocininas, han sido comúnmente reportados en varias especies para la obtención de una mejor eficiencia de regeneración (Aina *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012).

La importancia de la regeneración de plantas, reviste en obtener un protocolo eficiente de regeneración, ya que ello constituye un prerrequisito para el éxito de trabajos en transformación genética de cualquier cultivo (Bajaj *et al.*, 2006; Khatun *et al.*, 2010, Rakshit *et al.*, 2010; Aina *et al.*, 2012). Su eficiencia ha sido descrita como una característica cuantitativa dependiente de la variación inter e intraespecífica de las especies (Aina *et al.*, 2012).

La regeneración de plantas constituye la parte más difícil del cultivo de tejidos y ésta es más acentuada en especies apomícticas. Al respecto, Swedlund y Vasil (1985), mencionan que las mejores tasas de regeneración fueron obtenidas en un diploide de *Pennisetum americanum* que en materiales tetraploides. En pasto bahia (*Paspalum*

*notatum*) el genotipo sexual fue significativamente diferente en la inducción y regeneración de callos con respecto al genotipo apomíctico (Mancini *et al.*, 2014).

La baja capacidad de regeneración por cultivo de tejidos, en especies apomícticas ha sido inferior al 30% y es reportada en pastos como; *Poa pratensis* (Hu *et al.*, 2006) y pasto Kentucky (Stephens *et al.*, 2006). A pesar de ello, se han logrado buenos resultados en la regeneración de plantas en *B. brizantha* (Lenis-Manzano, 1998), *B. ruziziensis* (Ishigaki *et al.*, 2009) Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) (Ha *et al.*, 2001) y bahiagrass (*Paspalum notatum*) (Grando *et al.*, 2002) y protocolos de transformación han sido generados en varias especies apomícticas tales como; bahiagrass (*Paspalum notatum*) (Mancini *et al.*, 2014), *Urochloa brizantha* (Lenis-Manzano, 2010), *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* (Cao *et al.*, 2006) por mencionar algunos.

Diferencias en la respuesta de regeneración fueron reportadas en un cultivar de arroz recalcitrante, donde se observó que a mayor inducción de callos, menor regeneración de plantas (Mirlohi *et al.* 1989). En este mismo cultivo, los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) e indolacético (AIA), fueron claves en la regeneración de plantas (Huang *et al.*, 2012).

Varias investigaciones realizadas en diferentes gramíneas, reportan al ácido naftalenacético (ANA) y la benciladenina (6-BAP) como los reguladores que mostraron respuestas significativas en la inducción de callos y/o regeneración de plantas. El empleo de éstos, solos o combinados han sido reportados en *Brachiaria brizantha* (Huang *et al.*, 2012), caña de azúcar (Franklin *et al.*, 2006), *Paspalum scrobiculatum* (Kaur y Kothari, 2004) y el AIA en cebada (Wei *et al.*, 1986).

Algunos pretratamientos para incrementar la regeneración de plantas en especies apomícticas y recalcitrantes, usando varios factores son señalados en; centeno (*Secale cereale*); el pretratamiento con frío y dos regímenes de luz, incrementaron significativamente la regeneración de plantas (Immonen y Antila, 1999). Estos autores mencionan que la regeneración de plantas es influenciada por la interacción de los medios de cultivo con los cultivares.

En callos de maíz, la regeneración de plantas se incrementó en cuatro veces, después de un pretratamiento de tres meses con 0.5 mM con DL-alpha-difluorometilarginina (DFMA). Éste tratamiento ocasionó una marcada disminución de poliaminas (PA) y niveles de proteína, los cuales están relacionados con senescencia de las células. (Tiburcio *et al.*, 1991). En caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) un pretratamiento con auxinas (2,4-D) y oscuridad, en explantes de nervadura central (midrib) indujeron callos embriogénicos y un mayor porcentaje de regeneración fue obtenida comparada con el control (Franklin *et al.*, 2006).

#### **4.2.2. Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es una forma de reproducción asexual mediante el cual se obtiene una estructura similar al embrión sin la fertilización de gametos (Zimmerman, 1993; Radice, 2010). La respuesta depende de factores como; genotipo, edad de la planta o callo (Gaj, 2004), estado fisiológico, tipo de explante (Delporte *et al.* 2001; Gaj, 2004), composición del medio de cultivo y hormonas exógenas (Huang *et al.*, 2012).

El proceso de embriogénesis somática se divide en dos fases; inducción y expresión. Durante la fase de inducción, las células somáticas diferenciadas adquieren competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas. En la fase de expresión, las células embriogénicas muestran competencia embriogénica y se diferencian para formar embriones somáticos (Jiménez, 2001). Durante el proceso de la embriogénesis somática cuatro estados se han observados: a) inducción de callos, b) formación y proliferación de embriones, c) maduración de embriones y d) germinación de embriones (García-González *et al.*, 2010).

En la embriogénesis somática, al igual que en la organogénesis indirecta requieren de una fase de inducción de callos. La diferencia entre ambas radica, en que la embriogénesis somática requiere solo una señal hormonal para producir un embrión bipolar capaz de generar una planta completa, mientras que en la organogénesis indirecta requiere dos señales por separado, una para iniciar el crecimiento de vástago y otra para inducir el desarrollo radical (Chawla 2003; García-González *et al.*, 2010).

En monocotiledóneas, la embriogénesis somática es la principal forma de regeneración para obtener plantas normales y citogenéticamente estables (Hanna *et al.*, 1984). Generalmente, las tres vías más comunes de regeneración en tejidos de cultivo son; i) propagación de meristemos preexistentes (cultivo de vástagos o cultivo de nudos), ii) organogénesis y iii) embriogénesis no-cigótica (somática; Aina *et al.*, 2012).

La eficiencia de cambios morfológicos y bioquímicos ocurrido durante la embriogénesis somática, son dependientes de la capacidad de morfogénesis del explante utilizado en el medio de cultivo (Lenis-Manzano, 2010), del balance hormonal endógeno, de factores fisiológicos y ambientales (Jiménez, 2005). Las células embriogénicas son similares a las células meristemáticas, presentan gran cantidad de ribosomas, citoplasma denso, un nucléolo agrandado y pequeños granos de almidón. Estas células pueden variar en tamaño y número y son capaces de dividirse o transformarse en embriones según las condiciones del medio de cultivo (Radice, 2010).

La formación de embriones somáticos capitalizada por la totipotencia de las células vegetales, involucra el desarrollo de estructuras bipolares similares al de un embrión cigótico (Dodeman *et al.*, 1997). Diversos estudios demuestran que el programa genético para la embriogénesis y su elaboración, están totalmente contenidas dentro de la célula maternal (Zimmerman, 1993).

Con el avance biotecnológico y el empleo de la biología molecular, ha sido posible la identificación y aislamiento de genes involucrados en la embriogénesis somática, para efficientizar protocolos de regeneración y facilitar la regeneración en especies recalcitrantes (Chen *et al.*, 1999). Un ejemplo es reportado en pasto guinea, el gen identificado y aislado como; ASG-1 podría estar involucrado en el proceso de inducción de embriogénesis somática en esta especie (Chen *et al.*, 1999). En especies dicotiledóneas se han citado cinco genes relacionados con la embriogénesis somática (Solís-Ramos *et al.*, 2012).

En pasto bufel (*Cenchrus ciliaris*), utilizando explantes de anteras, fueron inducidos callos embriogénicos en medios suplementados con 6 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Se observaron diferencias significativas entre genotipos y número de plantas regeneradas. La

interacción entre la fecha de colección de tallos y el tratamiento, fue significativa, pero no fue significativa para el genotipo. El uso de 0.3 M de manitol durante 5 y 7 días, mejoró la respuesta embriogénica en pasto bufel (Carlóni *et al.*, 2014).

Gaj (2004) y Delporte *et al.* (2001) mencionan, que el tipo de explante y su estado de desarrollo son los factores más importantes para inducir embriogénesis somática. Sin embargo, varios factores han sido reportados en la inducción de la embriogénesis somática. En maíz el mayor porcentaje de callos embriogénicos (25%) ocurrieron con el empleo de sacarosa al 25% (Swedlund y Locy, 1993). En arroz callos de menos de 7 días dieron lugar a embriones en medios solidificados con diferentes fuentes de carbohidratos (Joyia y Khan, 2013). El uso de 2,4-D en altas dosis indujo embriogénesis somática en arroz, pero inhibió la regeneración de plantas *in vitro* (Rueb *et al.*, 1994).

Mediante la inducción de embriogénesis somática a partir del cultivo *in vitro*, se han obtenido líneas mejoradas en algunos cereales para generar líneas fértiles, también ofrece ventajas en la transferencia de genes importantes mediante ingeniería genética, con base en la introducción de caracteres agronómicos importantes en especies forrajeras blanco, tales como; resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas o fungicidas, resistencia a sequía, salinidad, frío o en parámetros de crecimiento tales como; maduración temprana, floración temprana o tardía, rápida nodulación (en el caso de leguminosas), mejoramiento en la producción de forraje y semilla, etc. (Basu y Prasad, 2011).

#### **4.2.3. Tipos de callo inducidos en gramíneas**

La inducción de callos depende de varios factores tales como; el genotipo, medio de cultivo, concentración interna de las fitohormonas (Rakshit *et al.*, 2010) y de los reguladores de crecimiento provistos de manera exógena (Huang *et al.*, 2012). La respuesta de inducción en diferentes especies ha sido extensamente variable. El genotipo es la mayor fuente de variación en la inducción de callos y este efecto ha sido reportado en maíz (*Zea mays* L.; Rakshit *et al.*, 2010) y arroz (*Oryza sativa* L.; Kathun

*et al.*, 2010). En *B. brizantha* el tipo de explante resultó ser el factor clave en la obtención de callos embriogénicos (Cabral *et al.*, 2011). En *Poa pratensis* los medio de cultivo empleados (DBC3, D0BC2 y D0) a base de 2,4-D, 6-BAP y sulfato cúprico, resultaron ser de gran importancia en la inducción de callos que posteriormente permitieron la regeneración de plantas (Ha *et al.*, 2001).

Gran diversidad en tipos de callo han sido obtenidos en monocotiledóneas. En pasto japonés (*Zoysia japonica* Steud.) fueron reportados ocho tipos (Wang *et al.*, 2010), dos tipos en *Paspalum notatum* (Mancini *et al.*, 2014) y en Switchgrass dos tipos de callos (I y II; Burris *et al.*, 2009).

En maíz, callos tipo II han sido usados en investigaciones de transformación genética y este tipo de callo es altamente dependiente del genotipo (Li *et al.*, 2002). En *Pogonatherum paniceum* (Poaceae) fueron descritos cuatro tipos de callos, siendo los del tipo I callos embriogénicos (Wang *et al.*, 2008). Los callos tipo I y II, han servido de referencia para la clasificación de callos en monocotiledóneas y corresponden a callos embriogénicos. Callos clasificados como tipo I o tipo II, han sido caracterizados por color, textura, sistema de regeneración y cantidad de tiempo requerida para la iniciación de callos (Burris *et al.*, 2009).

El callo tipo I, es el típico callo formado en especies monocotiledóneas, caracterizado por su forma compacta, crecimiento lento, color blanco o amarillo pálido, altamente organizado. Este tipo de callo está compuesto casi en su totalidad de células meristemáticas citoplásmicas que carecen de grandes vacuolas (Vasil y Vasil, 1994). El callo tipo II, es descrito como suave, friable, de crecimiento rápido y excesivamente regenerable, su formación es menor que el callo tipo I, puede ser cultivado por largos periodos de tiempo y es capaz de formar células en suspensión, mientras que el callo tipo I, no presenta estas propiedades (Armstrong y Green, 1985). En switchgrass todos los callos habían sido descritos como tipo I, pero Burris *et al.*, (2009) utilizando un medio de cultivo nuevo denominado LP9 (macroelementos N6 combinados con microelementos B5), fue capaz de producir callos tipo II, que son altamente friables y de gran longevidad.

La diversidad en el tipo de callo obtenido en cebada fue dependiente del cultivar y de la auxina usada. Los callos embriogénicos obtenidos de esa especie fueron de varios tipos; compactos, nodulares, ligeramente amarillos, finamente friables y blancos (Castillo *et al.*, 1998). Callos similares a los descritos en cebada fueron obtenidos en arroz y los porcentajes de inducción de callos embriogénicos fueron dependientes del genotipo (Khatun *et al.*, 2010).

Mancini *et al.* (2014), reportaron dos diferentes tipos de callos en *P. notatum* los cuales presentaron las siguientes características; 1) compacto, nodular, amarillo blanquecino y potencialmente embriogénico y 2) friable, suave y translucido. El tipo y cantidad de callos varió dependiendo de la composición de los reguladores de crecimiento.

En arroz una mayor inducción de callos ocurrió en medios de cultivo con la mayor concentración de 2,4-D (Mirlohi *et al.*, 1989). El uso de picloram (4-amino-3,5,6-tricloro-2-ácido piridinocarboxílico) solo o en combinación con cinetina indujo callos embriogénicos y organogénicos respectivamente en *Paspalum scrobiculatum* L (Kaur y Kothari, 2004).

Los callos friables frecuentemente han sido reportados como callos embriogénicos y con mayor capacidad para regenerar plantas, mientras que callos suaves secos y callos suaves hiperhidratados (formalmente llamados vitrificados) presentan muy baja regeneración de plantas (Wang *et al.*, 2010). Los callos suaves inician su desarrollo como tal, pero callos con otras características pueden crecer sobre estos (Wang *et al.*, 2010).

#### **4.2.4. Auxinas y citocininas en la morfogénesis**

La combinación de auxinas y citocininas en los medios de cultivo son los principales factores que inducen callos organogénicos y embriogénicos (Rakshit *et al.* 2010; Ge *et al.*, 2006). La formación del callo generalmente constituye el primer estado en el proceso morfogénico y un balance de auxinas/citocininas ha sido catalogado como un efecto consistente sobre el tipo de órganos regenerados, aunque ese balance difiere entre especies (Huang *et al.*, 2012). Una baja relación auxinas:citocininas, comúnmente

son empleadas en la regeneración de plántulas (Ge *et al.*, 2006) y este uso ha sido reportado en *U. brizantha* (Cabral *et al.*, 2011).

Las auxinas juegan un papel muy importante en la des-diferenciación, división celular, inducción de embriones somáticos (Murthy *et al.*, 1998; Akoyi *et al.*, 2013), raíces laterales, crecimiento de yemas adventicias y formación del callo (Murthy *et al.*, 1998), estimulan la síntesis de DNA y RNA dentro del núcleo (Mustafa y Khan, 2012), también causan cambios en la metilación del DNA (Chen *et al.*, 2001).

El uso de auxinas sintéticas normalmente usadas en cultivo de tejidos, son divididas en diferentes clases, basado en la posición de su ácido carboxílico sobre su anillo aromático. Estos incluyen; ácidos fenoxialcanóico (2,4-D), ácidos benzóicos (dicamba) y ácidos piridina-carboxílico (picloram) (Akoyi *et al.*, 2013). El uso de picloram en la inducción de callos en gramíneas ha sido poco reportado, pero buenos resultados han sido obtenidos en *Paspalum scrobiculatum* (Kaur y Kothari, 2004). El uso del 2,4- ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en combinación con N6-bencilamino-purina (6-BAP), son comúnmente usados en la realización de investigaciones en cultivo de tejidos y reportados en pastos apomicticos (Chi *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2012). Otra citocinina que es de gran importancia en cultivo de tejidos es la N-fenil-N'-1,2,3-tidiazol-5 ilurea (tidiazuron, TDZ), el cual es considerado uno de los reguladores con efecto de citocinina más potente y su uso en monocotiledóneas ha sido restringido, aunque ha sido reportada en monocotiledóneas como; festuca alta (*Festuca arundinacea* Schrebb; Bai y Qu, 2001), trigo (Abdallah *et al.*, 2012), pero es usada ampliamente en especies dicotiledóneas y coníferas.

El uso de 2,4-D solo o en combinación con citocininas ha sido ampliamente utilizado en la inducción y mantenimiento de callos en varias especies de gramíneas y su respuesta ha sido variable entre especies. Por ejemplo; en pasto japonés (una gramínea de reproducción sexual), altos niveles de auxinas en combinación con bajos niveles de citocininas, mostraron altos porcentajes de inducción y alta eficiencia de regeneración (Wang *et al.*, 2010). Se ha reportado que el uso del 2,4-D puede ocasionar alteraciones a nivel cromosómico (Karp, 1994) llevando a la pérdida de la capacidad de

regeneración y la variabilidad en los porcentajes de regeneración en cebada (Castillo *et al.*, 1998).

Por su parte las citocininas, regulan el crecimiento y morfogénesis, estimulan la división celular e inducen la proliferación de vástagos axilares, aunque inhiben la formación de raíz (Murthy *et al.*, 1998). Es bien conocido que las citocininas incrementan la diferenciación en la planta y son ampliamente usadas en el medio de regeneración en cultivo de tejidos. Cierta relación auxina/ citocinina en la inducción de callos y medio de subcultivo, frecuentemente mejora la calidad del callo y la capacidad de regeneración en cereales y pastos (Bai y Qu, 2001).

Se ha reportado que los niveles de citocininas en callos son dependientes de los niveles de minerales en el medio de cultivo, pero este efecto puede ser inverso (De Oliveira *et al.*, 2010). El uso de citocininas y su efecto sobre la acumulación de algún elemento mineral ha sido ampliamente estudiado en dicotiledóneas. De Oliveira *et al.* (2010) reportó que en *Anona glabra* las citocininas provocaron una disminución en los niveles de calcio, solo la zeatina estimuló la acumulación del potasio y magnesio, mientras que BAP indujo una mayor absorción de hierro. También De Oliveira *et al.* (2010) reportaron que en callos de *Viscum album* las citocininas influyen en la acumulación de nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio (De Oliveira *et al.*, 2010). Estos autores, señalan que un balance hormonal y mineral correctos en el medio de cultivo, incrementa la probabilidad de éxito en el cultivo de tejidos. Las citocininas también estimulan la producción de etileno y su efecto ha sido observado en una variedad de frijol y en trigo (Yip y Yang 1986).

#### **4.2.5. Estrés osmótico en la embriogénesis somática**

El concepto de estrés, fue originalmente desarrollado por Hans Selye en 1936 y ha sido aplicado para describir condiciones ambientales desfavorables en las plantas (Lichtenthaler, 1998). Su función se relaciona con el incremento en la generación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno ( $O_2^-$ ,  $O_2$ ) y radicales hidróxilo ( $OH^-$ ) que

incrementan la fuga de electrones del oxígeno molecular ( Xiong *et al.*, 2002), alterando el metabolismo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos por oxidación (Fridovich, 1986).

El uso de estrés osmótico a partir de diferentes compuestos (sorbitol, manitol, polietilenglicol, sacarosa y agar) son de los más aplicados en cultivo *in vitro*, para estimular la embriogénesis somática en diferentes especies. Jain *et al.* (1997) mencionan que el estrés osmótico provoca interrupciones en conexiones plasmodésmicas entre células preembriogénicas, haciéndolas fisiológicamente aptas y permitiendo la diferenciación de las células que contribuyen al proceso de embriogénesis somática. Al respecto Cabrera-Ponce *et al.* (2014) mencionan que sólo las células competentes que sobreviven al estrés osmótico, tienen la habilidad de generar embriones somáticos en condiciones *in vitro* y aquéllas que sobreviven desarrollan competencia celular (Robledo-Paz, 2015, comunicación personal).

El sorbitol es un alcohol azucarado con seis carbonos, se usa como fuente de carbono para provocar estrés osmótico en medios de cultivo, con el fin de mejorar las características morfogénicas de los callos y la capacidad regenerativa de los mismos (Swedlund y Locy, 1993). El sorbitol al igual que manitol, polietilenglicol, sacarosa y agar, reducen el potencial de agua del medio, dificultando la extracción del líquido por los tejidos o las plantas (Claeys *et al.*, 2014). Lo anterior provoca cambios en las vías metabólicas y en la fisiología celular, las cuales están relacionadas con la cantidad de piruvato, glicolisis y gluconeogénesis cuando ocurre el proceso de des-diferenciación (Shen *et al.*, 2012).

El empleo de sorbitol y manitol han sido ampliamente reportados para inducir embriogénesis somática en cereales como; arroz (Huang *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2010), maíz (Swedlund y Locy, 1993), trigo (Hu *et al.*, 1995), cebada (Wang *et al.*, 2000), centeno (Guo *et al.*, 2000) y rosáceas (Moing *et al.*, 1992). El efecto principal del sorbitol ha sido parcialmente explicado y es asociado como un regulador endógeno de fitohormonas en la respuesta de la morfogénesis (Huang *et al.*, 2012; Lee y Huang, 2014).

Recientemente estudios realizados en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) mencionan que el sorbitol produce una reducción repentina en el volumen celular y disminuye la dinámica de ciertas señales en cascada, incluyendo las vías de respuesta al estrés requeridas para la adaptación osmótica (Miermont *et al.*, 2013). Miermont *et al.*, (2013) demostraron que el incremento en la presión osmótica, disminuye la movilidad de las proteínas en el citoplasma, debido a un efecto de hacinamiento molecular que puede llevar a un estancamiento de ciertas señales no relacionadas con los procesos celulares.

Investigaciones realizadas a nivel de callos sobre las respuestas que desencadena el sorbitol en la inducción de embriogénesis somática han sido reportadas por varios autores. Lee y Huang (2014) reportaron que callos organogénicos tratados con sorbitol contenían alto contenido de glucosa, sacarosa, almidón y alta expresión fue observada en los genes *OsCIN1* (cell Wall-bound invertase), *OsSUT1* y *OsSUT2* (sucrose transporter 1 and 2). Estos autores mencionan que el ácido abscísico (ABA) y ácido antranílico (precursor del ácido indolacético, AIA) exógenos incrementaron la frecuencia de regeneración en arroz en un 10 y 35%, respectivamente, hipotetizando que un incremento de AIA a consecuencia del estrés osmótico, fue la principal señal para la formación de embriones somáticos.

Estudios en arroz mencionan que una concentración de 20 g L<sup>-1</sup> de sorbitol en el medio, propició un efecto positivo en el número de embriones somáticos (Al-Kaaby *et al.*, 2013) y en la frecuencia de regeneración (Ul Hassan *et al.*, 2009). En *Arabidopsis thaliana* altas concentraciones de sorbitol (75 mM) causaron inhibición en el crecimiento, dicha respuesta no fue observada cuando las plantas fueron sometidas a estrés osmótico con manitol (Claeys *et al.*, 2014).

#### **4.2.6. Totipotencia y recalcitrancia celular**

El concepto de totipotencia es inherente a la teoría celular de Schleiden y Schwann, los cuales reconocieron a la célula como la unidad elemental principal de todos los organismos vivos (Vasil, 2008). La totipotencia es definida como la capacidad que tiene

cada célula para regenerar (Vasil, 2008) y está relacionada con el origen de la embriogénesis, dado que células totipotentes son las responsables de formar embriones somáticos.

Las células que se encuentran en estado transicional requieren de un mínimo estímulo exógeno para llegar a ser embriogénicas y estas células son definidas como competentes (Toonen *et al.*, 1994). Aún no es claro que cambios ocurren en las células somáticas para llegar a ser células embriogénicas, capaces de formar un embrión y su subsecuente desarrollo (Namasivayam, 2007). Lo cierto es que no todas las células de las plantas tienen la misma totipotencia, estudios recientes sugieren que solo un subgrupo de células pueden dar lugar a embriones (Namasivayam, 2007; Cabrera-Ponce *et al.*, 2014).

Las llamadas células competentes caracterizadas por ser pequeñas y de forma isodiamétrica, son ricas en citoplasma (Somleva *et al.*, 2000) y presentan un mayor pH en vacuolas (Pasternak *et al.*, 2002). Cuando una célula adquiere competencia embriogénica, sufre una reprogramación en los patrones de expresión de genes, fisiología y metabolismo. Esa alteración se refleja en la desdiferenciación, activación de la división celular y un cambio total de la célula (Namasivayam, 2007).

El término recalcitrante en cultivo de tejidos fue propuesto para definir una especie vegetal o una fase de desarrollo de la planta, en el cual no es posible inducir embriogénesis somática u organogénesis (Benson, 2000; Bonga *et al.*, 2010). Es decir la incapacidad de una especie vegetal para responder en condiciones *in vitro*. Dentro de las posibles causas de la recalcitrancia están; la influencia citoplásmica del núcleo de las células somáticas en estado no-reprogramado, para llevar a cabo la embriogénesis somática, inhibición del contacto entre células y la no activación de mecanismos genéticos embriogénicos (Bonga *et al.*, 2010). La recalcitrancia, también involucra el tiempo relacionado en la declinación y/o pérdida de competencia morfogenética y capacidad totipotente (Benson, 2000).

Benson (2000), menciona que el principal factor relacionado con la recalcitrancia en condiciones *in vitro* es el estrés oxidativo, pero la recalcitrancia no simplemente es una

respuesta al estrés, sino un conjunto de factores en donde ocurren cambios de orden metabólico, fisiológico y de desarrollo, algunos de los cuales tienen que ver con consecuencias deletéreas. Este autor menciona, que la respuesta de la planta al estrés oxidativo es la producción de radicales libres y sus productos tóxicos como reacción secundaria. A largo plazo algunas células pierden su protección antioxidativa contra los radicales libres y esto ocasiona una disfunción molecular y disminución progresiva de la competencia en el cultivo, la cual eventualmente lleva a la pérdida de la totipotencia.

Lo anterior apoya el dogma acerca de que explantes altos en fenólicos son especialmente susceptibles a ser recalcitrantes (Benson y Roubelakis-Angelakis, 1994), en la que los radicales libres son el factor principal de éste fenómeno, cuya respuesta está asociada a la acumulación de productos de oxidación deletérea, primaria y secundaria, los cuales pueden ser asociados a la pérdida o disminución del potencial morfogénico (Benson, 2000).

## 5. LITERATURA CITADA

- Abdallah HAL, Said AGE and Khalafalla MM (2012) Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in some wheat (*Triticum aestivum* L) cultivars grown in Sudan. African J of Biotech. 11(16): 3793-3799.
- Aina O, Quesenberry K and Gallo M (2012) Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. Crop Sci. 52:1076-1083.
- Akin DE (1989) Histological and physical factors affecting digestibility of forages. Agron. J. 81:17–25.
- Akin DE and Burdick D (1981) Relationships of different histochemical types of lignified cell walls to forage digestibility. Crop Sci. 21:577-581.
- Akin DE, Barton II FE and Coleman SW (1983) Structural factors affecting leaf degradation of old world bluestem and weeping love grass. J. Anim. Sci. 56:1434-1446.
- Akin DE & Burdick D (1975) Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. Crop Sci. 15: 661–668.
- Akoyi J, Mgotu AJ, Machuka J. van Lijsebettens M, Taracha C and Anami SE (2013) Dicamba growth regulator promotes genotype independent somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of tropical maize inbred lines. J of life Sciences. 7(7):677-689.
- Al-Kaaby HK, Abdul-Qadir LH and Kareem ME (2013) Effect of sorbitol on callus induction and somatic embryos regeneration in two local wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Journal of Basrah Researches (Sciences). 39(3):107-113.
- Alves de Brito CJF, Rodella RA, Deschamps FC (1999) Anatomia quantitativa e degradação in vitro de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). Revista Brasileira de Zootecnia 28: 223–229. <http://www.revistasbz.org>.
- Alves GF, de Figueiredo UJ, Filho ADP, Barrios SCL and do Valle CB (2014) Breeding strategies for *Brachiaria* spp. to improve productivity-an ongoing project. Tropical grasslands-Forrajes Tropicales. 2:1-3.
- Amthor J (2003) Efficiency of lignin biosynthesis: a Quantitative analysis. Annals of Botany. 91: 673-695.
- Ansley RJ, Castellano MJ and Pinchak WE (2006) Sideoats grama growth responses to seasonal fires and clipping. Rangeland Ecol Mange. 59: 258-266.

- Armstrong CI and Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*. 164:207-214.
- Asker S (1979) Progress in apomixis research. *Hereditas*. 91:231-240.
- Bai Y and Qu R (2001) Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. *Plant Breeding*. 120: 239-242.
- Bajaj Sh, Ran Y, Phillips J, Kularajathevan G, Pal S and Cohen D (2006) A high throughput *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method for functional genomics of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Cell Rep* 25:651-659.
- Basu SK and Prasad R (2011) Trends in new technological approaches for forage crop improvement. *Australian Journal of Agricultural Engineering*. 2(6):176-185.
- Benson EE (2000) Special symposium: In vitro plant recalcitrance. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance?. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 36:163-170.
- Benson EE and Roubelakis-Angelakis KA (1994) Oxidative stress in recalcitrant tissue cultures of grapevine. *Free Rad Biol Med*. 16:355-362.
- Boerjan W, Ralph J, and Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol*. 54, 519–546.
- Bonga JM, Klimaszewska KK, Von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 100:241-254. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>  
[br/scripts/revista/sbz1/Artigos/2174.pdf](http://br/scripts/revista/sbz1/Artigos/2174.pdf)
- Burris JN, Mann DGJ, Joyce BL and Stewart CN (Jr). (2009) An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass. *Bioenerg. Res*. 2:267-274.
- Buxton DR and Redfearn DD (1997) Plant limitations to fiber digestion and utilization. *The Journal of Nutrition*. 127:814S-818S.
- Buxton DR and Russell JR (1988) Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci*. 28: 553-558.
- Cabral GB, Cameiro VTC, Lacerda AL, do Valle CB, Martinelli AP and Dusi DMA (2011) Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 107: 271-282.
- Cabrera-Ponce JL, L López, CG León-Ramírez, AE Jofre-Garfias, A Verver-y-Vargas (2014) Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma*/DOI 10.1007/s00709-014-0702-4.

- Campos PDS, Gomide JA, Queiroz DS, Monteiro da SEA (2001) Correlações entre Componentes Anatômicos, Químicos e Digestibilidade *In Vitro* da Matéria Seca de Gramíneas Forrageiras. Rev. Bras. Zootec. 30(3):955-963.
- Cao MX, Huang JQ, He YL, Liu SJ, Wang CL, Jiang WZ & Wei ZM (2006) Transformation of recalcitrant turfgrass cultivars through improvement of tissue culture and selection regime. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 85: 307–316.
- Carloni E, Ribotta A, López CE, Griffa S, Quiroga M, Tommasino E, Grunberg K (2014) Somatic embryogenesis from in vitro anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. Plant Cell Tiss Organ Cult. 117:311-322.
- Carnahan HL and Hill HD. 1961. Cytology and genetics of forage grasses. The Botanical Review. 27(1): 1-162
- Casler MD and Hatfield RD (2006) Cell wall composition of Smooth Bromegrass plants selected for Divergent Fiber concentration. J. Agric. Food Chem. 54:8206-8211.
- Castillo AM, Egaña B, Sanz JM and Cistué L (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Reports 17:902-906.
- Cerling TE (1999) Paleorecords of C<sub>4</sub> plants and ecosystems. *In: C<sub>4</sub> Plant Biology*. eds. Sage RF, Monson RK. New York: Academic. pp. 445-69.
- Claeys H, S Van Landeghem, M Dubois, K Maleux, D Inzé (2014) What is stress? Dose-Response Effects in commonly used in vitro stress Assays. Plant Physiology. 165:519-527.
- Clausen (1954) Partial apomixis as an equilibrium system in evolution. Caryología 6:469-479.
- Chawla HS (2003) Plant Biotechnology: A Practical Approach, Enfield, NH: Science Publisher. p 302.
- Chen JG, Shimomura S, Sitbon F, Sandberg G and Jones AM (2001). Role of auxin-binding protein 1 in leaf cell growth. Plant J. 28: 607-617.
- Chen L, Miyasaki Ch, Kojima A, Saito A and Adachi T (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic Guinea grass (*Panicum maximum*). J. Plant Physiol. 154:55-62.
- De Oliveira LM, Paiva R de Santana JRF, Pereira FD, Nogueira RC and Silva LC (2010) Effects of cytokinins on *in vitro* mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. Cienc. Agrotec., Lavras. 34(6):1439-1445.
- Delporte F, Mostade O and Jacquemin JM (2001) Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 67:73-80.

- Dixon RA, Chen F, Guo DJ and Parvathi K (2001) The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units?. *Phytochemistry*. 57:1069-1084.
- Dodeman VL, Ducreux G and Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 48:1493-1509.
- Edwards GE, Franceschi VR and Voznesenskaya EV (2004) Single-cell C4 photosynthesis versus the dual-cell (kranz) paradigm. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:173-96.
- Feng JC, Yu XM, Shang XL, Li JD and Wu YX (2010) Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujube* Mill. ‘Huizao’. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 101:111–117.
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, Galmés J & Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment*. 31:602-621.
- Forster JW, Jones ES, Koelliker R, Drayton MC, Dumsday JL, Dupal MP, Guthridge KM, Mahoney NL, Van Zijil De Jong E and Smith K (2000) Developmental and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: Spangenberg G (ed.) *Molecular breeding of forage crops*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Franklin G, Arvinth S, Sheeba CJ, Kanchana M and Subramonian N (2006) Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segments explants. *Plant Growth Regul.* 50:111-119.
- Freter LE and Brown WV (1955) A cytotaxonomic study of *Bouteloua curtipendula* and *B. uniflora*. *Bull. Torr. Bot. Club*. 82(2): 121-130.
- Fridovich I (1986) Biological effects of superoxide radical. *Arch. of Bioch. Biophysics*. 247: 1-11.
- Gaj MA (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*. 43:27-47.
- García-González R, Quiroz K, Carrasco B, Caligari P (2010) Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Cien. Inv. Agr.* 37(3):5-30.
- Ge XJ, Chu ZH, Lin YJ and Wang SP (2006) A tissue culture system for different germplasms of indica rice. *Plant Cell Report* 25:392-402.
- González, R.S.L., Quero, C.A.R., Franco, M.O., Ramírez, A. C., Ortega, E.H.M. y Trejo, L. C. 2010. Efecto de la salinidad y la temperatura sobre el crecimiento del pasto

- Banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.)). CIENCIA ergo sum. Vol. 18(1), marzo-junio. pp.59-69.
- Gould FW (1979) The genus *Bouteloua* (Poaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden. 66(3):348-416.
- Grando MF, Chandra I, Franklin ChI & Robert G. Shatters RG Jr (2002) Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass seed explants for genetic manipulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 71: 213–222.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E and Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. Trends in Genetics. 17(10):597-604.
- Guo Y-D and Pulli S (2000) Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). Plant Cell Reports. 19:875-880.
- Ha ChD, Lemaux PG and Cho M-J (2001) Stable transformation of a recalcitrant Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) cultivar using mature seed-derived highly regenerative tissues. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 37:6-11.
- Hanna WW, Lu CY, Vasil IK (1984) Uniformity of plants regenerated from somatic embryos of *Panicum maximum* Jacq. (guinea grass). Theor Appl Genet. 67:155-159.
- Hattersley PW and Watson L (1976) C4 grasses: an anatomical criterion for distinguishing between NADP-malic enzymes species and PCK or NAD-malica enzyme species. Australian Journal of Botany. 24:279-308.
- Hojsgaard D, Klatt S, Baier R, Carman JG and Hörandl E (2014) Taxonomy and Biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. Critical Reviews in Plant Sciences. 33:414-427.
- Hu TC, Ziauddin A, Simion E and Kasha KJ (1995) Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media. I. Effects of pretreatment, Isolation methods and hormones. In vitro Cell. Dev. Biol. 31:79-83.
- Hu XR, Yang AF, Zhang KW, Wang J and Zhang JR (2006) Optimization of in vitro multiple shoot clump induction and plantlet regeneration of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84:89-98.
- Huang W-L, Ch-H Lee y Y-R Chen (2012) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 108:257-263.
- Huang WL, Tsung YC and Liu LF (2002) Osmotic stress promotes shoot regeneration in immature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). J Agric Assoc Chin 3:76–86.

- Immonen S and Antila H (1999) Cold pretreatment to enhance Green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 57:121-127.
- Ishida H, Izumi M, Wada S and Makino A (2014) Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochim Biophys Acta*. 1837:512-521.
- Ishigaki G, Gondo T, Suenaga K and Akashi R (2009) Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). *J.Jpn. Grassl. Sci.* 55:46-51.
- Jain RK, Davey MR, Cocking EC and Wu R (1997) Carbohydrate and osmotic requirements for high-frequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of indica and japonica rice varieties. *J Exp Bot* 48(3):751.
- Jain SM and Brar DS (2010) *Molecular techniques in crop improvement*. Second edition. Edit. Springer. New York.
- Jensen WA (1962) *Botanical Histochemistry. Principle and Practice*. Freeman WH & Co., San Francisco, CA. pp. 71\_91.
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev Bras de Fisio Vegl* 13:196-223.
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormone and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47:91-110.
- Joyia FA y MS Khan (2013) Scutellum-derived Callus-based Efficient and reproducible regeneration system for elite varieties of indica rice in Pakistan. *International Journal of Agricultural & Biology*. 15(1):27-33.
- Jung H (1996). Genetics manipulation of cell walls. Identification of cell Wall traits that can be manipulated to improve forage digestibility. US Dairy forage research center. Informational conference with dairy and forages industries. 9-14.
- Jung HG (1989) Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agronomy Journal*. 81:33-38.
- Karp A (1994) Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. Eds. Vasil IK, Thorpe TA. *Plant cell Tissue Culture*. Kluwer. pp.139-151.
- Kaur P and Kothari SL (2004) *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. *Plant Cell, Tiss. & Organ Culture*. 77: 73-79.
- Khatun R, Islam SMS and Miah MAB (2010) Studies on plant regeneration efficiency through *in vitro* micropropagation and anther culture of twenty five rice cultivars in Bangladesh. *Journal of Applied Sciences Research*. 6(11):1705-1711.

- King C, McEnry J, Richardson M and O'Kiely P (2013) Characterization for industrial purposes of the fibre anatomy of perennial ryegrass and tall fescue stem and leaf at three stages in the primary growth. *Grass and Forage Science*. 69:64-73.
- Kuhbauch W and Bestajovsky J (1985) Determination of lignin concentration and digestibility in stem tissue of alfalfa by means of quantitative image analysis. *Proc. XV Int. Grassld. Congr.* pp.825-827.
- Kultonow AM and Tucker MR (2008) Functional embryo sac formation in *Arabidopsis* without meiosis- one step towards asexual seed formation (apomixis) in crops?. *J. Biosci.* 33:309-311.
- Lee Sh-T y W-L Huang (2014) Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation. *Plant growth Regulators*. 73:193-204.
- Lenis-Manzano SJ (1998) Desenvolvimento de un método de transformação genética de *Brachiaria* sp. por bombardeamento de partículas. MSc. Thesis. Universidade de Brasília, Brasília, p 131.
- Lenis-Manzano SJ, Guerra de AAC, Borges do VC, Santana E de F y de Campos CVT (2010) Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília. 45(5): 435-441.
- Lewis NG and Yamamoto E (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 41:455-496.
- Li W, Masilamany P, Kasha KJ and Pauls KP (2002) Developmental, tissue culture, and genotypic factors affecting plant regeneration from shoot apical meristems of germinated *Zea mays* L. seedlings. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 38:285–292
- Lichtenthaler HK (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 851:187-198.
- Maiti R, Rodríguez HG (2010) Plant architecture determines the productivity potential of a crop: A biochemical genetics tool. *IJBSM*, 1: 1–3
- Major RL and Wright LN (1974) Seed dormancy characteristics of sideoats Gramagrass, *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.1. *Crop Science*. 14(1): 37-40.
- Makino A (2011) Photosynthesis, grain yield and nitrogen utilization in rice and wheat. *Plant Physiology*. 155:125-129.
- Makino A and Osmond B (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplast and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology*. 355-362.

- Makino A, Sakuma H, Sudo E and Mae T (2003) Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiology*. 44:952-956.
- Mancini M, Voitovich N, Permingeat HR, Podio M, Siena LA, Ortiz JPA, Pessino SC and Felitti SA (2014) Development of a modified transformation platform for apomixis candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant Sciences*. 50:412-424
- Miermont A, F Waharte, S Hu, MN McClean, S Bottani, S Léon, P Hersen (2013) Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *PNAS*. 110(14): 5725-5730.
- Mirlohi AF, Thompson LF, Dilday RH, Huang FH and Al-Khayri JM (1989) *In vitro* culture of several rice cultivars. *Proceedings Arkansas Academy of Science*. Vol. 43:
- Moing A, Carbonne F, Rashad MH and Gaudillière (1992) Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiol* 100(4):1878–1884.
- Monties B (1991) Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites –Relations with lignin structure and function, *Anim. Feed Sci. Technol*. 32: 159–175.
- Murthy BNS, Murch SJ and Saxena PK (1998) Review. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 34:267-275.
- Mustafa G and Khan MS (2012) Reproducible *in vitro* regeneration system for purifying sugarcane clones. *African Journal of Biotechnology*. 11(42): 9961-9969.
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 90:1-8.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Feher A (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant physiology*. 129:1807-1819.
- Piquemal J, Chamayou S, Nadaud I, Beckert M, Barriere Y, Mila I, Lapierre C, Rigau J, Puigdomenech P, Jauneau A, Digonnet C, Boudet A-M, Goffner D and Pichon M (2002) Down-Regulation of caffeic acid O-Methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. *Plant Physiology*. Vol.130:1675-1685.
- Prasad K and Prabhu GK (2012) Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained in medical research-a review. *J Med Syst*. 36(4):2621-2631.
- Quero CAR, Morales NCR, Miranda JL y Enríquez QJF (2003) Recursos genéticos de gramíneas forrajeras nativas. El complejo agámico de zacate banderita

- Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. XXXIX. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México. p. 424. Resumen.
- Radice S (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Cap.2. Morfogénesis. Ed. INTA. Editores: Levitus G, Echenique V. Rubinstein C, Hopp E y Mroginski L. ArgenBio. Argentina. p 647.
- Rakshit S, Rashid Z, Sekhar JC, Fatma T and Dass S (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 100:31-37.
- Ralph J, Bunzel M, Marita JM, Hatfield RD, Lu F, Kim H, Schatz PF, Grabber JH, and Steinhart H (2004). Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem. Rev.* 3, 79–96.
- Ralph J, Grabber JH and Hatfield RD (1999) Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharides esters in ryegrass lignins. *Carbohydrate Research.* 275:167-178.
- Rueb S, Leneman M, Schilperoot RA and Hensgens L (1994) Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36: 259–264.
- Sage RF, Li M and Monson RK (1999) The taxonomic distribution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *In: C<sub>4</sub> Plant Biology.* eds. Sage RF, Monson RK. New York: Academic. pp. 551-84.
- Sailer Ch, Schmid B, Stöcklin J and Grossniklaus U (2014) Sexual *Hieracium pilosella* plants are better inter-specific competitors. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics.* 16:43-51.
- Sarkanen KV and Hergert HL (1971) Classification and distribution. *In: Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions.* Sarkanen KV, Ludwig CH (eds). Wiley-Interscience, New York. pp. 43-93.
- Savidan Y (2000) Apomixis, genetics and breeding. *Plant Breed. Rev.* 18:13-86
- Shen Y, Jiang Z, Yao X, Zhang Z, Lin H and Zhao M (2012) Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation. *PLOS ONE.* DOI: 7(3) 10.1371/journal.pone.0032237  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032237#pone-0032237-g004>
- Sikdar MSI and Kim J-S (2010) Characterization of a gene encoding for dihydrodipicolinate synthase from rice. *Aust. J. Crop Sci.* 4(6):61-466.

- Sokupová J and Albrechtová J (2003) Image analysis-tool for quantification of histochemical detections of phenolic compounds, lignin and peroxisases in needles of Norway spruce. *Biologia Plantarum*. 46 (4): 595-601.
- Sokupová J, Rock BN, Albrechtová J (2001) Comparative study of two spruce species in a polluted mountaineous region. *New Phytol*. 150: 133-145.
- Solís-Ramos LY, Andrade-Torres A, Sáenz CLA, Oropeza SCM and Castaño de la SE (2012) Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants. *Embryogenesis*. Edited by Dr. Ken-Ichi Sato. pp. 597-618. ISBN:978-953-51-0466-7. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35583.pdf>
- Somleva MN, Schmidt EDL and De Vries S (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep*. 19:718-726.
- Spangenberg G, Kalla R, Lidgett A, Sawbridge T, Ong EK and John U (2000) Breeding forage plants in the genome era. In: Spangenberg G. (ed.) *Molecular breeding of forage crops*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Stafford HA (1962) Histochemical and biochemical differences between lignin-like materials in *Phleum pratense* L. *Plant Physiol*. 37:643-649.
- Stephens LC, Fei S-Z, Xiong Y and Hodges CF (2006) Plants regenerated from embryo cultures of an apomictic clone of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L. "Baron") are not apomictic in origin. *Euphytica*. 147:383-388.
- Swedlund B and RD Locy (1993) Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant physiology*. 103:1339-1346.
- Swedlund B and Vasil, IK (1985) Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Theor Appl Genet*. 69:575-581.
- Takai T, Adachi S, Taguchi-Shiobara F, Sanoh-Arai, Iwasawa N, Yoshinaga S, Hirose S, Taniguchi Y, Yamanouchi U, Wu J, Matsumoto T, Sugimoto K, Kondo K, Ikka T, Ando T, Kono I, Ito S, Shomura A, Ookawa T, Hirasawa T, Yano M, Kondo M & Yamamoto T (2013) A natural variant of NAL1, selected in high-yield rice breeding programs, pleiotropically increases photosynthesis rate. *Scientific Reports*. 3,2149:1-11. DOI:10.1038/srep02149.
- Thorpe TA (2007) History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol*. 37: 169-180.
- Tiburcio AF, Figueras X, Claparols I, Santos M and Torné JM (1991) Improved plant regeneration in maize callus cultures after pretreatment with DL-alpha-difluoromethylarginine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27:27-32.

- Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt Ed DL, Verhoeven HA, Van Kammem A, de Vries SC (1994) Description of somatic embryo forming single-cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta*. 194:565-572.
- Ul Hassan M, Ahmed Z, Munir M, Malik SI and Shahzad K (2009) Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*. 8(23):6529-6535.
- USDA (2011) El Reno sideoats grama. <http://www.plant-materials.usda.nrcs.gov/>.
- Vallet C, Chabbert B, Czaninski Y and Monties B (1996) Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Annals of Botany*. 78:625-632
- Van Dijk P and Van Damme J (2000) Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends in Plant Science*. 5(2):81-84.
- Vasil IK (2008) A history of plant biotechnology: from the cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep*. 27:1423-1440.
- Vasil IK and Vasil V (1994) *In vitro* cultures of cereals and grasses. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds). *Plant Cell and Tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p 293.
- Wada S, Hayashida Y, Izumi M, Kurusu T, Hanamata S, Kanno K, Kojima S, Yamaya T, Kuchitsu K, Makino A and Ishida H (2015) Autophagy supports biomass production and nitrogen use efficiency at the vegetative stage in rice. *Plant Physiology*. 168:60-73.
- Wang M, van Bergen S and van Duijn B (2000) Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant physiology* 124:523-530.
- Wang W, Zhao X, Zhuang G, Wang S and Chen F (2008) Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 95:57-67.
- Wang X, Hoshino Y and Yamada T (2010) Rapid and efficient callus induction and plant regeneration from seeds of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Jpn Soc Grassl Sci*. 56:198-204.
- Warner DA and Edwards GE (1989) Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll, and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C4 Dicot *Atriplex confertifolia*. *Plant Physiol*. 91:1143-1151.
- Wei ZM, Kyo M and Harada H (1986) Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv 'Sabarlis. *Theor Appl Genet*. 72:252-255.

- Whetten R and Sederoff R (1995) Lignin biosynthesis. *Plant cell* 7:1001-1013.
- Wilson D and Cooper JP (1970) Effect of selection for mesophyll cell size on growth and assimilation in *Lolium perenne* L. *New Phytol.* 69:233-245.
- Wilson JR (1993) Organisation of forage plant tissues. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, eds. *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: American Society of Agronomists. 1-27.
- Wittenberg KM, Thomsett EC and Ames N (1993) Use of histochemistry, section-to-slide digestion and image analysis for evaluation of digestibility in reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) genotypes. *Can. J. Anim. Sci.* 74:83-89.
- Xiong L, Schumaker KS and Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell.* 14: S165-S183.
- Xu ZZ and Zhou GS (2008). Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J Exp Bot*, **59**: 3317–3325
- Yip W-K and Yang Sh F (1986) Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems. *Plant Physiol.* 80:515-519.
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell.* 5:1411-1423.

## CAPÍTULO I

### TIPOS DE TEJIDO Y CONTENIDO DE LIGNINA EN GENOTIPOS DE *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., RELACIONADOS CON SU DIGESTIBILIDAD

Álvaro Bernal-Flores<sup>1</sup>; Adrián Raymundo Quero-Carrillo<sup>1</sup>,  
Hilda Araceli Zavaleta-Mancera<sup>1</sup>, Paulino Pérez-Rodríguez<sup>1</sup>,  
María Esther Ortega-Cerrilla<sup>1</sup>, Jorge López-Carrasco<sup>1</sup> y Zengyu Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo. Estado de México.

<sup>2</sup>The Samuel Roberts Noble Foundation. Forage Improvement Division. 2510. Sam Noble Parkway, Ardmore. Oklahoma.

#### RESUMEN

El pasto banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.), es una especie forrajera nativa C<sub>4</sub>, con gran diversidad genética, adaptada a regiones áridas y semiáridas del Norte de México y sur de los EE.UU. Para determinar ecotipos sobresalientes con base en la digestibilidad en tipos de tejidos y deposición de lignina en hoja de 30 ecotipos, los cuales habían sido agrupados con base en la producción forrajera como; bueno, medio y pobre. Se utilizó un análisis multivariado y se evaluaron tres hojas (n=3) por ecotipo a edad de 20, 45 y 65 días de rebrote. Un total de 18 imágenes por hoja y ecotipo fueron analizadas mediante análisis de imágenes. Se realizaron cortes transversales de hoja a 20, 45 y 65 días de edad para determinar la proporción promedio en los tipos de tejidos y deposición de lignina en el tiempo. Dos secciones de tejidos correspondientes a nervaduras principales (NP) y secundarias (NS) fueron segmentadas y analizadas mediante análisis de imágenes, usando dos software (*GIMP 2.8*, *Image Tool*). Los tipos de tejidos de ambas nervaduras fueron agrupados como; tejidos altamente digestibles (TAD), tejidos con baja digestibilidad (TBD) y tejidos no digestibles (T no-D). Los datos fueron analizados mediante Componentes Principales (ACP) y un Modelo Mixto. Tres de los ocho componentes explicaron más del 90% de la variabilidad anatómica encontrada en los ecotipos evaluados. Diferencias significativas (P<0.01) fueron observadas entre tipos de tejidos para NP y NS. Las NS presentaron un 15% más TAD que las NP. Los tejidos con mayor área como; mesófilo (28%), células buliformes (23%) y vaina del haz (20%) representaron más del 70% del área

foliar total. En promedio la hoja de *B. curtipendula* está compuesta por 58% de TAD, 33% TBD y 9% de T no-D. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre tipos de tejidos para los genotipos evaluados; los ecotipos e-16, e-18, and e-55, mostraron las mayores áreas foliares, siendo el mesófilo el tejido con mayor área en la hoja (28%). El genotipo e-16 mostró los mejores atributos forrajeros para TAD (56.8%) y moderado contenido de lignina (5.3%). La deposición de lignina en los tejidos no esta en función del área foliar total y una relación inversa fue observada entre la deposición de lignina y digestibilidad de tejidos.

**Palabras clave:** Anatomía e histología de hoja, análisis de imágenes, deposición de lignina, pasto banderita.

**TISSUE TYPES AND RELATIVE LIGNIN CONTENT IN *Bouteloua curtipendula*  
(Michx.) Torr., GENOTYPES RELATED WITH ITS DIGESTIBILITY**

**ABSTRACT**

Sideoats grama *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., is a native C<sub>4</sub> forage species possessing wide genetic diversity, and well adapted to arid and semiarid regions of northern Mexico and southern USA. In order to determine outstanding ecotypes based on the digestibility of tissue types and lignin deposition on several ages of leaf sprouting, 30 ecotypes were evaluated, grouped according to forage production as good, medium and poor. Leaf cross sections of 65 days old were used to determine the proportion of tissue types using image analysis (IA). Two tissue sections corresponding to large vein (NP) and small vein (NS) were segmented and analyzed by AI, using two software (GIMP 2.8, Image Tool). Tissue types in veins both were agrouped as; highly digestible tissue (TAD), low digestible tissue (TBD), and non-digestible tissue (T no-D). Data were analyzed by Principal Components and Mixed Model. Two tissue sections corresponding to Main Veins (NP) and Secondary Veins (NS) were segmented and analysed. Three of the components explained more than 90% of anatomical variability found in the ecotypes. Significant differences (P<0.01) were observed between tissue types for NP and NS. The NS had a 15% higher TAD than NP. Tissues with larger area as; mesophyll (28%), buliform cells (23%), and bundle sheath (20%) make up 70% of the total foliar transversal area. In average, *B. curtipendula* leaf consist of 58% TAD, 33% TBD and 9% T no-D. Significant differences (P<0.01) among tissue types for ecotypes were observed; ecotypes e-16, e-18, and e-55 showed the highest leaf areas, mesophyll tissue showed the highest area (28%). Genotype e-16 showed the best forage attributes for TAD (56.8%), and moderate lignin content (5.3%). An inverse relationship was observed between lignin deposition and tissue; interestedly, the amount of lignin was not function of the total sectional area.

**Key words:** Grass leaf histology, image analysis, lignin aggregation, sideoats grama.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., es una especie forrajera perene nativa de México y EE.UU. con genotipos diploides e individuos aneuploides con ciertos niveles de ploidía ( $2n=2x=20$  a  $2n=8x=80$ , ó más) (Gould, 1959), con vía fotosintética  $C_4$ , adaptada a zonas áridas y semiáridas, tolerante al pastoreo, resistente a sequía, buen valor nutricional (Pitman y Jaynes, 1980; USDA, 2011) y presenta ligera tolerancia a la salinidad (González *et al.*, 2010). Dado sus atributos forrajeros y su naturaleza perene, es de gran importancia como especie clave para pastoreo en las zonas áridas (USDA, 2011).

La amplia variabilidad genética interespecífica en los forrajes, es un atributo útil en trabajos de selección y mejoramiento genético para mejorar sus cualidades alimenticias. En ese sentido, la estructura anatómica foliar de las plantas, ha sido estudiada desde la década de los 70's con la finalidad de predecir el valor nutritivo (Akin y Burdick, 1975; Hattersley y Watson, 1976) y su relación entre componentes anatómicos y digestibilidad, han sido determinadas en diferentes tipos de células (Wilson, 1993). Las características anatómicas y estructurales a nivel celular, están relacionadas con atributos forrajeros de las plantas, tales como; tasa de digestión (Jung y Allen, 1995), digestión de la fibra (Akin y Burdick, 1975;) y grosor de la pared celular (Wilson y Mertens, 1995).

La variación en el grosor de la pared celular de tejidos como; epidermis, esclerénquima y parénquima, son los principales factores determinantes de una baja calidad forrajera en pastos  $C_4$  (Echineque *et al.*, 2008). Los niveles de monosacáridos y polisacáridos de la pared puede variar debido a que tienen diferente función (Casler y Hatfield, 2006). En hoja, los tejidos de mesófilo y floema son altamente degradables (Akin, 1989), el mesófilo es de gran importancia en la fotosíntesis de la planta por presentar altas concentraciones de cloroplastos (Yamasaki *et al.*, 1996), en ellos se encuentra aproximadamente el 80% del total de nitrógeno, donde el cloroplasto contiene el 70% de la proteína de la hoja (Makino y Osmond, 1991; Wada *et al.*, 2009) y no presenta lignificación (Buxton y Redfearn, 1997). El floema al igual que el mesófilo no presenta

lignificación en todos los estados de crecimiento (Wittenberg *et al.*, 1993), debido a ello, es el primer tejido en degradarse (Travis *et al.*, 1997).

La epidermis y la vaina del haz son parcialmente y lentamente digeridas (Akin, 1989). El esclerénquima son células originadas de tejido primario, sus paredes secundarias son altamente lignificadas y constituyen el principal tejido de soporte en plantas vasculares (Vallet *et al.*, 1996). El esclerénquima y el xilema en hoja, presentan una correlación negativa con la proteína de la hoja (Campos *et al.*, 2001). Comúnmente las hojas y tallos de los pastos presentan menor digestibilidad que la de leguminosas. El contenido de mesófilo es menor en pastos C<sub>4</sub> que en pastos C<sub>3</sub>, de ahí que los pastos C<sub>4</sub> sean de menor digestibilidad (Buxton y Redfearn, 1997). Otras características como el nivel de ploidía (Warner y Edwards, 1989) y la ruta fotosintética están estrechamente relacionados con la proporción de tejido digestible en la hoja (Hattersley y Watson, 1976) y pueden contribuir a diferencias en el valor nutritivo de las especies. La variación genética entre genotipos, también es un componente que ha tenido respuestas significativas con la digestibilidad del forraje y otras variables evaluadas, determinantes en la selección de especies (Wittenberg *et al.*, 1993).

La histoquímica ha sido una herramienta útil para el estudio de las características anatómicas de las plantas, proporciona información acerca de la abundancia y distribución de un tipo celular o grupo de tejidos (Sokupová y Albrechtová, 2003) y es una técnica útil para nutricionistas y mejoradores para el desarrollo de forrajes de mayor calidad (Wittenberg *et al.*, 1993; Jung, 1996; Buxton y Redfearn, 1997). El análisis de imágenes ha permitido obtener datos más precisos y detallados de áreas, formas y otros atributos morfológicos (Sokupová *et al.*, 2001) realizando mejores comparaciones en diferentes tejidos, tratamientos, etc. (Sokupová y Albrechtová, 2003). Por las altas correlaciones reportadas (0.90-0.96), entre los resultados obtenidos en análisis de imágenes y las concentraciones de lignina en diferentes especies (Kuhbauch y Bestajovsky, 1985), ha sido ampliamente utilizada en estudios anatómicos. Así el análisis de la estructura anatómica es un buen indicador de la calidad de los forrajes (Chamorro *et al.*, 2005a), mediante la determinación en la proporción de tejidos altamente disgestibles.

La tinción histoquímica de lignina mediante ácido fluoroglucinol el cual reacciona con unidades coniferilos o cloruro de sulfito que reacciona con unidades siringil, es uno de los métodos más rápidos y disponibles para determinar la presencia de lignina en tejidos vegetales (Stafford, 1962). La lignina es el principal factor que afecta la digestibilidad de la pared celular vegetal, más que la digestibilidad total del forraje, su composición y estructura varía considerablemente entre especies y genotipos. En pastos C<sub>4</sub> las concentraciones de *p*-cumarato son mayores en comparación con pastos C<sub>3</sub> (Jung y Allen, 1995) y es el único componente de la pared celular que se incrementa consistentemente con el avance de la madurez, su incremento y concentración es variable dependiendo el tipo de tejidos (Casler y Hatfield, 2006). El proceso de lignificación en gramíneas se presenta continuamente, el ácido ferulico se deposita más rápidamente en los primeros estados de lignificación, mientras que el ácido *p*-cumárico se deposita constantemente durante todo el proceso (He y Terashima, 1991). Se han reportado correlaciones negativas han sido reportadas entre la concentración de lignina y la digestibilidad del forraje (Jung, 1996; Queiroz *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001). Los tejidos altamente lignificados (xilema, esclerénquima) presentan una fuerte resistencia a la degradación ruminal (Chamorro *et al.*, 2005b), sin embargo los polímeros de lignina con mayor cantidad de unidades siringilicas son más fácilmente colonizadas por microorganismos del rumen comparadas con aquellas de mayor cantidad de unidades guaiacilicas (Christiernin, 2008). Por consiguiente, la digestibilidad puede ser mejorada reduciendo la cantidad de células lignificadas mediante un programa de mejoramiento de selección de cultivares (Jung, 1996; Buxton y Redfearn, 1997).

Los ecotipos de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr) colectados en varios estados de la República Mexicana, fueron comparados mediante técnicas histológicas usando análisis de imágenes para la determinación de áreas en tejidos vegetales y deposición de lignina. La selección y mejoramiento de especies sobresalientes es una forma para crear nuevos cultivares con incrementos en la digestibilidad de la materia seca, a partir de la cantidad de lignina y relación de tejidos, empleando técnicas histoquímicas detalladas mediante análisis de imágenes.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron treinta ecotipos de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.) provenientes de una colecta a nivel nacional ubicada en el *Campus* San Luis Potosí del Colegio de Postgraduados. El material vegetal fue recolectado en el año 2010-2011. Los ecotipos fueron divididos en tres grupos; alto potencial forrajero, mediano potencial forrajero y bajo potencial forrajero (Morales-Nieto *et al.*, 2006). La preparación y análisis de muestras fueron realizadas en el Laboratorio de histoquímica del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo.

### 2.1. Procesamiento de muestras

#### 2.1.1. Material vegetal

Se colectaron tres hojas basales de la corona principal a edad de rebrote de 20,45 y 65 días. Las hojas muestreadas fueron puestas inmediatamente en fijador FAA (10% Formaldehído, 5% ácido acético, 52% de etanol y 33% de agua) (Jensen, 1962) para su conservación y posterior utilización. Posteriormente el tejido fue colocado en GAA (25% glicerina, 25% agua y 50% etanol) 8 días previos a la realización de los cortes de las láminas foliares. Las muestras fueron cortadas en fragmentos de 1 centímetro por el ancho total de la lámina foliar y puestas nuevamente en FAA durante 24 horas, posteriormente fueron lavadas con agua corriente por 30 minutos. Las muestras fueron deshidratadas en un intercambiador automático de tejidos (Fisher Tissuematon) que contenía una serie de soluciones con etanol y xileno (v/v): etanol 30%, etanol 40%, etanol 50%, etanol 70%, etanol 85%, etanol 100% (1 y 2), alcohol etílico 50% - xileno 50% y xileno puro (1,2,3) los cambios se realizaron automáticamente cada 6 horas. Se realizaron cortes transversales de hoja de 15  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótopo de rotación (American optical, Spencer 820) y almacenados a temperatura de 4 °C durante 2 días. Las secciones de tejido fueron colocados sobre portaobjetos con adhesivo de alumbre de cromo ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) y puestos en una platina a temperatura de 45 °C durante 3 minutos.

### 2.1.2. Tinción

Las muestras fueron mantenidas por 24 horas a 45 °C y posteriormente desparafinadas utilizando las siguientes soluciones (v/v); xileno absoluto (1, 2 y 3), alcohol absoluto (1 y 2), alcohol 85%, alcohol 70%, alcohol 50%, por 3 minutos en cada solución; posteriormente fueron incubadas durante la noche en O-safranina a temperatura ambiente. Las muestras fueron teñidas con verde fijo (Johansen, 1940). Los tejidos fueron infiltrados y embebidos en resina sintética. La presencia de lignina fue corroborada con fluoroglucinol (2% en etanol) y HCl (50%) (Ruzin, 1999).

### 2.1.3. Microscopía y análisis de imágenes

Se utilizó un microscopio Zeiss Axiostar pluss y una cámara Moticam 2000, 2.0MP de alta resolución, fijada al microscopio para la toma de imágenes digitales. Con base en la digestibilidad, los tejidos fueron agrupados en; Tejidos Altamente Digestibles (TAD), Tejidos de Baja Digestibilidad (TBD) y Tejidos no-Digestibles (T no-D). Para propósitos descriptivos en la presente investigación la estructura de la hoja fue dividida en; NP: nervadura central refiriéndose a haces vasculares principales+vaina del haz+parénquima+mesófilo+células buliformes+extensión de la vaina lignificada y epidermis; NS: nervadura secundaria refiriéndose a haces vasculares secundarios+vaina del haz+parénquima+mesófilo+células buliformes+extensión de la vaina no lignificada y epidermis (Fig. 1A). Se analizaron tres hojas por genotipo y seis secciones por hoja, correspondientes a tres NP y tres NS. Un total de 18 imágenes por genotipo fueron segmentadas (Fig. 1B) con el software *GIMP 2.8* (GNU, 2010) y diferentes áreas de tejido fueron calculadas mediante el software Image Tool para Windows (versión 3.00; University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA). Las variables analizadas fueron: mesófilo, células buliformes, vaina del haz, epidermis, xilema, floema, extensión de la vaina del haz no lignificada y lignificada. La deposición de lignina fue identificada por el color rojo sobre la pared celular en todos los tejidos, para las tres edades de rebrote.

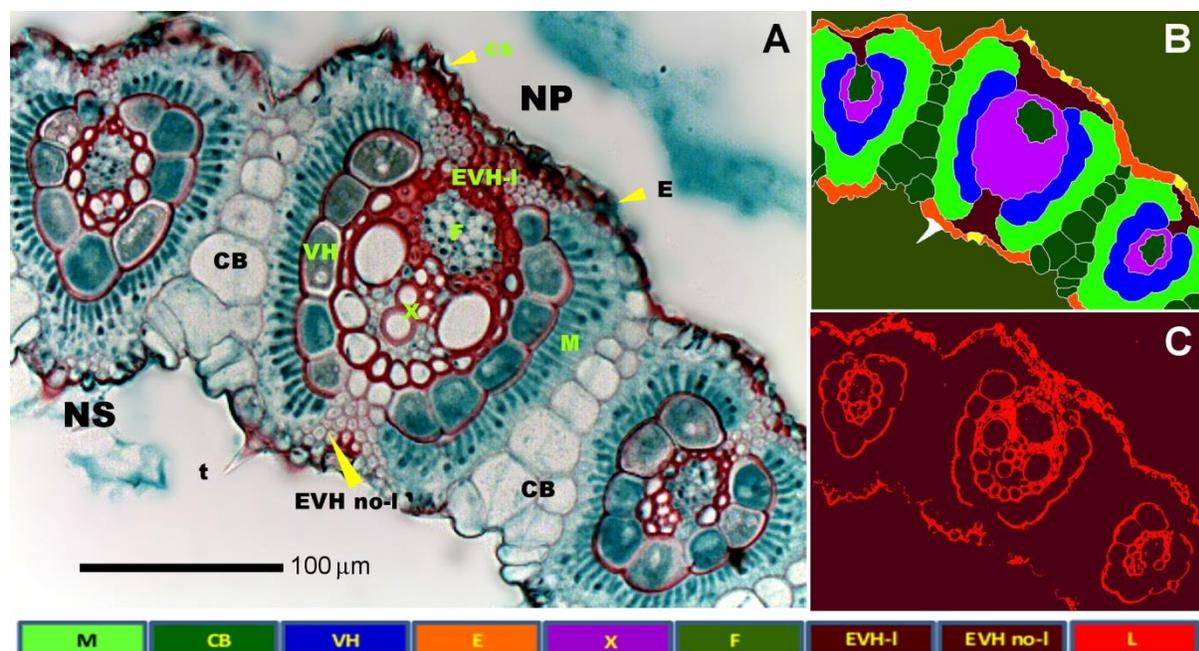


Figura 1. Corte transversal de hoja en *B. curtipendula*. A) Nervadura principal (NP), nervadura secundaria (NS) y diferentes tejidos asociados, con deposición de lignina (15  $\mu\text{m}$ , objetivo X20); B) Imagen mostrando deposición de lignina usando el software *Image Tool*. Color rojo indica la presencia de lignina. C) Segmentación de imagen para medición de áreas, usando el software *GIMP.2.8*. M: mesófilo; CB: células buliformes; BS: vaina del haz; E: epidermis; X: xilema; F: floema; EVH-I: extensión de la vaina del haz lignificada; EVH no-I: extensión de la vaina del haz no lignificada; L: lignina; sc: células de sílice; t: tricoma.

Las imágenes fueron procesadas usando *GIMP 2.8* y su análisis fue realizado mediante *Image Tool* (Fig 1C). Una imagen treshold fue obtenida para determinar los porcentajes de lignina a edad de 20, 45 y 65 días de rebrote.

#### 2.1.4. Análisis estadístico

Se analizaron 3 hojas por ecotipo a diferente edad y los datos fueron analizados mediante un análisis multivariado (MANOVA, Análisis de Componentes Principales (ACP)) y ANOVA para cada variable, usando SAS para Windows versión 9.1.3 (SAS, 2004). Se graficaron los dos primeros componentes principales para visualizar la similitud entre ecotipos en los diferentes componentes anatómicos. Los datos de

contenido de lignina se les aplicó la transformación arco seno y posteriormente fueron analizados mediante un modelo mixto. Se utilizó una comparación de medias mediante Tukey utilizando un nivel de significancia del 5% para todas las variables.

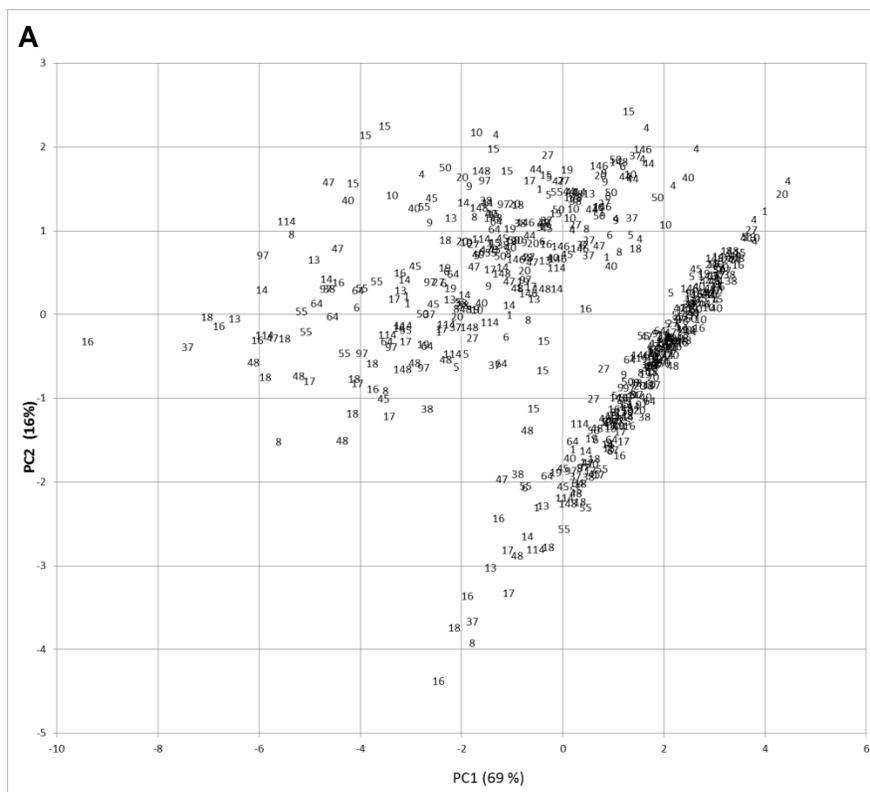
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Análisis de Componentes Principales.* Se observaron dos grupos de ecotipos bien definidos (Fig. 2A), que indican diferencias anatómicas foliares entre áreas para los tipos de tejidos evaluados. El grupo I mostró un grupo homogéneo y compacto, integrado por aquéllos con mayor área en sus tejidos; mientras que el grupo II presentó mayor variabilidad e incluye un mayor número de ecotipos, presentando mayor dispersión entre ellos. Tres componentes (PC1=mesófilo, PC2=células buliformes y PC3=vaina del haz), explicaron el 91% de la variación encontrada entre ecotipos (Fig. 2B). Éstos mostraron la mayor variación y diferencias estadísticas ( $P < 0.01$ ), el 9 % de la variación fue explicada por cinco componentes que incluyen tejidos de PC4=epidermis, PC5= xilema, PC6=floema, PC7=extensión de la vaina del haz-lignificada y PC8=extensión de la vaina del haz no lignificada. En estos componentes no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) para este grupo.

La explicación de la variabilidad anatómica en este estudio, es muy superior al encontrado en polimorfismo, donde se reportan que dos de los componentes principales explicaron solo el 21.8% de la variación total, de 10 componentes evaluados para *Bouteloua curtipendula* (Morales-Nieto *et al.*, 2006), poniendo de manifiesto la presencia de un mayor número de factores para explicar la variabilidad genética en esta especie. En Poaceae la variación anatómica de tejidos en mesófilo, parénquima y células de esclerénquima presentan gran variación en tamaño y forma, afectando notablemente su área (Buxton y Redfearn, 1997).

El área total de tejidos en la hoja tiene gran repercusión sobre la cantidad de tejido digestible y éstos presentaron diferencias estadísticas ( $P < 0.01$ ) entre ecotipos (Cuadro 1). La proporción total en nervaduras principales (NP) para TAD, TBD y T no-D, fue del 50.7%, 32.5% y 16.6%, respectivamente. Marcadas diferencias fueron observadas en T no-D entre NP (16.6%) y nervadura secundaria (NS; 3%). El área promedio para NS

fue de solo un 62% con respecto a NP, pero las NS mostraron un 65% de TAD, 15% mayor que lo observado en NP.

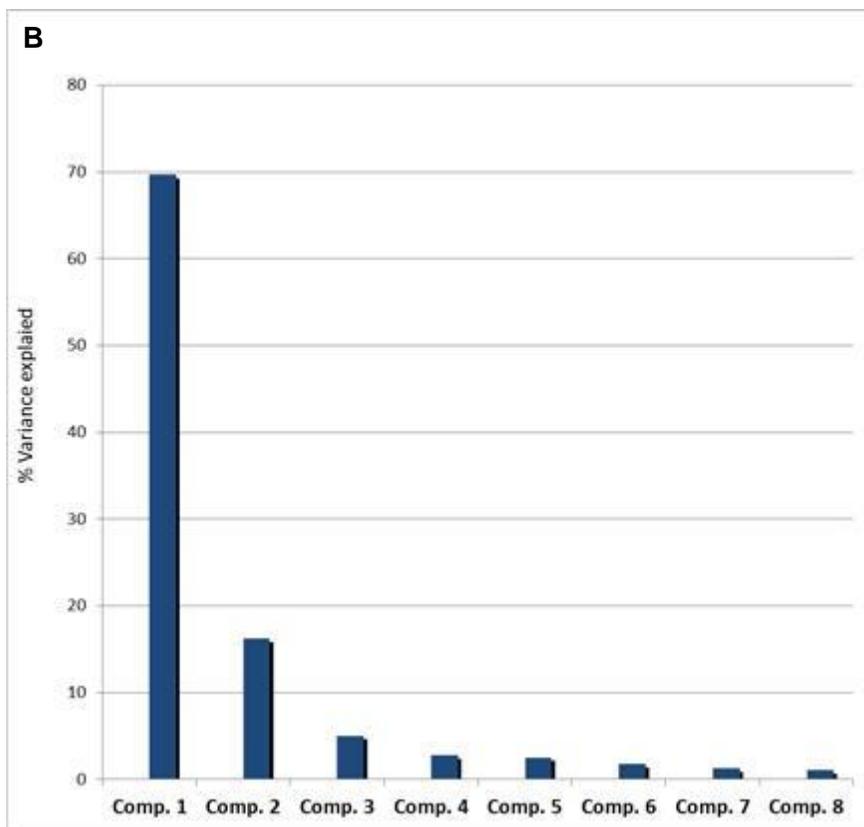


**Figura 2. Componentes Principales (PC1 y PC2) para descriptores de composición de hoja entre ecotipos de *Bouteloua curtipendula*, mediante análisis multivariado.**

Los resultados indican que la digestibilidad de éste pasto, está estrechamente relacionada con la densidad y tamaño de las áreas de tejidos en las nervaduras, principal y secundaria, por ello, especies con mayor densidad de NS probablemente sería una planta más digestible.

Las NP han sido asociadas con el transporte de agua y minerales, su área total es considerada mayor que las NS. La NP mostró mayor cantidad de área para TBD y T no-D, debido a la mayor cantidad de tejido vascular (principalmente xilema) y

extensión de la vaina del haz (lignificada y no lignificada). Esos tejidos mostraron un 14% mayor de área comparado con los NS.



**Figura 3. Explicación de la variabilidad total, en hoja de ecotipos en *Bouteloua curtipendula*, usando un análisis multivariado. Donde: Comp.1= células buliformes; Comp.2= mesófilo; Comp.3= vaina del haz; Comp.5= xilema; Comp.6= Floema; Comp.7= Epidermis; Comp.8= Extensión de la vaina no lignificada y lignificada.**

En promedio, la hoja de *B. curtipendula* evaluada en 30 ecotipos mostró un 58% de TAD, 33% TBD y 9% de T no-D. Chamorro *et al.* (2005a) en *B. repens*, reportaron valores promedios de 56.7%, 12.7% y 30.5% en dos épocas de estudio en tejidos altamente degradables, parcialmente degradables y no degradables, respectivamente.

Varios factores afectan la digestibilidad de los tejidos en plantas, los tejidos lignificados son determinantes en la baja calidad forrajera, formando bloques multicelulares difíciles de ser digeridos (Echenique *et al.*, 2008), así como el espesor de la pared celular (Campos *et al.*, 2001) y la cantidad de mesófilo en la hoja (Campos *et al.*, 2002).

**Cuadro 1.** Determinación de áreas para tipos de tejidos que conforman la hoja de *Bouteloua curtipendula*, con base en su digestibilidad. Los datos son promedio de 30 ecotipos (promedios  $\pm$  EEM; n=30).

Tipos de nervadura	Tejidos altamente digestibles ( $\mu\text{m}^2$ )			Tejidos de baja digestibilidad ( $\mu\text{m}^2$ )			Tejidos no digestibles ( $\mu\text{m}^2$ )	
	CB	M $\bar{X} \pm EEM$	F	VH	E $\bar{X} \pm EEM$	EVH no-I	X $\bar{X} \pm EEM$	EVH-I
NP	5 110.6 $\pm$ 631.0	6 502.9 $\pm$ 593.7	1 713.7 $\pm$ 210.2	4 814.4 $\pm$ 325.5	2 512.1 $\pm$ 216.1	1 225.4 $\pm$ 160.6	3 445.7 $\pm$ 417.8	922.4 $\pm$ 127.7
NS	4 699.3 $\pm$ 593.7	5 402.0 $\pm$ 528.6	672.0 $\pm$ 98.1	3 626.0 $\pm$ 351.1	1 686.0 $\pm$ 156.4	TA	355.9 $\pm$ 121.3	TA
Tukey <sup>†</sup>	ns	**	**	**	**		**	

<sup>†</sup>Nivel de significancia; TA= Tejido ausente; ns= No significativo; EEM= Error estándar de la media. \*\* P<0.01. CB: Células buliformes, M: mesófilo, F: floema, VH: vaina del haz, E: epidermis, EVH no-I: Extensión de la vaina del haz no lignificada, X: xilema, EVH-I: Extensión de la vaina del haz lignificada.

Se observaron diferencias significativas (P<0.01) en TAD de NP para los tres tejidos. El mesófilo fue el tejido que presentó la mayor área (5 952.4  $\mu\text{m}^2$ ; Cuadro 2). Se observó una mayor variabilidad en mesófilo y células buliformes, mientras que la variación en floema fue menor entre ecotipos. El e-16 mostró la mayor cantidad de TAD (16 494.9  $\mu\text{m}^2$ ) en hoja, siendo el mesófilo el tejido que ocupó una mayor proporción (48.9%), las células buliformes representaron un 41.4% y el floema un 9.7%. El porcentaje de área foliar en *B. curtipendula* con base en nuestros resultados es mayor al reportado para pasto Bermuda (43.7%; Campos *et al.*, 2002). El mesófilo es el tejido de mayor importancia en el proceso fotosintético de la planta, junto con el floema son considerados tejidos altamente digestibles en pastos templados y tropicales y son los primeros en sufrir degradación microbiana (Akin, 1989). Además el mesófilo constituye un factor de selección que es genético, heredable y es considerado un atributo forrajero de gran importancia en programas de mejoramiento genético.

**Cuadro 2.** Áreas promedio de tejidos altamente digestibles en 30 ecotipos de *Bouteloua curtipendula*.

Genotipo	Tejidos altamente digestibles ( $\mu\text{m}^2$ )		
	CB	M	F
	$\bar{X} \pm EEM$	$\bar{X} \pm EEM$	$\bar{X} \pm EEM$
e-01	5 012.2 $\pm$ 526.1	6 017.0 $\pm$ 376.2	1 045.6 $\pm$ 119.0
e-04	3 209.1 $\pm$ 360.8	3 820.8 $\pm$ 352.6	819.2 $\pm$ 132.1
e-05	3 370.1 $\pm$ 362.6	5 289.9 $\pm$ 320.7	995.8 $\pm$ 139.1
e-06	4 711.1 $\pm$ 415.1	6 321.5 $\pm$ 396.3	1 039.3 $\pm$ 136.6
e-08	5 162.0 $\pm$ 531.1	7 125.1 $\pm$ 672.4	1 288.6 $\pm$ 163.0
e-09	3 968.2 $\pm$ 248.4	5 337.3 $\pm$ 262.3	992.4 $\pm$ 110.7
e-10	4 417.1 $\pm$ 376.5	4 929.6 $\pm$ 338.9	944.3 $\pm$ 143.8
e-13	5 298.8 $\pm$ 506.4	6 623.3 $\pm$ 485.8	1 535.8 $\pm$ 252.5**
e-14	4 921.0 $\pm$ 429.0	6 740.1 $\pm$ 301.3	1 425.6 $\pm$ 199.7
e-15	4 568.0 $\pm$ 410.0	5 453.3 $\pm$ 372.4	877.8 $\pm$ 118.5
e-16	6 812.5 $\pm$ 687.4**	8 072.2 $\pm$ 624.2**	1 610.2 $\pm$ 263.8**
e-17	6 548.4 $\pm$ 495.6	7 680.4 $\pm$ 485.8	1 397.8 $\pm$ 190.3
e-18	6 787.9 $\pm$ 638.4**	7 595.3 $\pm$ 688.7	1 744.5 $\pm$ 296.0**
e-19	4 647.7 $\pm$ 287.9	6 146.7 $\pm$ 352.4	1 302.6 $\pm$ 12.6
e-20	4 743.4 $\pm$ 328.0	5 093.4 $\pm$ 297.2	1 041.1 $\pm$ 138.1
e-27	3 755.0 $\pm$ 364.7	4 980.6 $\pm$ 287.7	1 023.2 $\pm$ 142.8
e-37	5 332.3 $\pm$ 687.0	5 652.8 $\pm$ 477.9	1 113.1 $\pm$ 161.5
e-38	5 194.9 $\pm$ 451.1	5 946.4 $\pm$ 413.6	1 134.2 $\pm$ 148.8
e-40	4 606.8 $\pm$ 405.3	5 054.1 $\pm$ 323.2	1 298.1 $\pm$ 183.3
e-44	3 774.6 $\pm$ 259.8	3 874.3 $\pm$ 208.0	889.7 $\pm$ 107.7
e-45	4 801.4 $\pm$ 417.3	5 997.0 $\pm$ 317.2	1 170.0 $\pm$ 167.0
e-47	4 554.7 $\pm$ 374.0	5 482.6 $\pm$ 434.8	1 316.0 $\pm$ 206.1
e-48	6 038.3 $\pm$ 423.6	7 285.6 $\pm$ 465.0	1 489.4 $\pm$ 264.3
e-50	4 307.9 $\pm$ 309.5	4 716.4 $\pm$ 346.0	1 051.3 $\pm$ 159.9
e-55	6 469.3 $\pm$ 485.7	7 627.1 $\pm$ 339.5	1 573.9 $\pm$ 208.4**
e-64	6 151.0 $\pm$ 512.6	7 025.1 $\pm$ 243.3	1 455.3 $\pm$ 212.7
e-97	5 110.6 $\pm$ 345.2	7 013.9 $\pm$ 390.6	1 385.3 $\pm$ 201.0
e-114	4 991.1 $\pm$ 441.8	7 659.7 $\pm$ 406.3**	1 477.3 $\pm$ 201.3
e-146	3 421.0 $\pm$ 268.5	4 487.2 $\pm$ 193.6	925.6 $\pm$ 99.7
e-303	4 908.7 $\pm$ 606.7	3 876.9 $\pm$ 423.3	465.8 $\pm$ 78.5
Promedio	4 904.9	5 952.4	1 192.9
Tukey <sup>††</sup>	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001

\*\* \* Ecotipos sobresalientes estadísticamente diferentes.

Los datos son promedios generales (n=18).

†† Nivel de significancia. EEM= Error estándar de la media.

Éste tejido, compuesto de células de parénquima que contienen un gran número de cloroplastos y en donde se encuentra la mayor cantidad de proteína de la hoja (Yamasaki *et al.*, 1996), representando el 75 al 80% del total de nitrógeno principalmente como proteínas (Makino y Osmond, 1991; Wada *et al.*, 2009), conformadas por proteínas estructurales en su membrana tilacoide (LHCP2, D1, Cyt, *f*, etc.) y la Rubisco es la proteína más abundante, la cual comprende aproximadamente el 50% de la proteína soluble (Wittenbach, 1978), mientras que, más del 50% de los carbohidratos de reserva están contenidas en las células de la vaina que rodean a los haces, por ello su digestión es lenta (Echenique *et al.*, 2008).

La gran variabilidad anatómica presentada entre ecotipos con base en la proporción de tejido, mostraron áreas sobresalientes en alguna característica anatómica, pero los mejores ecotipos no están en función de alguna en particular. El tamaño de los tejidos son producto de las interacciones genotipo x ambiente, para mejor adaptación de las especies. Esto sugiere que diferentes proporciones de tejido, es la principal causa de las diferencias en áreas, resultado de la adaptación de la planta a diferentes condiciones ambientales (McKown y Dengler, 2007; Zoric *et al.*, 2012). Estudios previos han demostrado que las diferencias en tamaño de las células buliformes han sido relacionadas con la disponibilidad de agua, por ejemplo; *B. repens*, mostró las mayores variaciones en células buliformes entre épocas, presentando mayor área en época de sequía (21.8%) que en época de lluvias (18.3%), mientras que en mesófilo y estructura kranz (vainas del haz) se presentó sin mayor variación (Chamorro *et al.*, 2005a). Esta observación sugiere que el tamaño de las células buliformes no es un carácter consistente para estudios de morfología en forrajes. En otros pastos C<sub>4</sub>, tales como; pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) (Akin y Burdick, 1975; Campos *et al.*, 2002) *Panicum* (Wilson *et al.*, 1983), y *B. repens* (Chamorro *et al.*, 2005a), se han reportado mayores áreas para mesófilo y su variación ha sido atribuida a variaciones climáticas que afectan la composición de áreas en los tejidos. (Zoric *et al.*, 2012).

Los ecotipos mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) de área, en tejidos correspondientes a baja digestibilidad (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Áreas promedio en tejidos de baja digestibilidad correspondientes a 30 ecotipos de *Bouteloua curtipendula*.

Genotipo	Tejidos de baja digestibilidad ( $\mu\text{m}^2$ )		
	VH	E	EVH no-I
	$\bar{X} \pm EEM$	$\bar{X} \pm EEM$	$\bar{X} \pm EEM$
e-01	4 018.4 $\pm$ 260.9	2 153.5 $\pm$ 150.0	596.2 $\pm$ 155.7
e-04	2 316.0 $\pm$ 170.7	1 288.2 $\pm$ 146.5	562.4 $\pm$ 191.2
e-05	4 432.5 $\pm$ 282.9	2 036.0 $\pm$ 139.5	534.9 $\pm$ 135.0
e-06	3 637.4 $\pm$ 280.1	1 988.5 $\pm$ 142.8	543.7 $\pm$ 141.5
e-08	4 751.8 $\pm$ 368.1	2 057.0 $\pm$ 153.9	618.8 $\pm$ 176.2
e-09	3 813.6 $\pm$ 201.3	2 089.9 $\pm$ 114.4	525.3 $\pm$ 136.5
e-10	3 522.2 $\pm$ 247.3	1 779.3 $\pm$ 138.0	750.6 $\pm$ 231.3
e-13	4 438.1 $\pm$ 329.3	2 039.2 $\pm$ 142.7	617.4 $\pm$ 174.9
e-14	4 990.8 $\pm$ 275.7	2 215.7 $\pm$ 172.2	707.6 $\pm$ 194.4
e-15	3 809.7 $\pm$ 277.2	1 995.5 $\pm$ 146.9	1 071.9 $\pm$ 210.7*
e-16	5 820.8 $\pm$ 512.1**	2 492.8 $\pm$ 243.7	766.1 $\pm$ 211.7
e-17	4 775.8 $\pm$ 299.4	2 431.0 $\pm$ 126.2	679.8 $\pm$ 173.9
e-18	5 089.7 $\pm$ 398.0	2 551.2 $\pm$ 192.7	644.0 $\pm$ 209.6
e-19	4 275.3 $\pm$ 204.8	2 064.7 $\pm$ 109.8	486.6 $\pm$ 125.1
e-20	3 507.1 $\pm$ 248.8	1 811.2 $\pm$ 115.3	583.0 $\pm$ 149.6
e-27	3 941.2 $\pm$ 293.7	1 931.2 $\pm$ 143.3	566.4 $\pm$ 128.4
e-37	4 033.9 $\pm$ 349.6	2 241.1 $\pm$ 259.5	529.1 $\pm$ 165.3
e-38	4 202.4 $\pm$ 326.6	1 975.2 $\pm$ 152.4	604.6 $\pm$ 175.2
e-40	4 099.1 $\pm$ 289.1	1 764.2 $\pm$ 155.3	588.4 $\pm$ 182.7
e-44	2 906.6 $\pm$ 161.8	1 531.1 $\pm$ 96.9	501.2 $\pm$ 130.3
e-45	4 550.7 $\pm$ 279.4	2 382.2 $\pm$ 209.1	624.1 $\pm$ 159.6
e-47	4 402.3 $\pm$ 304.4	2 767.7 $\pm$ 338.4**	781.7 $\pm$ 237.5
e-48	4 969.3 $\pm$ 342.9	2 609.2 $\pm$ 237.5	629.4 $\pm$ 164.6
e-50	3 390.8 $\pm$ 232.1	1 832.2 $\pm$ 140.4	532.3 $\pm$ 143.0
e-55	4 605.7 $\pm$ 233.6	2 796.8 $\pm$ 226.6**	752.3 $\pm$ 182.9
e-64	4 595.8 $\pm$ 225.1	2 555.8 $\pm$ 185.8	705.1 $\pm$ 172.1
e-97	5 024.1 $\pm$ 367.2	2 342.0 $\pm$ 208.6	722.4 $\pm$ 190.0
e-114	5 028.9 $\pm$ 287.1	2 437.6 $\pm$ 197.9	656.6 $\pm$ 180.5
e-146	3 747.7 $\pm$ 187.2	1 778.4 $\pm$ 119.8	450.3 $\pm$ 112.3
e-303	4 297.9 $\pm$ 994.7	1 136.1 $\pm$ 114.1	515.1 $\pm$ 117.9
Promedio	4 233.2	2 102.5	464.7
Tukey <sup>††</sup>	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05

\*\* \* Ecotipos sobresalientes estadísticamente diferentes.

Los datos son promedios generales (n=18).

†† Nivel de significancia. EEM= Error estándar de la media.

El e-16 presentó la mayor área para vaina del haz ( $5\ 820.8 \pm 512\ \mu\text{m}^2$ ), el e-55 lo fue para epidermis ( $2\ 796.8 \pm 226.6\ \mu\text{m}^2$ ) y el e-15 fue sobresaliente para extensión de la vaina del haz-no lignificada ( $1\ 071.9 \pm 210.7\ \mu\text{m}^2$ ). En todos los ecotipos, la vaina del haz mostró altas concentraciones de cloroplastos y un anillo de lignina fue observado sobre la periferia del tejido, su grosor fue variable entre genotipos. La presencia de lignina, representa una barrera estructural típica de las especies  $C_4$  que dificulta la degradación del tejido por microorganismos e incrementa la rigidez de la planta (Akin, 1989). La epidermis es un tejido parcialmente degradable (Akin, 1989; Echenique *et al.*, 2008), caracterizada por la presencia de una cutícula delgada (cera) y ausencia de cloroplastos (pobre en proteína). En promedio la epidermis representó el 9.8% total del área foliar en *B. curtipendula*. En pastos tropicales  $C_4$  fueron reportados valores entre 25-27% (Wilson *et al.*, 1983; Campos *et al.*, 2002), 12% para *Botriochloa pertusa* y 15% *B. repens* (Chamorro *et al.*, 2005a). Esta diferencia es principalmente atribuida al genotipo de las especies y no a efectos ambientales (Wilson *et al.*, 1983; Campos *et al.*, 2002). La extensión de la vaina no lignificada, fue observada principalmente en NP, mostrando variación en el grado de lignificación entre genotipos. El genotipo e-15 mostró la mayor área ( $1\ 071 \pm 210\ \mu\text{m}^2$ ) y fue diferente ( $P < 0.05$ ) al resto de los demás. Este tejido de baja digestibilidad formado principalmente por parénquima y tejido lignificado, cuya digestibilidad es dependiente de la edad y la especie (Akin *et al.*, 1983), ha mostrado tener gran variación en algunas especies forrajeras (Buxton and Redfearn, 1997). Los T-no D representaron en promedio 9.4% del total de la hoja de *B. curtipendula* y no mostraron significancia en los tipos de tejidos que conforman este grupo (Cuadro 4). La EVH-lignificada (EVH-I) solamente fue observada en NP y el xilema fue nueve veces mayor en estas nervaduras que en NS, siendo el tejido vascular la diferencia más notable entre nervaduras. La EVH-I formada principalmente de esclerénquima en conjunto con el xilema, constituyen los tejidos no digestibles en hoja y tallo, y en pasto Bermuda llegó a ocupar más de la mitad del tejido vascular (Akin y Burdick, 1975). Se observaron pequeñas variaciones entre áreas de tejido en TBD y T-no D, debido a que están formadas por tejidos de menor tamaño, comparadas con las áreas de los TAD, esta asociación también ha sido correlacionada en áreas de tejido para dicotiledóneas  $C_4$  (McKown y Dengler, 2007).

**Cuadro 4.** Áreas promedio para tejidos no digestibles correspondientes a 30 genotipos de *B. curtipendula*.

Genotipo	Tejido no-Digestible ( $\mu\text{m}^2$ )	
	X $\bar{X} \pm EEM$	EVH-I $\bar{X} \pm EEM$
e-01	1 711.9 $\pm$ 357.2	418.9 $\pm$ 118.3
e-04	1 189.7 $\pm$ 291.1	347.6 $\pm$ 104.9
e-05	1 701.3 $\pm$ 364.9	272.3 $\pm$ 86.9
e-06	1 812.5 $\pm$ 400.0	449.8 $\pm$ 122.5
e-08	1 958.9 $\pm$ 521.4	467.6 $\pm$ 141.5
e-09	1 808.7 $\pm$ 419.2	493.6 $\pm$ 129.7
e-10	1 478.4 $\pm$ 343.4	346.5 $\pm$ 101.5
e-13	2 171.9 $\pm$ 501.1	544.8 $\pm$ 148.6
e-14	1 883.6 $\pm$ 493.7	460.7 $\pm$ 126.5
e-15	2 419.4 $\pm$ 483.3	711.1 $\pm$ 194.0
e-16	2 757.3 $\pm$ 578.8	683.8 $\pm$ 227.6
e-17	1 831.2 $\pm$ 414.5	525.8 $\pm$ 142.3
e-18	2 337.1 $\pm$ 568.3	588.7 $\pm$ 166.0
e-19	1 897.0 $\pm$ 427.3	465.5 $\pm$ 116.9
e-20	1 767.2 $\pm$ 405.5	500.0 $\pm$ 129.5
e-27	1 515.7 $\pm$ 291.6	407.6 $\pm$ 108.5
e-37	1 783.9 $\pm$ 462.4	354.9 $\pm$ 105.1
e-38	1 970.6 $\pm$ 441.9	497.6 $\pm$ 127.8
e-40	1 666.9 $\pm$ 386.6	439.1 $\pm$ 136.3
e-44	1 342.7 $\pm$ 339.7	415.4 $\pm$ 104.5
e-45	1 913.2 $\pm$ 394.8	425.5 $\pm$ 126.0
e-47	1 957.4 $\pm$ 474.2	347.9 $\pm$ 108.9
e-48	2 023.2 $\pm$ 456.2	443.9 $\pm$ 112.3
e-50	1 367.7 $\pm$ 296.0	443.2 $\pm$ 124.2
e-55	2 340.0 $\pm$ 571.1	593.6 $\pm$ 148.4
e-64	2 649.7 $\pm$ 555.9	444.1 $\pm$ 126.8
e-97	2 238.0 $\pm$ 545.1	537.9 $\pm$ 143.9
e-114	2 333.7 $\pm$ 543.1	444.7 $\pm$ 140.7
e-146	1 261.5 $\pm$ 284.6	353.6 $\pm$ 88.5
e-303	2 087.2 $\pm$ 469.5	594.8 $\pm$ 164.1
Promedio	1 905.9	630.9
Tukey (P<0.05) <sup>††</sup>	ns	ns

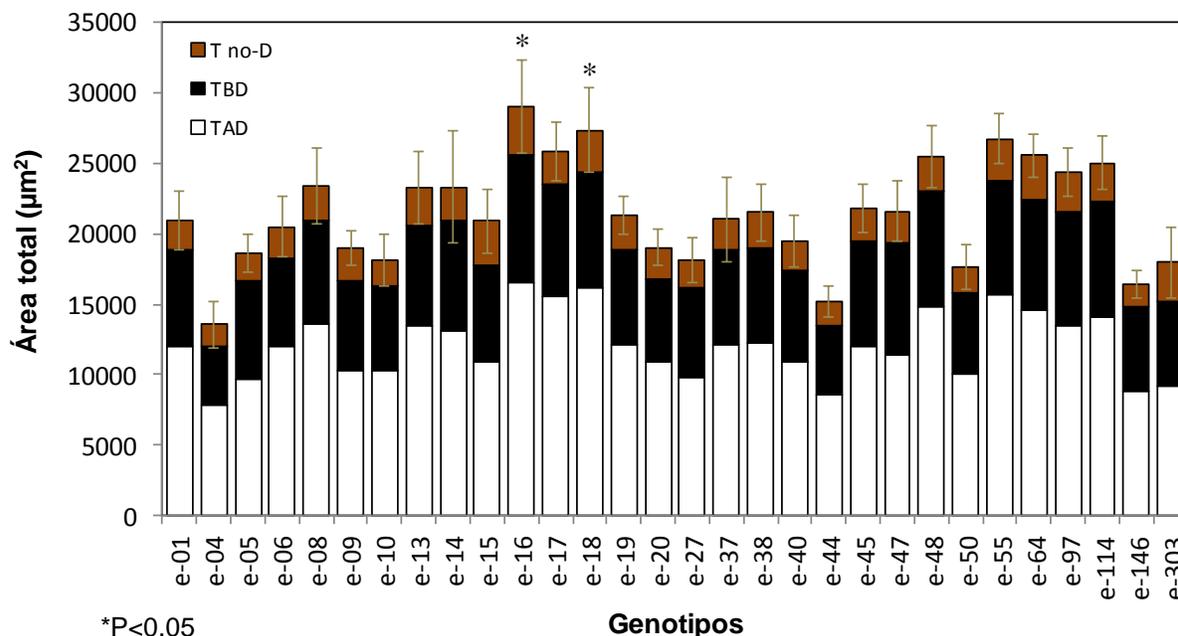
Los datos son promedios (n=18) $\pm$ EEM.

<sup>††</sup> Nivel de significancia; ns= no significativo

En xilema, su área está influenciada por condiciones ambientales y esto ha sido observado en pastos tropicales durante el período de lluvias que es donde los tejidos muestran las mayores áreas (Campos *et al.*, 2002). La identificación de genotipos con menor área de tejidos no digestibles, es un atributo forrajero a considerar en el mejoramiento de la digestibilidad de *B. curtipendula* a futuro. Recientemente, se ha reportado que el tamaño de los haces vasculares es considerado un carácter importante para el mejoramiento genético del arroz, las diferencias en estos tejidos fueron asociados con tallos más grandes, más granos por panícula y panículas más grandes (Wu *et al.*, 2011).

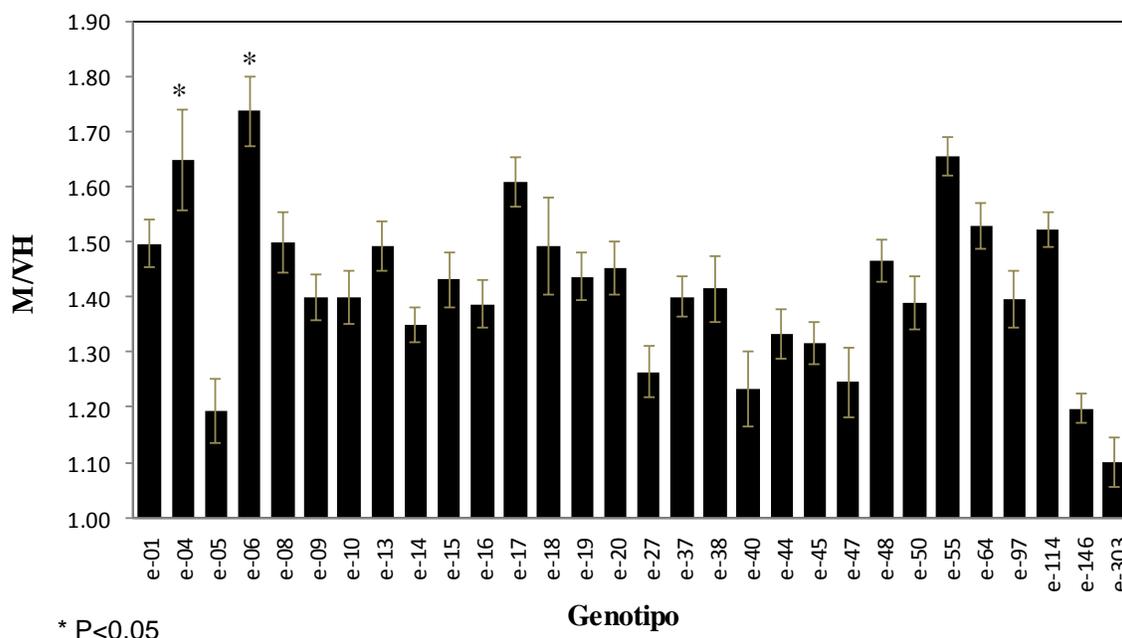
Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la proporción de tejidos digestibles en área total entre ecotipos. Los genotipos e-16, e-18 y e-55 mostraron las mayores áreas totales con valores de  $29,016.1 \pm 3,328.5 \mu\text{m}^2$ ,  $27,338.7 \pm 3,000.0 \mu\text{m}^2$  y  $26,759.1 \pm 1,734.9 \mu\text{m}^2$ , respectivamente (Fig. 4). El área total promedio por genotipo en esta investigación, corresponde a la suma de áreas en los diferentes tejidos de cada nervadura. El mesófilo fue el tejido con la mayor área (28%) para TAD, mientras que la vaina del haz aportó un 20% en TBD y el xilema contribuyó con 8.9% en T no-D.

Laminas foliares de *B. curtipendula* mostraron diferencias entre tejidos de mesófilo y vaina del haz, la relación entre estos tejidos (M/VH) fue calculada entre genotipos y se observaron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ; Fig. 5). Nuestros datos revelan que los genotipos e-06 y e-55 mostraron los mayores valores con 1.74 y 1.66 respectivamente y, esta relación puede estar asociada con respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas y no solamente son cuantificaciones anatómicas. Sorprendentemente el ecotipo sobresaliente (e-16) en la proporción digestible de tejidos (Fig. 4) presentó una baja relación M/VH (1.39). En contraste el e-303 fue el que presentó el menor valor (1.1) debido a una reducida área del mesófilo, pero con buena producción de forraje en campo (Quero-Carrillo, 2015, comunicación personal). Se encontró una alta variabilidad en la relación M/VH por genotipo, como resultado de la variabilidad genética entre recursos genéticos de *B. curtipendula*.



**Figura 4. Proporción promedio de tejidos en hoja de *B. curtipendula*, con base en su digestibilidad. Los datos son promedios (n=18) para cada tipo de tejido clasificados con respecto a su digestibilidad. I: EEM (Error estándar de la media).**

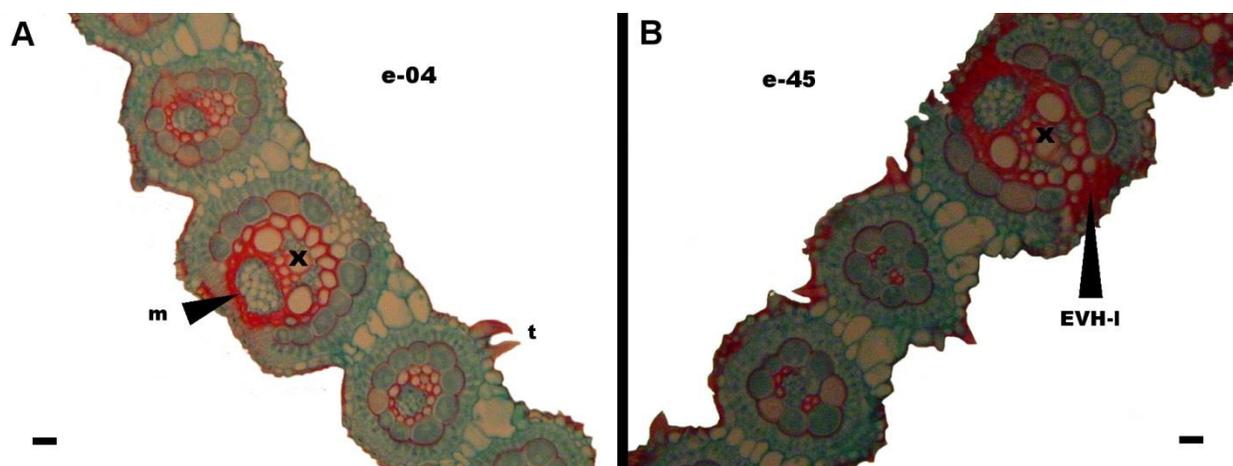
Las altas relaciones mesófilo/vaina del haz puede incrementar las distancias de difusión e interferir en las vías de difusión del CO<sub>2</sub>, disminuyendo la capacidad fotosintética de la planta y eficiencia del uso del agua (Carmo-Silva *et al.*, 2009). Hipotéticamente la disminución en la relación de mesófilo e incremento del tejido de la vaina del haz dentro de la hoja, sirve para mejorar la integridad hidráulica mediante reducción de la superficie de evaporación de las células fotosintéticas (McKown y Dengler, 2007), siendo probable que los ecotipos con mayor relación M/VH estén más adaptados a condiciones de mayor precipitación y sean más exigentes en humedad para una mayor producción de biomasa. Se ha mencionado menor relación M/VH en especies C<sub>4</sub> con vía fotosintética NAD-ME, aunque la variación en la relación M/VH entre especies C<sub>4</sub> con diferente vía fotosintética, son variables (Dengler *et al.*, 1994). Dada la importancia del mesófilo en la fotosíntesis de la planta, ha sido relacionado con peso de semillas y producción en hojas y tallos, atribuidos principalmente a células pequeñas por un mayor efecto en la saturación de luz (Wilson y Cooper, 1970).



**Figura 5. Relación mesófilo/vaina del haz (M/VH) entre genotipos de *B. curtipendula*. El área promedio por genotipo fue calculada mediante análisis de imágenes en corte transversal de hoja a dieferente edad. I: EEM.**

Por su importancia en la fijación de CO<sub>2</sub> y en las tasas fotosintéticas de las plantas (Dengler *et al.*, 1994), el mesófilo es un importante atributo forrajero altamente correlacionado con la digestibilidad de la materia seca (Campos *et al.*, 2001), degradabilidad por bacterias ruminales (Akin, 1989; Chamorro *et al.*, 2005b) y constituye un factor importante a considerar en programas mejoramiento genético.

La deposición de lignina en cortes transversales de láminas foliares de *B. curtipendula* fue observada mediante una tinción histológica con O-safranina y verde fijo (Fig. 6). La mayor cantidad de lignina fue observada en NP, presentándose principalmente en tejido vascular, VH, EVH-lignificada y epidermis. La presencia de lignina en la EVH-I fue determinante para genotipos con mayor acumulación de lignina.



**Figura 6. Corte transversal de la hoja del ecotipo e-04 y e-45 de *B. curtipendula* en los que puede compararse la deposición de lignina a los 65 días de rebrote. La tinción histológica fue realizada con O-safranina y verde fijo, corroborada mediante fluoroglucinol. A) ecotipo con bajo contenido de lignina, la mayor deposición de lignina ocurrió en tejido vascular, B) ecotipo con mayor deposición de lignina, localizada en el tejido vascular y extensión de la vaina del haz. m= mestoma, X= xilema, EVH-I= Extensión de la vaina del haz lignificada, t= tricoma. Barra: 50  $\mu$ m.**

La cantidad de lignina total fue diferente entre ecotipos y su contenido cambio con la edad de la hoja (Cuadro 5). El contenido de lignina en todos los ecotipos se incrementó con el avance de madurez en la hoja y esta variación fue significativa ( $P < 0.05$ ) en las dos últimas edades (45 y 65 días). Ecotipos con menor formación de lignina al principio, mostraron el menor contenido de lignina al final de la evaluación. Una mayor deposición de lignina (2.2 veces) fue observado entre el periodo de 20 a 45 días en casi todo los ecotipos, disminuyendo ligeramente en el periodo de 45 a 65 días (1.6 veces). Un promedio de 1.7, 3.8 y 6.2% en contenido de lignina ocurrió a los 20, 45 y 65 días, respectivamente. Los ecotipos e-09 y e-50 mostraron la menor lignificación a los 20 días (1.1%), e-303 a los 45 días (2.6%), mientras que el e-10 y e-45 lo fueron a los 65 días (4.8 y 4.7%, respectivamente).

**Cuadro 5.** Contenido relativo de lignina a edad de 20, 45 y 65 días de rebrote en 30 ecotipos de *B. curtipendula*. Los valores fueron calculados con el software *Image Tool* para Windows 3.00., a partir del área lignificada, con relación al área total observada en cortes transversales de hoja.

Genotipo	Lignina (%)		
	20 d	45 d	65 d
	$\bar{X} \pm EEM$	$\bar{X} \pm EEM$	$\bar{X} \pm EEM$
e-01	2.1 ± 0.2	4.4 ± 0.2	8.5 ± 0.5
e-04	2.1 ± 0.2	4.5 ± 0.3	8.5 ± 0.6
e-05	1.5 ± 0.2	4.1 ± 0.3	6.4 ± 0.8
e-06	1.7 ± 0.2	4.1 ± 0.2	6.3 ± 0.7
e-08	1.9 ± 0.2	3.7 ± 0.2	5.1 ± 0.5
e-09	1.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	5.3 ± 0.6
e-10	1.4 ± 0.2	3.2 ± 0.2	4.8 ± 0.4**
e-13	1.3 ± 0.1	3.4 ± 0.3	5.1 ± 0.4
e-14	1.7 ± 0.3	3.5 ± 0.4	5.9 ± 0.6
e-15	2.1 ± 0.2	3.8 ± 0.3	7.5 ± 1.0
e-16	1.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3	5.3 ± 0.5
e-17	1.8 ± 0.2	3.4 ± 0.3	5.8 ± 0.6
e-18	2.1 ± 0.3	3.5 ± 0.2	6.4 ± 0.5
e-19	1.8 ± 0.2	4.1 ± 0.2	7.3 ± 0.9
e-20	1.8 ± 0.1	4.3 ± 0.3	6.8 ± 0.7
e-27	1.9 ± 0.2	4.5 ± 0.3	6.5 ± 0.5
e-37	2.1 ± 0.2	4.0 ± 0.3	5.9 ± 0.5
e-38	1.9 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.9 ± 0.3
e-40	1.9 ± 0.2	3.9 ± 0.3	5.6 ± 0.5
e-44	2.4 ± 0.3	4.7 ± 0.4	8.4 ± 1.0
e-45	1.3 ± 0.1	3.3 ± 0.2	4.7 ± 0.5**
e-47	1.7 ± 0.3	3.5 ± 0.5	5.8 ± 0.7
e-48	1.8 ± 0.2	4.4 ± 0.3	6.2 ± 0.7
e-50	1.1 ± 0.1	3.2 ± 0.3	5.4 ± 0.5
e-55	1.4 ± 0.2	3.3 ± 0.4	6.8 ± 1.0
e-64	2.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2	6.5 ± 1.0
e-97	1.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	5.4 ± 0.5
e-114	1.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	6.0 ± 0.6
e-146	2.0 ± 0.2	3.8 ± 0.3	7.1 ± 0.6
e-303	1.6 ± 0.1	2.6 ± 0.2**	5.1 ± 0.4
Promedio	1.7	3.8	6.2
Tukey <sup>††</sup>	ns	P < 0.001	P < 0.001

Datos son promedios (n=18) ± EEM.

\* Genotipos con menor deposición de lignina (P<0.01).

†† Nivel de significancia; ns= no significativo.

EEM= Error estándar de la media.

El contenido relativo de lignina (%), mostró diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre ecotipos, siendo los ecotipos e-01 y e-04 los que mostraron los mayores valores (8.5%) a 65 días y fueron significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ). Resultados similares al e-10 y e-45 fueron observados en *Pennisetum purpureum* a edad de rebrote de 65 días, pero a 140 días el contenido total de lignina se incrementó a 8.5% (Valenciaga, 2009).

Los resultados en esta investigación indican, que los ecotipos con mayor contenido de lignina, mostraron una menor área en sus tejidos y menor contenido de nutrientes digestibles totales (TAD). Esto indica que la acumulación de lignina no está en función del área del tejido, sino de la cantidad y del grosor de las paredes celulares en sus tejidos y es una respuesta a factores ambientales y genéticos (Monties, 1989). Es conocido que la lignina es uno de los principales factores que afectan la digestibilidad de los forrajes, afectando negativamente la degradabilidad enzimática (Piquemal *et al.*, 2002), la digestibilidad de la materia seca (Jung y Vogel, 1986, Queiroz *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001) y la falta de acceso físico de los polisacáridos de la pared a enzimas hidrolíticas (Jung y Allen, 1995). Por ello, el conocimiento de la concentración de lignina ha sido de gran interés para el mejoramiento de la calidad de los forrajes mediante mejoramiento vegetal (Jung, 1996).

Se observaron variaciones considerables en xilema, lignificación de la vaina y grosor de la vaina de la hoja mediante la tinción realizada con O-safranina y verde fijo. Un anillo de lignina que rodea la vaina del haz de grosor variable fue observado para todos los ecotipos, mientras que la vaina no lignificada fue un atributo importante para ecotipos con menor lignificación en sus tejidos. La deposición de lignina fue más evidente en tejidos de xilema y su variación entre ecotipos fue notable. El análisis de imágenes muestra que la lignina inicia su formación en el xilema y extensión de la vaina del haz, al final, éstos tejidos en conjunto con el mestoma mostraron altas concentraciones de lignina y su variación también fue inherente al ecotipo.

El contenido de lignina se incrementa progresivamente con la madurez del forraje y su composición de monolignoles también resulta afectada (Chen *et al.*, 2002; Valenciaga *et al.*, 2009). Las relaciones de monolignoles siringil:guaiacil (S:G) es usado como un

indicador potencialmente benéfico en la digestibilidad de la pared celular (Jung, 1996). Aunque la deposición de unidades S y G ocurren en diferentes estados y proporción de tejidos en la planta (He y Terashima, 1991). En este trabajo se encontraron diferencias importantes en el contenido de lignina entre ecotipos evaluados y esto constituye una característica de gran trascendencia para el mejoramiento de la especie a futuro.

#### **4. CONCLUSIONES**

Gran variabilidad en la estructura anatómica y deposición de lignina fueron observadas a nivel foliar entre ecotipos de *B. curtipendula*, siendo los tejidos de mayor área los que mostraron mayor variación en su área total. Diferencias entre áreas de tejidos fue determinante en la proporción de TAD, TBD y Tno-D, su tamaño está estrechamente relacionada con la cantidad de tejidos digestibles, pero no con la relación mesófilo/vaina del haz. La deposición de lignina fue dependiente de la edad, pero independiente del área total de tejido presente. Las áreas de tejido obtenidas mediante análisis de imágenes en cortes histológicos transversales de hoja, proporcionaron datos sobre atributos forrajeros para la selección de ecotipos sobresalientes.

#### **AGRADECIMIENTOS**

A las líneas de investigación LPI16 y LPI11, del Colegio de Postgraduados.

## 5. LITERATURA CITADA

- Akin DE & Burdick D (1975) Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. *Crop Sci.* 15: 661–668.
- Akin DE, Barton II FE and Coleman SW (1983) Structural factors affecting leaf degradation of old world bluestem and weeping love grass. *J. Anim. Sci.* 56:1434-1446.
- Akin DE (1989) Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.* 81: 17–25.
- Buxton DR and Redfearn DD (1997) Plant limitations to fiber digestion and utilization. *The Journal of Nutrition.* 127:814S-818S.
- Campos PDS, Gomide JA, Queiroz DS, Monteiro da SEA (2001) Correlações entre Componentes Anatômicos, Químicos e Digestibilidade *In Vitro* da Matéria Seca de Gramíneas Forrageiras. *Rev. Bras. Zootec.* 30(3):955-963.
- Campos PDS, Gomide JA, Monteiro da SEA, Queiroz DS, Miranda GCA (2002) Características Anatômicas da Lâmina Foliar e do Colmo de Gramíneas Forrageiras Tropicais, em Função do Nível de Inserção no Perfilho, da Idade e da Estação de Crescimento. *R. Bras. Zootec.* 31(2):890-899.
- Carmo-Silva AE, Francisco A, Powers AJ, Keys AJ, Ascensão L, Parry MAJ and Arrabaça MC (2009) Grasses of different C4 subtypes reveal leaf traits related to drought tolerance in their natural habitats: Changes in structure, water potential, and amino acid content. *American Journal of Botany.* 96(7):1222-1235.
- Casler MD and Hatfield RD (2006) Cell wall composition of Smooth Bromegrass plants selected for Divergent Fiber concentration. *J. Agric. Food Chem.* 54:8206-8211.
- Chamorro D, Evangelista CJ and Cuesta P (2005a). Relaciones entre estructura histológica y composición química en hojas de gramíneas y leguminosas. *Revista Corpoica.* 6(1):83-99.
- Chamorro D, Evangelista CJ and Cuesta P (2005b). Degradación microbiana In situ de tejidos foliares de gramíneas y leguminosas y su relación con indicadores de calidad nutricional. *Revista Corpoica.* 6(1):100-116.
- Chen L, Auh Ch, Chen F, Cheng X, Aljoe H, Dixon RA and Wang Z (2002) Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity gene expression and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *J. Agric. Food Chem.* 50:5558-5565.

- Dengler NG, Dengler RE, Donnelly PM and Hattersley PW (1994) Quantitative leaf anatomy of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grasses (Poaceae): bundle sheath and mesophyll surface area relationship. *Annals of Botany*.73:241-255.
- Christiernin M (2008) Composition of lignin in outer cell-wall layers. Disponible: <http://urn.kb.se/urn:nbn:se:kth:diva-4036.html>.
- Echenique V, Pessino S, Diaz M, Selva JP, Luciani G, Zappacosta D, Cervigni G, Meier M, Garbus I, Cardone S, Miranda R and Spangenberg G (2008) Aportes de la biotecnología al mejoramiento del pasto lloron (*Eragrostis curvula*). *Revista Argentina de Produccion Animal*. 28(2):147-164.
- GNU (2010) Image Manipulation Program. User manual. USA. Disponible: <http://docs.gimp.org/2.6/en/>
- González RSL, Quero CAR, Franco MO, Ramírez AC, Ortega EHM and Trejo LC (2010) Efecto de la salinidad y la temperatura sobre el crecimiento del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.). *CIENCIA ergo sum*. Vol. 18(1), marzo-junio. pp.59-69.
- Gould FW (1959) Notes on apomixes in sideoatsgrama. *Journal of Range Management*. Vol.12. No. 1. pp. 25-28.
- Hattersley PW and Watson L (1976) C<sub>4</sub> grasses: an anatomical criterion for distinguishing between NADP-malic enzymes species and PCK or NAD-malica enzyme species. *Australian Journal of Botany*. 24:279-308.
- He L and Terashima N (1991) Formation and structure of lignin in monocotyledons. IV. Deposition Process and Structural Diversity of the Lignin in the Cell Wall of Sugarcane and Rice Plant Studied by Ultraviolet Microscopic Spectroscopy. *Holzforschung* 45(3):191-198.
- Jensen WA (1962) *Botanical Histochemistry. Principle and Practice*. Freeman WH & Co., San Francisco, CA. pp. 71\_91.
- Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York. pp. 1-523.
- Jung H (1996) Genetics Manipulation of cell walls. Identification of cell Wall traits that can be manipulated to improve forage digestibility. US Dairy forage research center. Informational conference with dairy and forages industries. 9-14.
- Jung HG and Allen MS (1995) Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci*. 73:2774-2790.
- Jung HG and Vogel KP (1986) Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J. Anim. Sci*. 62:1703-1712.

- Kuhbauch W and Bestajovsky J (1985) Determination of lignin concentration and digestibility in stem tissue of alfalfa by means of quantitative image analysis. Proc. XV Int. Grassld. Congr. pp.825-827.
- Makino A and Osmond B (1991). Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. Plant Physiol. 96: 355–362.
- McKwon AD and Dengler NG (2007) Key innovations in the evolution of kranz anatomy and C<sub>4</sub> vein pattern in *FLAVERIA* (ASTERACEAE). American Journal of Botany. 94(3):382-399.
- Morales-Nieto C, Quero-Carrillo A, Le-Blanc O, Hernández-Garay A, Pérez-Pérez J and González-Muñoz S (2006) Caracterización de la diversidad del pasto nativo *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. mediante marcadores de AFLP. Agrociencia. 40:711-720.
- Piquemal J, Chamayou S, Nadaud I, Beckert M, Barriere Y, Mila I, Lapierre C, Rigau J, Puigdomenech P, Jauneau A, Digonnet C, Boudet A-M, Goffner D and Pichon M (2002) Down-Regulation of caffeic acid O-Methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. Plant Physiology. 130:1675-1685.
- Pitman WD and Jaynes Ch C (1980) Strains of blue grama and sideoats grama evaluated for the Southern Great Plains. Journal of Range Management. Vol.33. No. 5. pp. 381-384.
- Queiroz DS, Gomide JA and Maria J (2000) Avaliação da folha e do Colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. 1. Digestibilidade *in vitro* e composição química. Rev. bras. zootec. 29(1):53-60.
- Ruzin SE (1999) Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press. New York, Oxford. pp.322.
- SAS (2004) Institute Inc.SAS/STAT® 9.1. User's Guide Cary, NC: SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA.
- Sokupová J, Rock BN and Albrechtová J (2001) Comparative study of two spruce species in a polluted mountaineous region. New Phytol. 150: 133-145.
- Sokupová J and Albrechtová J (2003) Image analysis-tool for quantification of histochemical detections of phenolic compounds, lignin and peroxisases in needles of Norway spruce. Biologia Plantarum. 46 (4): 595-601.
- Stafford HA (1962) Histochemical and biochemical differences between lignin-like materials in *Phleum pratense* L. Plant Physiol. 37:643-649.

- Travis AJ, Murison SD, Perry P and Chesson A (1997) Measurement of cell wall volume using confocal microscopy and its application to studies of forage degradation. *Annals of Botany*. 80:1-11.
- USDA (2011) El Reno sideoats grama. <http://www.plant-materials.usda.nrcs.gov/>.
- Valenciaga D, Herrera RS, De Oliveira SE, Chongo B and Torres V (2009) Composición monomérica de la lignina de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 y su variación con la edad de rebrote. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 43(3):315-319.
- Vallet C, Chabberts B, Czaninski Y and Monties B (1996). Histochemistry of lignin Deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Annals of Botany*. 78:625-632.
- Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T and Makino A (2009) Autophagy Plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol*. 149:885-893.
- Warner DA and Edwards GE (1989). Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll, and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C4 Dicot *Atriplex confertifolia*. *Plant Physiol*. 91:1143-1151.
- Wilson D and Cooper JP (1970) Effect of selection for mesophyll cell size on growth and assimilation in *Lolium perenne* L. *New Phytol*. 69:233-245.
- Wilson JR & Mertens DR (1995) Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci*. 35: 251–259.
- Wilson JR (1993) Organisation of forage plant tissues. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, eds. *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: American Society of Agronomists. 1-27.
- Wilson JR, Brown RH and Windham WR (1983) Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C3, C4, and C3/C4 intermediate types of *Panicum* species. *Crop Science*. 23(1):141-146.
- Wittenbach VA (1978) Breakdown of ribulose biphosphate carboxylase and change in proteolytic activity during dark-induced senescence of wheat seedlings. *Plant Physiol*. 62:604-608.
- Wittenberg KM, Thomsett EC and Ames N (1993) Use of histochemistry, section-to-slide digestion and image analysis for evaluation of digestibility in reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) genotypes. *Can. J. Anim. Sci*. 74:83-89.

- Wu L-L, Liu Z-L, Wang J-M, Zhou C-Y and Chen K-M (2011) Morphological, anatomical, and physiological characteristics involved in development of the large culm trait in rice. *Aust. J Crop Sci.* 5(11):1356-1363
- Yamasaki T, Kudoh T, Kamimura Y and Katoh S (1996) A vertical gradient of the chloroplast abundance among leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol.* 37(1):43-48.
- Zoric L, Merkulov L, Lukovic J and Boza P (2012) Comparative analysis of qualitative anatomical characters of *Trifolium* L. (Fabaceae) and their taxonomic implications: preliminary results. *Plant Syst Evol.* 298:205-219.

## CAPÍTULO II

### EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDUCIDA BAJO ESTRÉS OSMÓTICO EN *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., RECALCITRANTE APOMÍCTICO

Álvaro Bernal-Flores<sup>1</sup>, Adrián Raymundo Quero-Carrillo<sup>1</sup>, Alejandrina Robledo-Paz<sup>1</sup>, Paulino Pérez-Rodríguez<sup>1</sup>, Hilda Araceli Zavaleta-Mancera<sup>1</sup> y Zengyu Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México. 56230. <sup>2</sup>The Samuel Roberts Noble Foundation. Forage Improvement Division. 2510. Sam Noble Parkway, Ardmore. Oklahoma.

#### RESUMEN

*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., es una especie forrajera nativa de los pastizales áridos y semiáridos del norte de México, ampliamente utilizado en pastoreo. Se usaron cariósides maduros como explantes para la inducción de callos y siete tipos fueron obtenidos de los medios de cultivo. Los callos inducidos a partir de medios de cultivo que contenían las sales de Murashige y Skoog (MS) y distintas concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 6-furfurilaminopurina y benciladenina) y sorbitol, mostraron capacidad para regenerar plantas. En el presente estudio, se establecieron las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de éste pasto a partir de embriogénesis indirecta. Callos altamente embriogénicos obtenidos en el medio MS con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.6 mM de sorbitol, formaron embriones en un 95%, de los cuales el 11-14% tuvieron capacidad para convertirse en plantas normales en medios suplementados con cinetina (1 mg L<sup>-1</sup>), ácido naftalenacético (0.2 mg L<sup>-1</sup>) y ácido giberélico (0.2 mg L<sup>-1</sup>). El estrés osmótico ó el balance hormonal generado por la presencia de sorbitol en el medio indujeron la embriogénesis somática. En este estudio se estableció el primer protocolo de regeneración en esta especie apomíctica recalcitrante.

**Palabras clave:** Pasto banderita, cultivo de tejidos, embriogénesis somática, regeneración de plantas, sorbitol, callos.

**SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCED UNDER OSMOTIC STRESS IN *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., RECALCITRANT APOMICTIC**

**ABSTRACT**

*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. is a forage native to Mexico species very well adapted to arid and semiarid grassland and widely used under grazing. Mature caryopses were used as explants for *callus* induction and seven *calli* types were obtained from culture media. Induced *calli* induced from culture media containing Murashige and Skoog (MS) basal, and different concentrations and combinations of growth regulators (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 6-furfurylaminopurine and benzyladenine), and sorbitol, showed the ability to regenerate plants. Within this research, tissue culture conditions and procedures for plant regeneration in sideoats grama through indirect embryogenesis were established. Highly embryogenic *calli* obtained on MS medium with 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 0.2 mg L<sup>-1</sup> 6-BA, and 0.6 mM sorbitol, formed embryos, and 95% of those showed the ability to produce from 11-14% normal plants in media supplemented with kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>), 1-naphthaleneacetic acid (0.2 mg L<sup>-1</sup>), and gibberellic acid (0.2 mg L<sup>-1</sup>). Thus, osmotic stress or hormone balance within the media resulted on the promotion of pro-embryos formation and the induction of somatic embryos in sideoats grama. These results establish the first plant regeneration protocol for this apomictic recalcitrant specie.

**Key words:** sideoat grama, tissue culture, somatic embryogenesis, protocol regeneration, embryogenic *calli*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El pasto banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.) es una especie C<sub>4</sub>, apomictica facultativa con genotipos diploides (2n=2x=20), poliploides (2n=4x,5x, ..., 10x) y aneuploides, nativo de zonas áridas y semiáridas del norte de México, país que es considerado su centro de origen (Gould, 1979; Quero, 2001; Morales *et al.*, 2006, 2007; Quero *et al.*, 2010). Su valor en la alimentación de herbívoros en pastoreo, la hacen una especie de gran importancia forrajera. Su condición apomictica ofrece grandes ventajas que pueden ser aprovechadas en el mejoramiento genético de esta especie, debido a que la apomixis preserva el genotipo maternal por partenogénesis, manteniendo la heterocigocidad y epistasia, fijando la heterosis y caracteres de interés agronómico (Van Dijk y Van Damme, 2000).

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido una herramienta valiosa para el desarrollo de protocolos de regeneración o transformación genética usados en programas de mejoramiento de especies forrajeras apomicticas como; *Bouteloua gracilis* (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001), *Bouteloua eriopoda* (Osuna y Barrow, 2004), *Poa pratensis* (Chen *et al.*, 2004), *Brachiaria brizantha* (Cabral *et al.*, 2011), *Paspalum notatum* (Mancini *et al.*, 2014), *Eragrostis curvula* (Zappacosta *et al.*, 2014) y *Cenchrus ciliaris* (Carlioni *et al.*, 2014). Frecuentemente, el genotipo, medio de cultivo, fuente de auxinas, concentración (Rakshit *et al.*, 2010), tipo de explante y edad (Aina *et al.*, 2012), son factores que influyen en la regeneración de plantas morfológicamente normales.

En estudios preliminares realizados en *B. curtipendula* se obtuvo alta eficiencia en la inducción de callos, pero baja capacidad de regeneración mediante organogénesis indirecta (Bernal-Flores *et al.*, 2014). Resultados similares se han obtenido en otras especies apomicticas (Hu *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2011), constituyendo la principal limitante para el establecimiento de protocolos eficientes de regeneración. Generalmente, las especies apomicticas regeneran plantas con mayor dificultad que especies sexuales (Stephens *et al.*, 2006; Mancini *et al.*, 2014), aunque las causas no están bien entendidas, se piensa que es debido a un desequilibrio hormonal endógeno (Huang *et al.*, 2012).

La capacidad de regeneración *in vitro* ha sido mejorada en especies apomícticas y recalcitrantes mediante la utilización de tratamientos que generan estrés osmótico, hídrico (Wei *et al.*, 1986; Narusaka *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013, Cabrera-Ponce *et al.*, 2014) y por frío (Immonen y Antilla, 1999; Narusaka *et al.*, 2003), entendiéndose como estrés a cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos (Lichtenthaler, 1998). La respuesta a dichas condiciones de estrés depende del estado fisiológico, de los mecanismos de adaptación inducidos por la planta (Lichtenthaler, 1998) y de la intensidad de estrés (Claeys *et al.*, 2014). La respuesta a dichas condiciones desencadena mecanismos que contribuyen a la supervivencia de la planta o de las células que la conforman (Fehér *et al.* 2003). Dentro de estos mecanismos se encuentran la reorganización celular, cambios fisiológicos, metabólicos y de expresión génica que conllevan a la dediferenciación celular y adquisición de la competencia para formar embriones somáticos (Fehér *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo de propagación *in vitro* de plantas en *B. curtipendula*, mediante la aplicación de estrés osmótico.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Desinfestación de Semilla

El ecotipo (e-303) apomíctico ( $2n=4x=40$ ) de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) sobresaliente por su producción forrajera fue colectado en Durango, México. Cariópsides maduros desprovistos de lema y palea fueron desinfestados con etanol al 70% (v/v) por 2 minutos, luego con una solución de fungicidas (Ridomil Bravo Gold<sup>®</sup> 3 ml L<sup>-1</sup>; Promyl<sup>®</sup> 1 g L<sup>-1</sup>) durante 30 minutos en agitación. Posteriormente fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) 1.8% de cloro activo y 0.1 ml de Tween 20 durante 30 minutos. Finalmente los cariópsides fueron enjuagados cinco veces con agua destilada estéril.

## 2.2. Inducción de Callos Embriogénicos

Cariópsides maduros (explantes) fueron colocados en cajas Petri con 30 ml de distintos medios de cultivo (40 explantes caja<sup>-1</sup>), elaborados con las sales basales de Murashige y Skoog, (MS) (1962), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 3.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel. Los medios fueron suplementados con distintas concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento y el pH de los mismos fue ajustado a  $5.7 \pm 0.1$  (Cuadro 1). Los explantes que se cultivaron en los medios que contenían 0.6 mM de D-sorbitol (Sigma Aldrich) (MI-13 y MI-14) permanecieron 14 días en éstos y posteriormente se transfirieron a unos con la misma composición pero sin sorbitol. Todos los cultivos fueron incubados en una cámara de ambiente controlado a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad. Después de tres semanas de haber iniciado el cultivo se determinó el porcentaje de explantes que formaron callos y las características de los mismos. Para incrementar la biomasa de los callos, estos se subcultivaron en medios frescos.

## 2.3. Regeneración de Plantas

Los callos formados en los diferentes medios de inducción fueron colocados en cuatro medios para promover la diferenciación de los embriones adventicios. Dichos medios contenían las sales MS, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, cinetina o tidiazuron, ácido naftalenacético (ANA), ácido giberelico (AG<sub>3</sub>) y 3.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel (Cuadro 1). En estos medios los callos permanecieron durante 20 días y posteriormente se transfirieron a un medio que contenía 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> para promover la maduración y conversión de los embriones en plantas (medio de maduración y conversión) en el que permanecieron por dos semanas más y posteriormente transferidas al medio MS<sub>50</sub> para estimular su crecimiento. Los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2$  °C, 16 h de luz e intensidad lumínica de 28  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Después de cinco semanas de haber iniciado el cultivo en los medios de regeneración, se evaluó el porcentaje de callos que formó embriones somáticos y el número de embriones formados por cada 100 g de peso fresco de callo. Dos semanas más tarde se calculó el número de plantas que se regeneraron por gramo de peso fresco de callo y la eficiencia de conversión (número de plantas obtenidas/número de embriones formados X100).

**Cuadro 1.** Medios de inducción y regeneración usados en la embriogénesis somática de *B. curtipendula*.

Medio	Composición
<b>Medios de inducción</b>	
MI-1	2,4 - D (2 mg L <sup>-1</sup> ); AIA (0.2 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-2	2,4 - D (2 mg L <sup>-1</sup> ); ANA (0.25 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-3	2,4 - D (0.5 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.2 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-4	2,4 - D (0.5 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.4 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-5	2,4 - D (1 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.2 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-6	2,4 - D (1 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.4 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-7	2,4 - D (2 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.2 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-8	2,4 - D (2 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.4 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-9	2,4 - D (3 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.2 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-10	2,4 - D (3 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (0.4 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-11	2,4 - D (1 mg L <sup>-1</sup> ); cinetina (1 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-12	2,4 - D (1 mg L <sup>-1</sup> ); 6- BAP (0.2 mg L <sup>-1</sup> ); AgNO <sub>3</sub> (3 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-13	2,4 - D (1 mg L <sup>-1</sup> ); 6- BAP (0.2 mg L <sup>-1</sup> ); D-sorbitol (0.6 mM); AgNO <sub>3</sub> (3 mg L <sup>-1</sup> ).
MI-14	2,4 - D (2 mg L <sup>-1</sup> ); 6- BAP (0.2 mg L <sup>-1</sup> ); D-sorbitol (0.6 mM); AgNO <sub>3</sub> (3 mg L <sup>-1</sup> ).
<b>Medios de regeneración</b>	
MR-1	cinetina (1 mg L <sup>-1</sup> ); ANA (0.1 mg L <sup>-1</sup> ); AG <sub>3</sub> (0.1 mg L <sup>-1</sup> ).
MR-2	cinetina (1 mg L <sup>-1</sup> ); ANA (0.2 mg L <sup>-1</sup> ); AG <sub>3</sub> (0.2 mg L <sup>-1</sup> ).
MR-3	cinetina (1 mg L <sup>-1</sup> ); ANA (0.3 mg L <sup>-1</sup> ); AG <sub>3</sub> (0.3 mg L <sup>-1</sup> ).
MR-4	tidiazuron (1 mg L <sup>-1</sup> ); ANA (0.1 mg L <sup>-1</sup> ).

2,4-D= ácido 2,4-diclorofenoxiacético; AIA= ácido indolacético, ANA= ácido naftalenacético, cinetina= 6-furfurilaminopurina, 6-BAP= 6-bencilaminopurina, AgNO<sub>3</sub>= nitrato de plata, AG<sub>3</sub>= ácido giberelico, tidiazuron= NN-fenil-N-1,2,3,-tidiazol-5-ilurea.

## 2.4. Estudio Histológico

Callos embriogénicos maduros de seis semanas de edad fueron fijados en FAA (10% formaldehído, 5% ácido acético, 52% etanol (Jensen, 1962) y deshidratados en serie de alcoholes (30-100%) y xilano (50-100%). Las muestras fueron embebidas en

parafina y los cortes fueron realizados a 15  $\mu\text{m}$  de grosor, utilizando un micrótopo de rotación (American Optical, Spencer 820). Las muestras fueron desparafinadas con xileno (100%), serie de alcoholes (100-50%) y teñidas con O-safranina-verde fijo (Johansen, 1940); los cortes histológicos fueron infiltrados y embebidos en resina sintética. Las muestras fueron observadas en un microscopio Axiostar Plus Zeiss (Carl Zeiss, Alemania). Para la microscopia de barrido, los callos embriogénicos fueron fijados en formaldehído al 3% y deshidratados en series de etanol (30-100%) a intervalos de 40 minutos por solución. Las muestras fueron secadas a punto crítico con  $\text{CO}_2$  utilizando un equipo Samdri-780A y recubiertas con oro (ION SPUTTER JFC-1100), las muestras fueron analizadas y las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM6390) operando a 5 KeV.

## 2.5. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para la inducción y regeneración de plantas se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Para la inducción de callo una repetición consistió en una caja Petri con cuarenta cariósides y para la regeneración, una caja Petri con 1 g de peso fresco de callo. Para analizar la variable número de explantes que formaron callo se utilizó un modelo de regresión logística modelando la probabilidad de inducción de callos ( $p$ ) (Hosmer y Lemeshow, 2000). Dado que ésta variable binaria, se puede modelar con una variable aleatoria con distribución Bernoulli ( $p$ ), con  $p$  como una función de los reguladores de crecimiento (2,4-D, AIA, ANA, cinetina, BAP y sorbitol). El modelo fue ajustado usando la rutina PROC LOGISTIC del paquete estadístico SAS 9.4 para Windows.

Para la regeneración de plantas, los datos se analizaron usando un modelo de regresión Poisson (Dobson, 2002). Las diferencias entre tratamientos fueron probadas mediante la prueba de razón de verosimilitudes generalizada. Adicionalmente, los datos de la eficiencia de conversión fueron analizados usando el modelo lineal y los datos fueron transformados usando la función arco seno con lo cual también fue posible hacer comparaciones de medias de tratamientos con las pruebas de Tukey usando como nivel de significancia el 5%.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Inducción de Callos

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos para inducción de callos, siendo los medios MI-12 y MI-14 estadísticamente superiores a los demás medios a excepción del MI-13. Los medios suplementados MI-13 y MI-14 promovieron la formación de callos en más del 50% de los explantes (55 y 66%, respectivamente) y no redujeron la capacidad de germinación de las semillas a pesar del estrés que generó la presencia de sorbitol en estos medios. La combinación de 2,4-D y cinetina, permitió la formación de callos en menos del 20% de los explantes y el porcentaje más bajo fue observado con la menor concentración de 2,4-D probada (MI-4; 8.7%) (Cuadro 2). Efecto significativo ( $P < 0.01$ ) fue observado para cinetina y BAP como los principales factores que afectaron la frecuencia de inducción de callo.

El crecimiento de los callos fue visible dos semanas después de iniciar el cultivo, originándose principalmente de los vástagos que emergieron de los cariósides. Se observaron diferentes tipos de callos en los diferentes medios de inducción (Figura 1 A-G). La mayor frecuencia de callos suaves se formó en el medio MI-3 (2,4-D, 0.5 mg L<sup>-1</sup>; cinetina, 0.2 mg L<sup>-1</sup>) (86.7%), mientras que en el medio MI-2 (2,4-D, 2 mg L<sup>-1</sup>; ANA, 0.25 mg L<sup>-1</sup>) el 80% eran callos friables, en el medio MI-14 (2,4-D, 2 mg L<sup>-1</sup>; 6-BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup>; D-sorbitol, 0.6 mM; AgNO<sub>3</sub>, 3 mg L<sup>-1</sup>) (41.5% fueron compactos) y en el medio MI-11 (2,4-D, 1 mg L<sup>-1</sup>; cinetina, 1 mg L<sup>-1</sup>) 62.2% tenía mucilago (Cuadro 2). La mayor variación en las características de los callos fueron observados en los medios con 2,4-D y BAP, que en los que contenían cinetina, AIA y ANA (Cuadro 2). Los tipos de callos observados en la presente investigación fueron morfológicamente similares a los reportados para trigo (Ul Hassan *et al.*, 2009) y *Zoysia japonica* (Wang *et al.*, 2010).

#### 3.2. Regeneración de Plantas

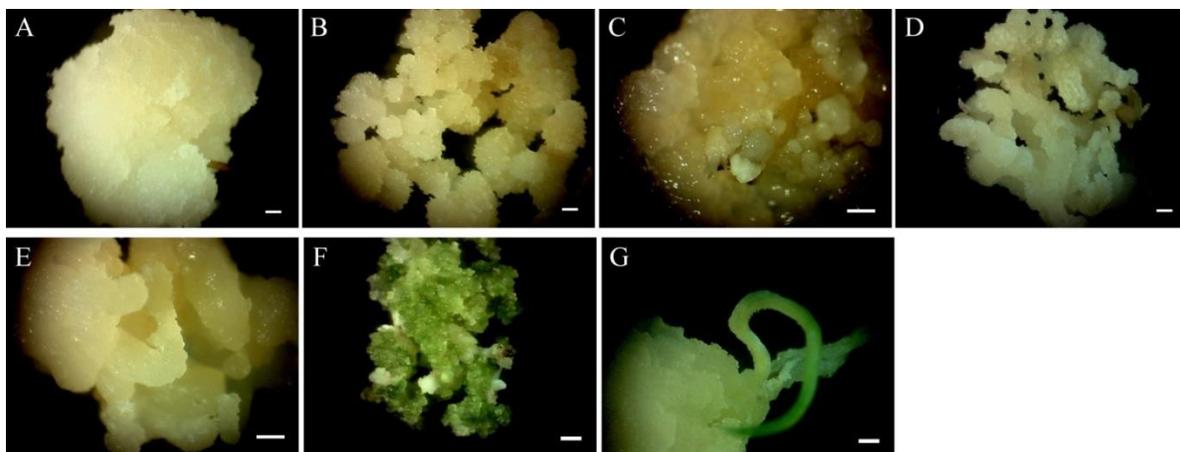
Sólo los cariósides cultivados en un medio con 2,4-D (2 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0.2 mg L<sup>-1</sup>) y sorbitol (0.6 mM) durante 14 días (MI-14) formaron callos embriogénicos (4.3%) (Cuadro 3; Figura 2A).

**Cuadro 2.** Características de los callos formados a partir de cariósides de *B. curtipendula* cultivados en diferentes medios de inducción.

Medio	Tipo de callos (%)				Frecuencia de inducción (%)
	Suave	Friable	Compacto y semicompacto	Envuelto en mucilago	
MI-1	69.8 ± 4.6	25.9 ± 5.2	0.0 ± 0.0	4.3 ± 2.8	46.5 ± 5.5 <sup>bc</sup>
MI-2	22.1 ± 4.0	73.1 ± 5.3	4.9 ± 2.9	0.0 ± 0.0	28.5 ± 2.5 <sup>de</sup>
MI-3	86.7 ± 5.2*	9.4 ± 4.1	0.0 ± 0.0	3.8 ± 3.8	34.7 ± 4.3 <sup>dc</sup>
MI-4	51.7 ± 5.5	17.5 ± 11.8	0.0 ± 0.0	30.8 ± 10.8	8.7 ± 1.1 <sup>f</sup>
MI-5	25.3 ± 9.2	56.5 ± 10.8	0.0 ± 0.0	18.2 ± 7.2	16.8 ± 5.0 <sup>ef</sup>
MI-6	16.3 ± 6.0	59.0 ± 14.7	0.0 ± 0.0	24.6 ± 0.4	10.4 ± 3.4 <sup>f</sup>
MI-7	35.6 ± 8.3	64.4 ± 8.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	20.3 ± 2.0 <sup>def</sup>
MI-8	41.3 ± 3.7	41.0 ± 5.0	5.9 ± 3.4	11.8 ± 0.4	16.4 ± 2.0 <sup>ef</sup>
MI-9	30.0 ± 4.9	64.7 ± 6.3	0.0 ± 0.0	5.3 ± 3.1	18.4 ± 2.7 <sup>def</sup>
MI-10	34.1 ± 10.0	63.2 ± 9.3	0.0 ± 0.0	2.8 ± 2.8	12.7 ± 1.1 <sup>ef</sup>
MI-11	0.0 ± 0.0	37.8 ± 5.5	0.0 ± 0.0	62.2 ± 5.5*	17.9 ± 3.2 <sup>def</sup>
MI-12	12.0 ± 2.7	80.0 ± 2.8*	5.7 ± 2.1	2.4 ± 1.5	66.3 ± 5.1 <sup>a</sup>
MI-13	66.7 ± 20.1	13.0 ± 5.7	18.5 ± 16.2	1.8 ± 1.8	52.0 ± 1.6 <sup>ab</sup>
MI-14	4.5 ± 4.5	41.5 ± 9.7	43.1 ± 6.0*	6.6 ± 2.3	66.2 ± 4.3 <sup>a</sup>

Los valores mostrados son promedios por tratamientos ± EEM (n=4). Valores con diferentes letras en cada columna son significativamente distintos (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

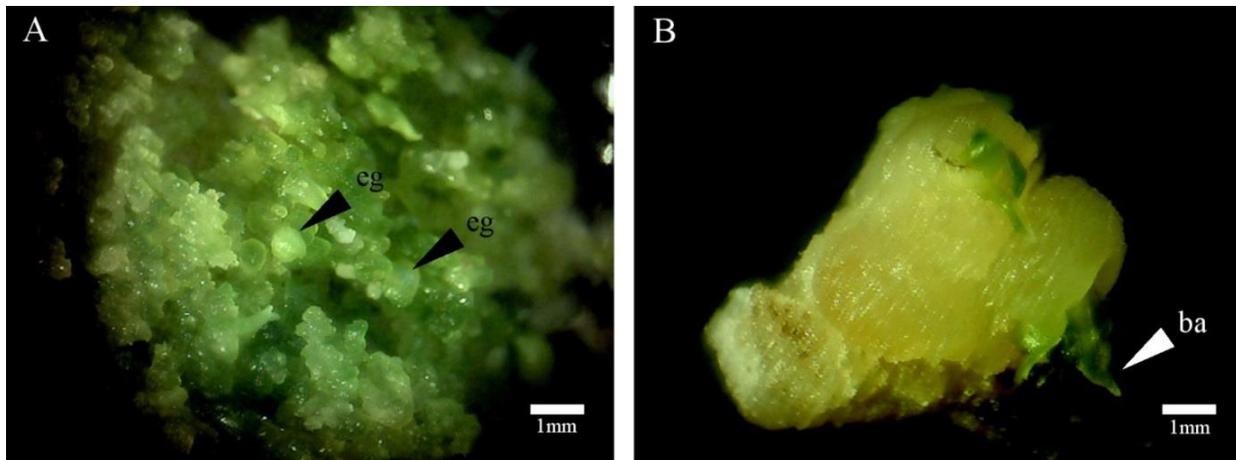
Estos resultados indican que para la inducción de la embriogénesis somática fue necesaria la presencia de sorbitol y 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D en el medio de inducción (Cuadro 3), ya que en el medio que contenía sorbitol a 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (MI-13) se formaron brotes adventicios (la mayoría anormales) por organogénesis (Figura 2B). No obstante, dichos brotes se oxidaron y murieron a los pocos días de haberse formado. El valor máximo de regeneración de estos callos (20%) se observó en aquéllos cultivados en el medio MR-2 (Cuadro 3).



**Figura 1. Callo obtenidos a partir de carióspsides maduros de un ecotipo apomíctico de *B. curtipendula* cultivados en diferentes medios de inducción de embriogénesis somática. A) callo suave acuoso (hiperhidratado), B) callo friable, C) callo envuelto en mucilago, D) semicompacto, E) compacto, F) callo embriogénico con pigmento clorofílico G) callo suave organogénico. Barra= 1 mm.**

Los callos no embriogénicos tenían una tonalidad amarillo-café claro, sin consistencia de forma irregular y con apariencia acuosa (Figura 1 A-E). En contraste, los callos embriogénicos eran nodulares y poco hidratados, y produjeron pigmento clorofílico de manera similar a los de *Bouteloua gracilis* y *Z. japónica* cuando se les cultivó en los medios de regeneración (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010). Cabral *et al.* (2011) indujeron callos embriogénicos a partir de vástagos en *B. brizantha* en mayor frecuencia (35%) de la que se obtuvo con *B. curtipendula*; sin embargo, no se reportó el número de embriones por explante, ni la eficiencia de conversión.

La máxima frecuencia (95.8%) de callos embriogénicos se obtuvo al cultivar los callos formados en el medio MI-14 (2,4-D 2 mg L<sup>-1</sup>, BAP 0.2 mg L<sup>-1</sup> y sorbitol) en el medio MR-2 que contenía cinetina, ANA y AG<sub>3</sub>, mientras que los valores más bajos se observaron en los callos cultivados en el medio MR-4 que incluía TDZ y ANA (Cuadro 3). Cabe señalar que la biomasa de los callos embriogénicos obtenidos en el medio MI-14 incrementó notoriamente en los medios de regeneración.



**Figura 2. Morfogénesis a partir de callos de *Bouteloua curtipendula* cultivados en los medios que contenían sorbitol. A) Callos altamente embriogénicos obtenidos en el medio MI-14. B) Brotes adventicios emergiendo de un callo suave obtenido del medio MI-13. *eg* embrión en estado globular, *ba* brote adventicio.**

Por otra parte, el número de embriones formados por gramo de peso fresco de callo fue significativamente diferente en los distintos medios de regeneración, obteniéndose hasta 38 embriones en el medio MR-2 (Cuadro 4). La concentración del ANA ( $0.1-0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y del AG<sub>3</sub> ( $0.2-0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) en los medios MR-1, MR-2 y MR-4 indujo de mejor manera la diferenciación de los embriones somáticos a partir de las masas proembriogénicas (MPE) que la concentración de estos reguladores presentes en el medio MR-3. Asimismo, el número de plantas regeneradas por gramo de peso fresco en los medios MR-1 y MR-2 fue significativamente mayor (4.5 y 5.3 plantas, respectivamente) que en el medio MR-3 (Cuadro 4).

Al igual que para el número de embriones y el número de plantas regeneradas, la eficiencia de conversión mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 4). La combinación de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de cinetina con concentraciones de  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA y  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  AG<sub>3</sub> indujo los valores más bajos de conversión (9.5%) (MR-3); mientras que los callos cultivados en el medio con TDZ y ANA (MR-4) no mostraron diferencias estadísticas con respecto a los medios MR-1 y MR-2 (Cuadro 4).

**Cuadro 3.** Respuesta de los callos obtenidos a partir de carióspsides de *B. curtipendula* después de ser cultivados en cuatro medios de regeneración.

Medio	Callos embriogénicos/organogénicos (%)			
	MR-1	MR-2	MR-3	MR-4
MI-1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-11	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-12	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MI-13	8.3 ± 4.8 <sup>b</sup>	20.8 ± 8.0 <sup>a</sup>	8.1 ± 4.8 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0
MI-14	87.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	95.8 ± 4.2 <sup>a</sup>	91.7 ± 4.8 <sup>a</sup>	66.7 ± 6.8 <sup>b</sup>

Valores con la distinta letra dentro de una fila son significativamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.01$ ).

El porcentaje de conversión osciló entre 9.5 y 13.9% lo que significa que solo una pequeña parte de los embriones diferenciados logró desarrollarse en plantas, como ha ocurrido en otras gramíneas forrajeras.

La condición recalcitrante de esta especie requirió de una estrategia basada en el uso del estrés osmótico para la regeneración de plantas. La exposición de los explantes al sorbitol durante 14 días estimuló la formación de callos constituidos por células que lograron sobrevivir al estrés osmótico y que eran altamente competentes para formar embriones somáticos (Cabrera-Ponce *et al.*, 2014).

**Cuadro 4.** Regeneración de plántulas y eficiencia de conversión a partir de callos embriogénicos de *B. curtipendula* obtenidos en el medio de inducción MI-14, cultivados en diferentes medios de regeneración.

<b>Medio</b>	<b>No. de embriones (1 g callo)</b>	<b>No. de plantas (1 g callo)</b>	<b>Eficiencia de conversión (%) (1 g callo)</b>
MR-1	35.5 ± 5.8 <sup>a</sup>	4.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	12.5 ± 1.1 <sup>a</sup>
MR-2	38.0 ± 3.2 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	13.9 ± 1.2 <sup>a</sup>
MR-3	27.0 ± 2.0 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	9.5 ± 1.5 <sup>b</sup>
MR-4	35.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.5 <sup>ab</sup>	10.6 ± 1.1 <sup>ab</sup>

Los valores mostrados son promedios por tratamientos ± EEM (n=4). Valores con distintas letras dentro de columna son significativamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

Claeys *et al.*, (2014) postula que el estrés osmótico implica la reducción del agua disponible en el medio, lo que genera estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno, superóxido, etc.), que da lugar a cambios fisiológicos o metabólicos a nivel celular tales como; glicolisis, gluconeogénesis y ciclo del piruvato (Shen *et al.*, 2012). Asimismo, Huang *et al.* (2012) sugieren que el estrés osmótico estimula la producción endógena de hormonas como el ABA y permite que las células alcancen un balance hormonal endógeno óptimo para que ocurra la embriogénesis.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman el efecto positivo del estrés osmótico en la inducción de embriogénesis somática, tal como se ha reportado en algunos estudios en cereales como; maíz (Swedlund y Locy, 1993), arroz (Joiya y Khan, 2013; Yinxia y Te-chato, 2013; Lee y Huang, 2014) y trigo (Ul Hassan *et al.*, 2009).

La formación de callos embriogénicos en algunas especies forrajeras como el pasto bermuda ha sido extremadamente difícil y pocas plantas se han podido regenerar (Chaudhury y Qu, 2000). En otras especies como *U. brizantha*, se ha reportado la formación de embriones somáticos a partir de diferentes explantes y medios de cultivo

(Cabral *et al.*, 2011). En trigo, el uso de estrés osmótico a partir de diferentes concentraciones de agar provocó una mejor regeneración de plantas (Nehmoode *et al.*, 2013), pero en ambos estudios no muestran la eficiencia de conversión.

Los carióspsides cultivados bajo estrés osmótico en el medio MI-14 (Figura 3A), formaron masas embriogénicas después de seis semanas de iniciar el cultivo (Figura 3B). El cultivo de las MPE en medios de regeneración estimuló la diferenciación de los embriones somáticos después de tres semanas (Figura 3C). Fue posible observar fases propias de la embriogénesis somática de monocotiledóneas: globular, escutelar y coleoptilar (Figura 3D, 3E). La conversión de los embriones en plantas ocurrió después de la segunda semana en que estos se cultivaron en la fase de maduración (Figura 3F, 3G) y una vez que formaron raíces, fueron transferidas a medio MS<sub>50</sub> (Figura 3H).

### 3.3. Estudio Histológico

Embriones globulares fueron formados en la periferia de la MPE a los 15 días de cultivo en los medios de regeneración (Figura 4A) como también lo observaron (Cabrera-Ponce *et al.*, 2014) en frijol. Cinco días más tarde fue posible observar la transición de los embriones a la fase escutelar (Figura 4B y 4C) y coleoptilar (Figura 4D). Estos embriones continuaron su desarrollo hasta formar vástagos en los que se distinguían los primordios foliares (Figura 4E y 4F) y después de 10 días de cultivarse en el medio de maduración formaron el sistema radical (Figura 4G), lo que permitió sobrevivir una vez que fueron transferidos a invernadero. La eficiencia de conversión en ciertas monocotiledóneas forrajeras no es reportada, la regeneración de callos a partir de explantes de tejido vegetal ha sido extremadamente recalcitrante y pocas plantas han sido obtenidas (Chaudhury y Qu, 2000).

Fue posible regenerar plantas de *B. curtipendula* a partir de carióspsides maduros, contrario a lo observado en otras especies de monocotiledóneas en las que la formación de callos embriogénicos ha sido extremadamente difícil y la eficiencia de regeneración ha sido muy baja (Chaudhury y Qu, 2000; Cabral *et al.*, 2011).

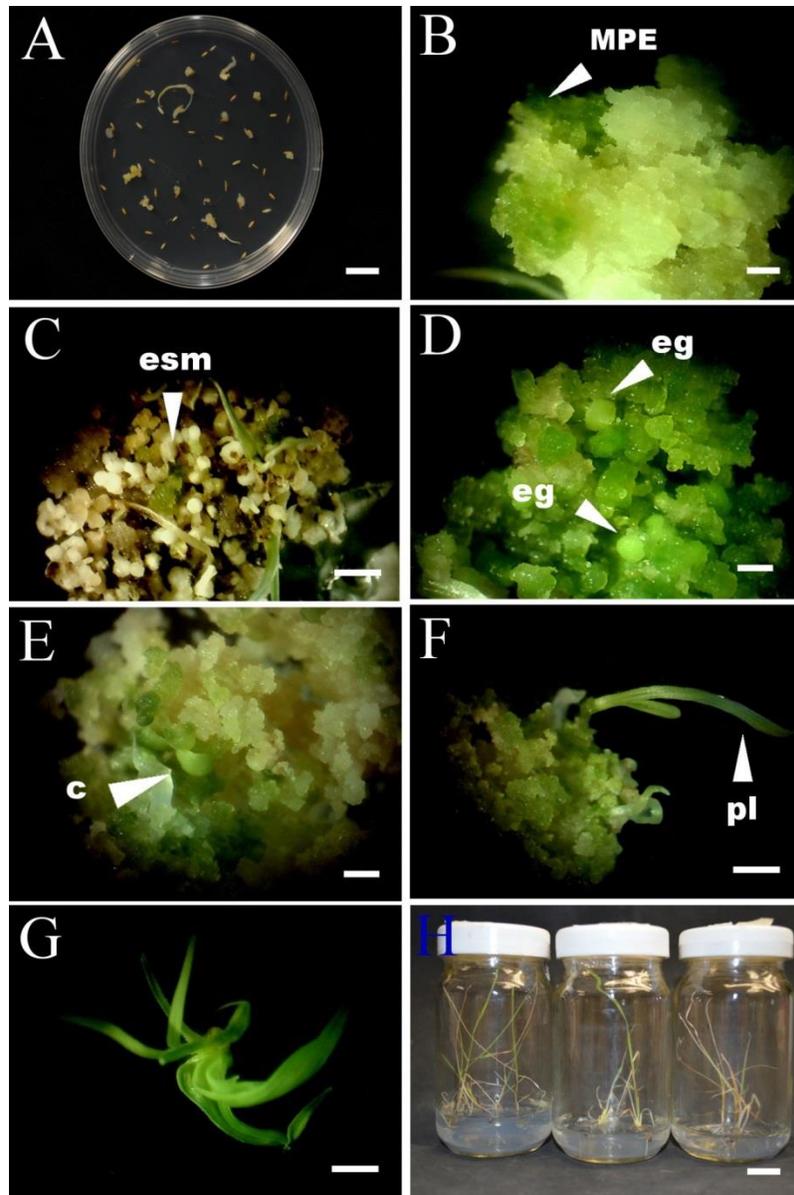


Figura 3. Embriogénesis somática en *B. curtipendula* inducida bajo estrés osmótico. A) Cariópsides maduros Barra: 1 cm; B) Masa proembriogénica (MPE) 20 días después de haberse cultivado en los medios de regeneración, Barra: 1 mm; C) Embriones somáticos diferenciados a partir de MPE, Barra: 1 mm; D) Embrión en fase globular emergiendo de la MPE, Barra: 1 mm; E) Embrión en fase coleoptilar, Barra: 1 mm; F) planta de ocho días de edad. Barra: 1 mm; G) planta normal regenerada de callos embriogénicos. H) Planta con raíz después de 15 días de cultivarse en el medio de maduración. *c* fase coleoptilar, *eg* fase globular, *esm* embrión somático maduro, *pl* plántula. Barra de escala=1mm.

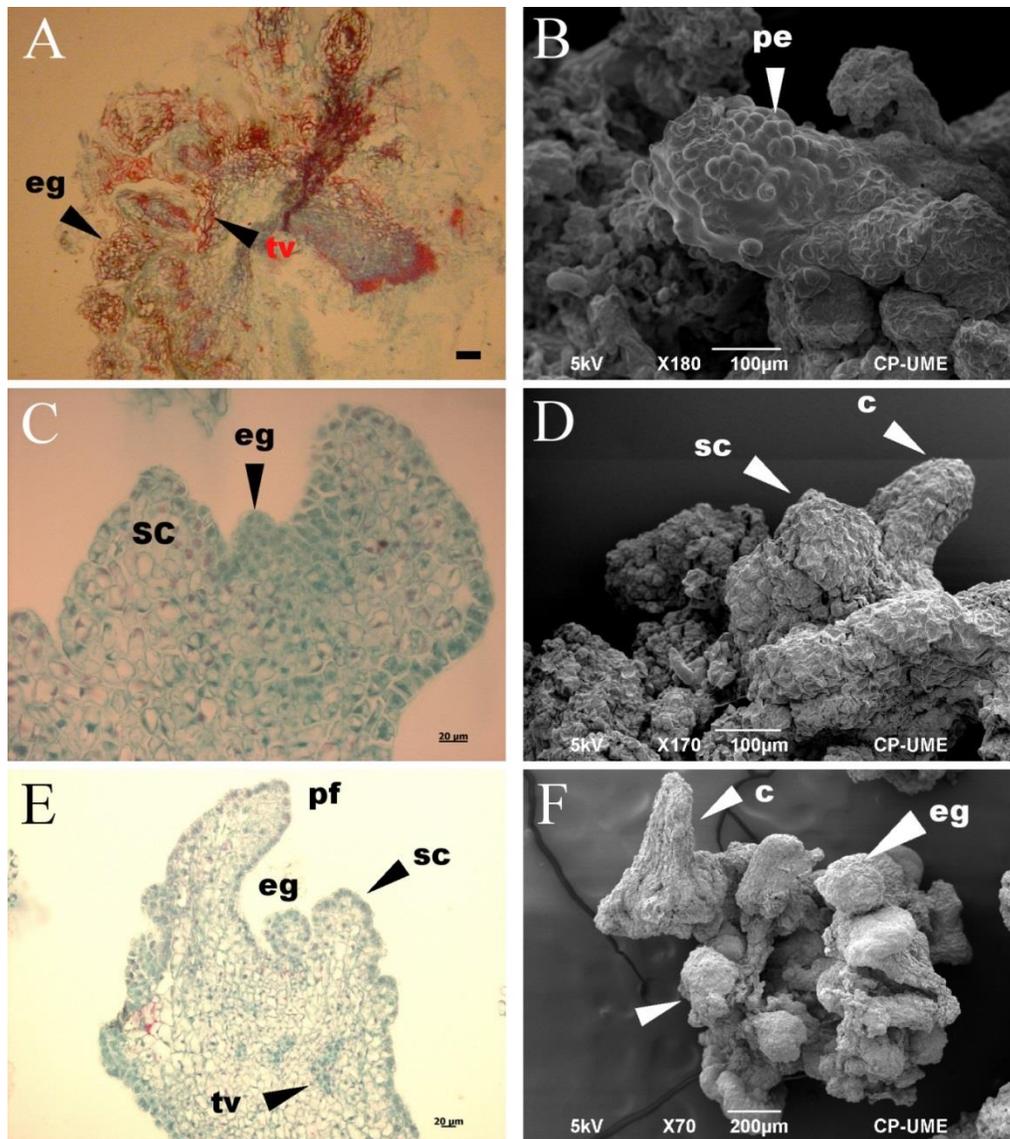


Figura 4. Embriogénesis somática a partir de cariósides maduros de *B. curtipendula*. A) Micrografía de embriones en fase globular temprana emergiendo de la MPE después de una semana de cultivarse en un medio de regeneración, Barra: 100  $\mu$ m; B) Embriones en fases globular y escutelar después de ocho días de cultivo en un medio de regeneración, C) Embriones en la fase escutela temprana. D) Micrografía de barrido mostrando embriones con escutelo y coleóptilo bien diferenciados, E) Embriones con primordios foliares y estructuras bipolar, F) Micrografía de embriones somáticos en fase coleoptilar avanzada. c coleóptilo, eg embrión en estado globular, pf primordio foliar, sc escutelo, tv tejido vascular.

Aunque fue posible la regeneración de plantas a partir de los callos embriogénicos obtenidos mediante el protocolo desarrollado para *B. curtipendula* más investigación es necesaria para incrementar la eficiencia de conversión de los embriones en plantas.

#### **4. CONCLUSIONES**

El protocolo desarrollado aquí permitió regenerar plantas de *B. curtipendula* a partir de cariósides maduros. El estrés osmótico provocado por el sorbitol en combinación con 2,4-D, BAP presentes en el medio de cultivo, promovió la formación de callos altamente embriogénicos. La eficiencia de conversión de los embriones en plantas aún es baja y requiere más investigación. Hasta donde se conoce, esta investigación constituye el primer trabajo sobre regeneración de plantas de *B. curtipendula* mediante embriogénesis somática y sienta las bases para el mejoramiento de este pasto apomíctico mediante ingeniería genética.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca (99933) otorgada a Álvaro Bernal Flores para realizar sus estudios de doctorado. A las líneas de investigación LPI16, LPI11, del Colegio de Postgraduados.

## 5. LITERATURA CITADA

- Aguado-Santacruz GA, JL Cabrera-Ponce, V Olalde-Portugal, Ma R Sánchez-González, J Márquez-Guzmán and L Herrera-Estrella (2001) Tissue Culture and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) LAG. EX STEUD. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant Sciences. 37:182-189.
- Aina O, K Quesenberry and M Gallo (2012) Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. Crop Science. 52:1076-1083.
- Bernal-Flores A, Quero-Carrillo AR, Pérez-Rodríguez P, Zavaleta-Mancera HA (2014) Empleo del sorbitol y su respuesta en embriogénesis somática *Bouteloua curtipendula* apomíctica. V Congreso Internacional de Manejo de pastizales.
- Cabral GB, VTC Cameiro, AL Lacerda, CB do Valle, AP Martinelli and DMA Dusi (2011) Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 107:271-282.
- Cabrera-Ponce JL, L López, CG León-Ramírez, AE Jofre-Garfias, A Verver-y-Vargas (2014) Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. Protoplasma/DOI 10.1007/s00709-014-0702-4.
- Carloni E, A Ribotta, CE López, S Griffa, M Quiroga, E Tommasino, K Grunberg (2014) Somatic embryogenesis from in vitro anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 117:311-322.
- Claeys H, S Van Landeghem, M Dubois, K Maleux, D Inzé (2014) What is stress? Dose-Response Effects in commonly used in vitro stress Assays. Plant Physiology. 165:519-527.
- Chaudhury A y R Qu (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60:113-120.
- Chen L, Ch-K Auh, P Dowling, J Bell, D Lehmann and Z-Y Wang (2004) Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). Functional Plant Biology. 31:235-245.
- Dobson A (2002) An Introduction to Generalized Linear Models. Second edition. Chapman & Hall/CRC. London. 240 p.
- Fehér A, TP Pasternak & D Dudits (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 74:201-228.

- Gould FW (1979) The genus *Bouteloua* (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 66(3):348-416.
- Hosmer DW y S Lemeshow (2000) *Applied Logistic Regression*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley, New York.
- Huang W-L, Ch-H Lee y Y-R Chen (2012) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 108:257-263.
- Hu XR, Yang AF, Zhang KW, Wang J and Zhang JR (2006) Optimization of in vitro multiple shoot clump induction and plantlet regeneration of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84:89-98.
- Immonen S, and Anttila H (1999) Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57:121-127.
- Jensen WA (1962) *Botanical Histochemistry. Principle and Practice*. Freeman WH & Co., San Francisco, CA. pp. 71-91.
- Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York. pp. 1-523.
- Joyia FA y MS Khan (2013) Scutellum-derived Callus-based Efficient and reproducible regeneration system for elite varieties of indica rice in Pakistan. *International Journal of Agricultural & Biology*. 15(1):27-33.
- Lee Sh-T y W-L Huang (2014) Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation. *Plant growth Regulators*. 73:193-204.
- Lichtenthaler HK (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 851:187-198.
- Mehmood K, M Arshad, GM Ali, A Razzaq (2013) Tissue culture responses of some wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Pakistan. *Pakistan Journal Botany*. 45(SI):545-549.
- Mancini M, N Voitovich, HR Permingeat, M Podio, LA Siena, JPA Ortiz, SC Pessino and SA Felitti (2014) Development of a modified transformation platform for apomixis candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). *In vitro Celular & Developmental Biology-Plant Sciences*. 50:412-424
- Morales NCR, AR Quero, A Hernández, J Pérez, SS González (2006). Evaluación de la diversidad del pasto nativo *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. Mediante marcadores de AFLP. *Agrociencia*. 40:711-720.

- Narusaka Y, K Nakashima, ZK Shinwari, Y Sakuma, T Furihata, H Abe, M Narusaka, K Shinozaki, K Yamaguchi. Shinozaki (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant Journal*. 34:137-148.
- Osuna P and JR Barrow (2004) Regeneration of black grama (*Bouteloua eriopoda* Torr. Torr) plants via somatic embryogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant Sciences*. 40:299-302.
- Park SY, HM Cho, HK Moon, YW Kim, KY Paek (2011) Genotypic variation and aging effects on the embryogenic capacity of *Kalopanax septemlobus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 105:265-270.
- Quero CAR (2001) Recursos genéticos forrajeros para zonas áridas. El complejo agámico de zacate banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.). En: Pérez JP, Hernández A, Gómez A, editores. Los forrajes en México: presente y futuro. XXXII Aniversario Especialidad de Ganadería, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. pp. 25-56.
- Quero CAR, Enríquez QJF, Morales NCR y Miranda JL (2010) Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1(1):25-42.
- Rakshit S, Z Rashid, JC Sekhar, T Fatma, S Dass (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100:31-37.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT® 9.1. User's Guide Cary, NC: SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA.
- Shen Y, Jiang Z, Yao X, Zhang Z, Lin H and Zhao M (2012) Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation. *PLOS ONE*. DOI: 7(3) 10.1371/journal.pone.0032237  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032237#pone-0032237-g004>
- Stephens LC, Fei S-Z, Xiong Y and Hodges CF (2006) Plants regenerated from embryo cultures of an apomictic clone of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L. "Baron") are not apomictic in origin. *Euphytica*. 147:383-388.
- Swedlund B y RD Locy (1993) Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant physiology*. 103:1339-1346.

- Ul Hassan M, Z Ahmed, M Munir, SI Malik and K Shahzad (2009) Effect of sorbitol in callus induction and plant regeneration in wheat. *African Journal of Biotechnology*. 8(23):6529-6535.
- Van DP and J Van Damme (2000) Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends in Plant Science*. 5(2):81-84.
- Wang X, Y Hoshino and T Yamada (2010) Rapid and efficient callus induction and plant regeneration from seeds of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Japanese Society of Grassland Science*. 56: 198-204.
- Wei ZM, M Kyo and H Harada (1986) Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv 'Sabarlis. *Theoretical and Applied Genetics*. 72:252-255.
- Yinxia Z y S Te-chato (2013) Improved plantlet regeneration system in indica rice (*Oryza sativa* L.) landrace Hom Kra Dang Ngah. *Journal of Agricultural Technology*. 9(6): 1641-1654.
- Zhang B, K Liu, Y Zhang, Y Wang, J Wang and H Liao (2013) Disruption of AtWINK8 enhances tolerance of Arabidopsis to salt and osmotic stresses via modulating proline content and activities of catalase and peroxidase. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:7032-7047.
- Zappacosta, DC, AC Ochogavía, JM Rodrigo, JR Romero, MS Meier, I Garbus, SC Pessino & VC Echineque. 2014. Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploidy. *Scientific Reports*. 4:4423 pp1-7.

## CHAPTER III

### TISSUE CULTURE AND CITOKININS PRETREATMENT ON SIDEOATS GRAMA (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.), FOR INCREASING PLANT REGENERATION LEVELS

Álvaro Bernal-Flores<sup>1</sup>, Chunxiang Fu<sup>2</sup>, Adrián Raymundo Quero-Carrillo<sup>1</sup>,  
Paulino Pérez-Rodríguez<sup>1</sup> and Zengyu Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo. Estado de México.

<sup>2</sup>Forage Improvement Division, The Samuel Roberts Noble Foundation. Ardmore. Ok  
73401.

#### 1. ABSTRACT

Organogenic calli were induced from mature caryopses of Sideoats grama *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., cv El Reno and cultured on Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented using three 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) levels (2,3 and 4 mg L<sup>-1</sup>) in the presence of 6-benzilaminopurine (BAP). Two cytokinins based pretreatments (BAP and BAP-KIN-TDZ) were used for callus developed on 2,4-D. After 10 days pretreatment, calli were cultured on regeneration medium (MSBK), supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1 mg L<sup>-1</sup> kinetin and sub-cultured each during 20 days cycles in regeneration medium, until the regeneration process was completed. Data analysis was performed through logistic regression models, negative binomial and a mixed model for studied variables. Statistical differences (P<0.05) for levels were found and 2 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D showed the highest callus induction frequency. A better regeneration response was observed at levels 3 and 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (P<0.05). Pretreatment using BAP alone (MSB) showed a better callus regeneration response as 2,4-D levels increased; on the other hand, both BAP and TDZ (MSBKT) pretreatments diminished regeneration response despite the evaluated level. Using lower auxin levels resulted in higher callus development frequency, while higher auxin levels increased

plant regeneration. Pretreatments based on cytokinins were a key factor for plant regeneration in Sideoats grama cv El Reno.

**Key words:** Reno-sideoats, protocol regeneration plant, recalcitrant apomictic, callus type.

## 2. INTRODUCTION

Sideoats grama *Bouteloua curtipendula* Michx. (Torr.) is an important perennial forage grass species showing facultative apomixis and the C<sub>4</sub> photosynthetic pathway (Pytman and Jaynes, 1980), with euploid and aneuploidy individuals (Morales et al. 2007), widely distributed within grasslands of northern Mexico and southern United States (Gould, 1959; Gould and Kapadia, 1964; Gould, 1979). This species is tolerant to grazing, salinity (González et al. 2010), and assembled with its resistance to drought as the main agronomic trait is consider an important forage species in the USA.

Sideoats cv El Reno is one of the most important cultivar developed within the USA (Alderson and Sharp, 1995), mainly used as fodder for grazing. Sideoats grama can reach a production of 3000 pound per acre in uplands (Smith et al. 2004), 67.3 % *in vitro* organic matter digestibility (IVDOM), and 10.3% crude protein (CP; White, 1986). Sideoats has been considered a key native forage species that maintains good digestibility throughout the growing season as an advantage over others species (Craig et al. 2001). The importance and impact Sideoats grama has on cow-calf systems within arid environments is relevant, so it is important to apply plant transformation techniques and hence efficient plant regeneration protocols for genetic improvement programs. Traditional breeding programs based on phenotypic evaluation, selection and hybridization have been used in many species to increase forage production and nutritional quality (Wang et al. 2010). On the other hand, also molecular biology techniques as tool, have been applied to forage improvement programs for many forage species of economic interest (Wang and Ge, 2006; Wang et al. 2010), and solid advancements for good forage quality production under marginal environments are required for both animal production and ethanol production for Sideoats grama.

Plant tissue culture is a procedure increasingly important as a tool for plant breeding, especially for genetic transformation with the purpose to incorporate features with agronomic interest to plants. Protocols of tissue culture and regeneration have been developed for Blue grama grass (*Bouteloua gracilis*) (Aguado-Santacruz et al. 2001) and Black grama (*Bouteloua eriopoda*; Osuna and Barrow, 2004). For apomictic species such as *Urochloa brizantha* (*Brachiaria brizantha*; Lenis-Manzano et al. 2010)

and different Guineagrass (*Panicum* spp.) (Chen et al. 2002; Seo et al. 2008) showing notorious differences for both calli induction and plant regeneration.

Highly efficient protocols for plant regeneration from calli, has been useful in the genetic breeding success and considered key factors for genetic transformation (Seo et al. 2008; Wang et al. 2010). Factors such as genotype, explant type, culture medium, plant growth regulators (PGRs), and culture conditions, are fundamental in the potential for calli induction (Chai et al. 2011; Zhao et al. 2011).

Sideoats grama is a recalcitrant for regeneration species and calli induction pretreatments may be an alternative for increasing plant regeneration levels. Several pretreatments have been used in order to increase regeneration efficiency for maize calli culture: DL-alpha-difluoromethylarginine (DFMA; Tiburcio, et al. 1991), cold-pretreatment for anthers culture (Ziauddin et al. 1990; Immonen and Anttila, 1999), 2,4-D and cytokinins (BAP and kinetin) in combination with casein hidrolysate (Mustafa and Khan, 2012) and dark-light periods (Franklin et al. 2006) both for sugar cane and recently polyamines and abscisic acid (ABA) in tissue from *Chicorium* (Couillerot et al. 2012).

### 3. MATERIALS AND METHODS

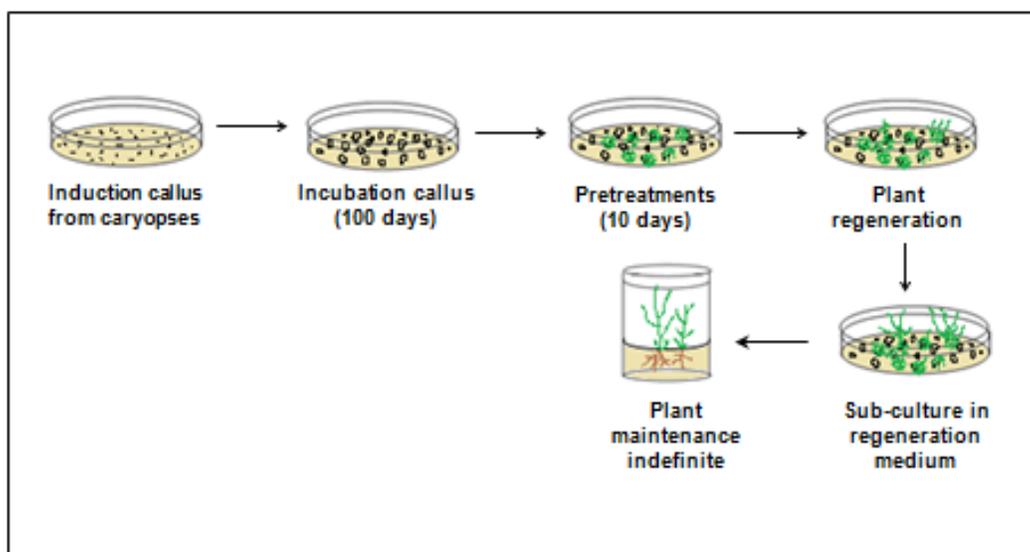
Mature caryopses from commercial Sideoats grama cv “El Reno” were evaluated. Caryopses were disinfected using 70% ethanol during 3 minutes and then placed within calcium hypochlorite 3% plus 0.1% Tween 80, during 3 hours in stirrer, followed by rinsing with miliQ water autoclaved and then left overnight at 4 °C. The following day, caryopses were placed within 80 ml of autoclaved water and 2 ml of PPM (Preservative for plant tissue culture, Media active) were added and placed on stirrer during 1 hour and rinsed 5 times.

#### 3.1. *Callus* Induction and Pretreatments

Preliminary studies were conducted for Sideoats grama and subsequent treatments were formulated. Three 2,4-dichlorofenoxiacetic acid (2,4-D; 2, 3, 4 mg L<sup>-1</sup>) levels and a

unique 6-benzylaminopurine (BAP;  $0.15 \text{ mg L}^{-1}$ ) level were evaluated. Growth media was supplemented on MSbasal medium (Murashige and Skoog, 1962), containing  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose to induce calli. All media were solidified with 0.78% agar (w/v), pH adjusted to 5.8 using 1N KOH, and autoclaved to 18 PSI/120 °C.

A total of 200-250 caryopses were exposed to each 2,4-D levels for a 100 days period and incubated in the dark at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Two pretreatments were evaluated: 1). MSB alone and 2) MSB, kinetin (KIN) and NN-phenyl-N-1,2,3,-thidiazol-5-ylurea [(thidiazuron (TDZ)] (MSBKT)) and a unique regeneration medium was used for all calli. Calli were placed within growth chamber conditions under a 12h photoperiod and light intensity of  $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; subsequently, placed within maintenance media for indefinite time (Fig.1). Twenty five calli per 2,4-D level were selected randomly for growth rate evaluation during the calli induction period (Hunt, 1982).



**Fig 1** Steps involved for tissue culture and plant regeneration for Sideoats grama. Calli were induced from caryopses using three 2,4-D levels and placed within pre-treatments as a step previous to the regeneration medium.

### 3.2. Plant Regeneration

Same regeneration medium was formulated for all treatments, supplemented using  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose, 6-BAP  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ , and Kinetin  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Seven pieces of calli were placed

on regeneration medium and subcultured each 20 days in the same medium. Following the development on pieces of plantlets/callus (on average 30 d after clearly differentiated seedlings), plants were transferred to maintenance media within half-strength MS basal medium supplemented with 8 g L<sup>-1</sup> sucrose and left there for indefinite period, in order follow root development.

### 3.3. Greenhouse

Plantlets were transplanted into pots containing a commercial soil mixture (Growing medium 830) and placed during an eight days period within a mist chamber, under a relative humidity of 90-95% and 25±1°C of temperature. Plants were then placed within a conditioning chamber during eight days then placed under 16/8-h (light/dark) greenhouse conditions and 25±1°C. Regenerated plantlets were observed during their growth and development until 60 days old.

### 3.4. Statistical Analysis

**Callus induction frequency.** Logistic Regression Model was used to analyze this variable (Hosmer and Lemeshow, 2000; Zhao, et al. 2011). Treatment effect was included within the model using indicator variables and the reference cell method with treatment two as reference. Differences among treatments were tested using Likelihood Ratio Tests. The analysis was performed using the LOGISTIC routine included in SAS/STAT 9.1 for Windows.

**Growth rate.** A Mixed Model was used to analyze the growth rate at three different ages. The model included treatment, time, effect and interaction time x treatment effects. Least Squares Means (LSM) were computed using Tukey adjustment for comparison among treatments. Data analysis was performed using the MIXED routine in the program SAS 9.1 for Windows.

The proposed model is as follows:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{ij} + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + e_{ijk}$$

where:

$y_{ijk}$  = is the response variable measured at time  $k$  ( $k = (1,2,3)$ ) for subject  $j$  ( $j = 1, \dots, 225$ ) and treatment  $i$  ( $i = 1,2,3$ ).

$\mu$  = is the general mean.

$\alpha_i$  = is the effect of treatment  $i$ .

$\gamma_k$  = takes in to account the time effect.

$(\alpha\gamma)_{ik}$  = takes into account the treatment x time interaction.

$b_{ij} \sim NIID(0, \sigma_u^2)$  = is a random effect for subject  $j$ , treatment  $i$ .

$e_{ijk} \sim NIID(0, \sigma_e^2)$  = is random error.

$b_{ij}$  and  $e_{ijk}$  = are assumed to be independent.

**Plant Regeneration.** Negative Binomial Regression was used to analyze plant regeneration counts for the three 2,4-D levels and considering pretreatment effects. The effect of pretreatment was included in the analysis under a similar scheme to that of Logistic Regression, *i.e.* with the inclusion of indicator variables taking treatment A as reference. Differences among treatments were tested using Likelihood Ratio Tests. Goodness of fit of the proposed model was checked using the Deviance Information Criterion (DIC). The analysis was performed using GENMOD routine in the program SAS 9.1 for Windows.

## 4. RESULTS

### 4.1. Calli induction and Growth Rate

Based on preliminary studies on Sideoats grama cv. El Reno, it was determined that a supplementation using 2,4-D and BAP medium would be sufficient to initiate calli induction phase. Over 210 caryopses/treatment were used for calli induction for the 2,4-D [2(M2), 3(M3), 4(M4) mg L<sup>-1</sup>] levels, as well as the BAP level. Statistical differences ( $P < 0.05$ ) were observed among treatments. The Likelihood Ratio Test using M2 treatment as a reference for treatments comparison demonstrated M4 as the lower responsive for calli induction (Table 1). Different calli types were observed among culture medium, three predominant and well defined calli types were observed for each

medium with different percentages for each 2,4-D levels (Fig. 2). Friable-light yellow colored calli types were predominant for medium added with 3 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (35.6%); other callus type, defined as semicompact with friable calli at the top occupied the largest percentage with 34.6% for the 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D medium (Table 2). Embryogenic callus within a mucilaginous matrix (Aguado-Santacruz et al. 2001) showed a smaller share for all medium. Other calli, defined by mixing predominant callus (soft-friable, watery soft, and friable-hard compact), were observed in higher frequency for lower 2,4-D levels. In addition, calli frequency induction was higher for the lowest 2,4-D level, and its presence diminished as 2,4-D levels increased.

Sideoats grama calli induction using caryopses showed to be critically dependent on 2,4-D levels. Calli induction rate was very low (46%) to the highest 2,4-D level. The optimum 2,4-D concentration for calli induction for Sideoats grama was 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D higher percentages of other calli were observed using lower 2,4-D levels. Calli frequency induction in response to 2,4-D concentration of 2 mg L<sup>-1</sup> were significantly higher than those induced at 3 and 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. However, as 2,4-D concentration increased, semicompact calli type increases also, friable calli percentage remained constant, while other callus type percentage showed a reduction.

**Table 1** Comparison among treatments with reference to the treatment M2 for Maximum Likelihood estimates, using Logistic Regression procedure for variable calli induction.

Parameter	DF	Estimate	SE	Wald $\chi^2$	P value
Intercept	1	0.5500	0.1450	14.38	0.0001
M3	1	-0.4983	0.1956	6.48	0.0109
M4	1	-0.7121	0.1953	13.28	0.0003

**Table 2** Calli induction frequency from Sideoats grama cv El Reno caryopses under three 2,4-dichlorofenoxyacetic acid (2,4-D) levels.

2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Caryopses treatment <sup>-1</sup>	Types of calli (%)				Callus induction (%)
			1	2	3	4	
2	0.15	214	31.0±2	26.4±3	3.7±2	38.9±4	62.2
3	0.15	232	35.6±5	27.2±3	9.2±2	28.0±3	51.4
4	0.15	235	32.1±3	34.6±4	5.6±3	27.7±5	46.0

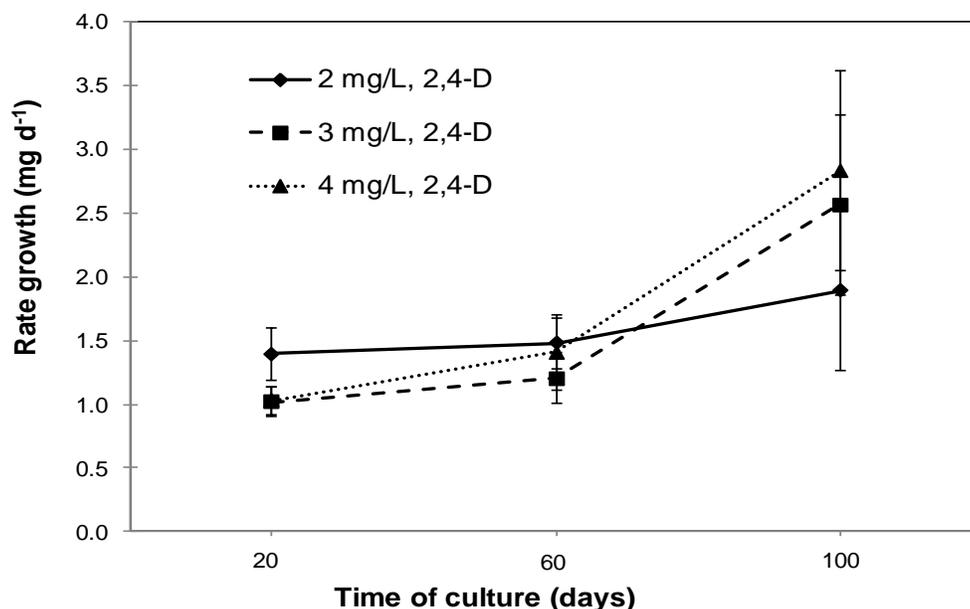
1. Friable calli; 2. Semicompact calli; 3. Calli showing mucilaginous matrix; 4. Other calli (compact hard, soft and watery). Data shown are the mean of average ± SE.

Significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed among treatments, time, and the interaction treatment x time at three different calli growth stages of Sideoats grama cv. El Reno (Table 3). Growth rates were determined on individual calli for 2,4-D levels. Calli were subcultured within new growth media for each assessed stage and its growth evaluated after 100 days (Fig 3). A better response was observed for 2,4-D levels for the first 20 days.



**Fig 2** Characteristic callus phenotype of Sideoats grama developed during the induction process. I. Friable callus; II. Semicompact calli showing friable callus at the top; III. Callus within mucilaginous matrix. Bar 100 µm.

Two growth phases were observed at all tested 2,4-D levels: a phase of slow growth during the first 20 days, followed for a rapid growth phase continued until evaluation period ended.



**Fig 3** Rates of growth at different levels of 2,4-D for evaluated sideoats grama cv El Reno calli during 100 days. Calluses were subcultured in each period evaluated. I: Bar represent error standard deviation.

A low 2,4-D level was highly active in stimulating calli growth during the first development days, but higher 2,4-D levels stimulated elevated callus growth. Subculture stimulated growth in all calli and an exponential growth phase was observed for all 2,4-D levels. Friable calli showed the highest growth rates, while calli with brownish coloration showed the lowest growth and finally died (data not shown).

**Table 3** Sideoats grama cv El Reno growth rates for testing effect treatment time effect and interaction time x treatment using a mixed model.

Effect	DF	F value	P value
Treatment	2	4.34	0.0142
Time	2	81.13	<0.0001**
Treatment x time	4	3.31	0.0117

\*\* Highly significant at  $P=0.05$  with LSM test were computed using Tukey adjustment

## 4.2. Pretreatment and Plant Regeneration

In order to optimize Sideoats grama plant regeneration response, several pretreatments were studied based on two cytokinins (Table 4). A single pretreatment formulated with BAP (MSB) and a second combination using BAP, Kinetin, and TDZ (MSBKT). The importance of the pretreatment for plant regeneration was highly significant ( $P < 0.05$ ), showing a big difference among plants regenerated using MSB pretreatment. Regeneration response was strongly influenced by cytokinins, but a greater degree with BAP alone, while the combination of BAP, kinetin and TDZ had little effect on plant regeneration.

Pretreated callus using MSB media developed numerous globular structures (Fig 4b), mainly within friable callus. A similar response was observed for callus on MSBKT media (Fig 4c); whereas callus placed directly on regeneration media developed numerous hair-like structures, (Fig 4a) do not regenerated plants. Pretreated calli exhibited strong chlorophyllic pigment concentration and this was more noticeable for friable callus regarding other calli types. Pigmented callus occurred within a 10 days period for pre-treated calli and continued until these were placed in regeneration (MSBTK) media. Pretreatment stimulated cells toward plant regeneration and this effect showed to be better once BAP acted alone instead of combined with kinetin and TDZ. The MSBK regeneration media supplemented with BAP and kinetin was responsible for completing the regeneration process and was more evident in callus from 3 and 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D.

Organogenic calli derived from mature caryopses (Fig 5a), were pretreated and subcultured every 20 days on MSBK regeneration media, including the control media, until achieve plant regeneration completely (Fig 5b). Best plant regeneration responses were observed for friable and semicompact friable calli. Calli hard, soft, watery, brown and those involved within mucilaginous matrix did not show plant regeneration. Regenerated plants were placed within maintenance media and maintained during indefinite time within growth chamber conditions (Fig 5c). Plants with good root development were transplanted to pots and placed under greenhouse conditions (Fig 5d).

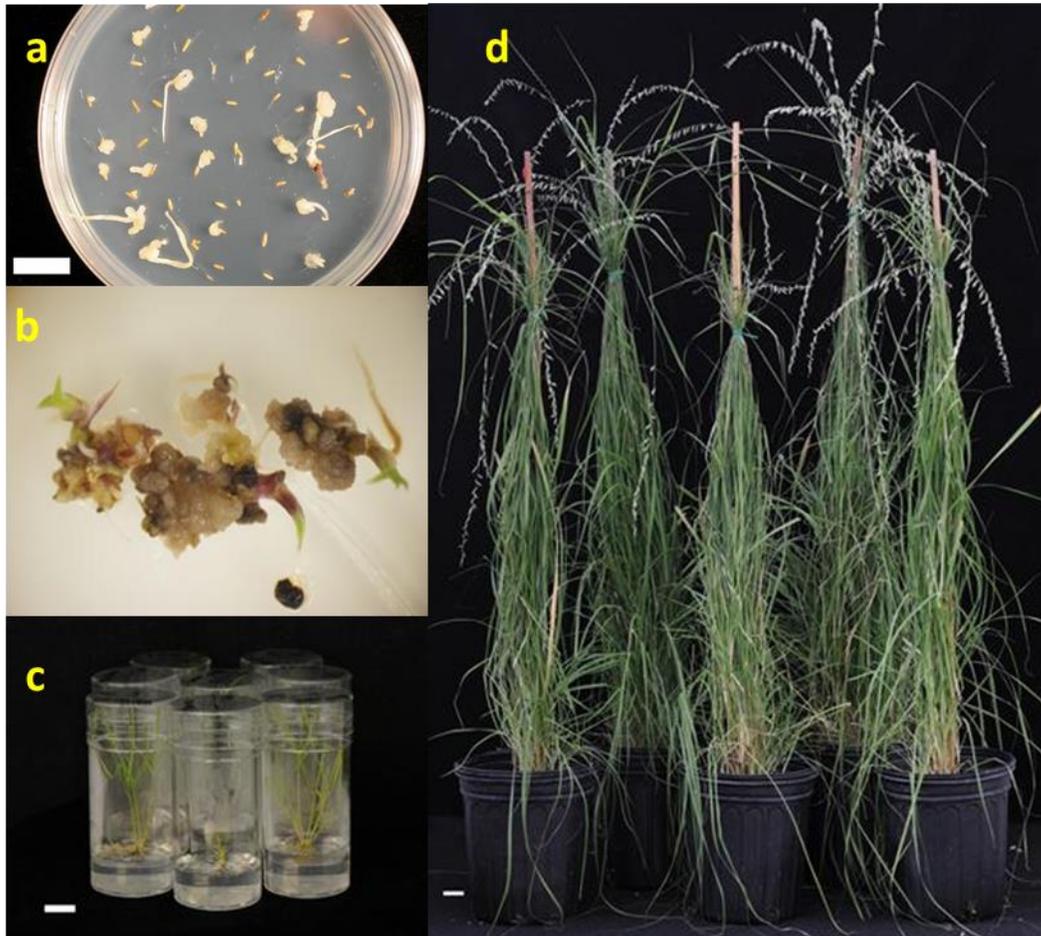
**Table 4** Seedling regeneration for callus pretreated using three cytokinins 2,4-D levels in Sideoats grama cv. El Reno.

Treatment	Cytokinins in pretreatments (mg L <sup>-1</sup> )			Regeneration medium	Total plantlets regenerated	Plantlets regenerated per 25 calli
	BAP	KIN	TDZ			
SM2+MSBK(control)				MSBK	0 ± 0.0	0.0
SM2+MSB+MSBK	3.0			MSBK	2 ± 0.4	0.1
SM2+MSBKT+MSBK	0.1	1.5	0.5	MSBK	4 ± 0.5	0.2
SM3+MSBK(control)				MSBK	0 ± 0.0	0.0
SM3+MSB+MSBK	3.0			MSBK	8 ± 0.5	0.3
SM3+MSBKT+MSBK	0.1	1.5	0.5	MSBK	2 ± 0.4	0.1
SM4+MSBK(control)				MSBK	0 ± 0.0	0.0
SM4+MSB+MSBK	3.0			MSBK	11 ± 0.7	0.4
SM4+MSBKT+MSBK	0.1	1.5	0.5	MSBK	3 ± 0.4	0.1

MSBK= Medium supplemented with BAP 2 mg L<sup>-1</sup> and kinetin 1 mg L<sup>-1</sup>. This medium was supplemented on MSbasal with sucrose 30 g L<sup>-1</sup>. Data shown are represents total regenerated plantlets per treatment±standard error.



**Fig 4** Sideoats grama cv El Reno, pretreatments calli using three different media. a) Calli placed on MSBK media (control), b) Calli pretreated on MSB media, c) Calli pretreated on media MSBKT. Bar 50 µm.



**Fig 5** Calli regeneration of Sideoats grama cv El Reno from mature caryopses. a) Mature caryopses on 2,4-D supplemented media, b) Regenerated plantlets c) Plants on maintenance media d) Plants transferred to pots (60 days old). Bar: 2 cm

#### 4.3. Other Sideoats Grama Cultivars

Commercial Sideoats grama cultivars Haskell and Vaughn showed good response for callus induction on media supplemented with 2,4-D and BAP (Table 5). Haskell showed higher callus induction for 3 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D supplemented media, but the induction rate was only 39.2%. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were found on media with 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D for Vaughn showing values of 61% for calli induction. Both cultivars showed no response to pretreatment and no chlorophyll pigment was detected on its surface as well as no plant regeneration was achieved, probably due to cytokinins addition

responsible for plant regeneration, genotype is the major source of variation during *in vitro* culture (Khatum et al. 2010)

**Table 5** Calli induction, pretreatment and plant regeneration in Haskell and Vaughn cultivars, supplemented with three levels of 2,4-D and BAP.

Cultivar	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Calli induction (%)	Pretreatment media	Regeneration media	Regenerated plants
Haskell	2	0.15	36.8 ± 2.9	MSB <sup>1</sup> , MSBKT <sup>2</sup>	MSBK <sup>3</sup>	0.0
	3	0.15	39.2 ± 3.1	MSB, MSBKT	MSBK	0.0
	4	0.15	35.0 ± 2.7	MSB, MSBKT	MSBK	0.0
Vaughn	2	0.15	22.6 ± 3.1	MSB, MSBKT	MSBK	0.0
	3	0.15	58.4 ± 0.7	MSB, MSBKT	MSBK	0.0
	4	0.15	61.2 ± 3.8	MSB, MSBKT	MSBK	0.0

<sup>1</sup>Medium supplemented with BAP 3 mg L<sup>-1</sup>. <sup>2</sup>Medium supplemented with BAP 0.1 mg L<sup>-1</sup>, TDZ 0.5 mg L<sup>-1</sup> and kinetin 1.5 mg L<sup>-1</sup>. <sup>3</sup>Medium supplemented with BAP 2 mg L<sup>-1</sup> and kinetin 1.0 mg L<sup>-1</sup>. All medium were supplemented on MS basal with sucrose 30 g L<sup>-1</sup>. Data shown are the mean of average ± standard error.

## 5. DISCUSSION

Tissue culture is a very important step for genetic transformation purposes for many forage species (Bai and Qu, 2001; Chen et al. 2002; Seo et al. 2008; Burriss et al. 2009; Lenis-Manzano et al. 2010) and the efficiency of plant regeneration protocols have marked the success for plant transformation (Rakshit et al. 2010). Apomictic forage species have had good responses in calli induction frequency (Seo et al. 2008) and regeneration protocols have been reported for other *Bouteloua* species (Aguado-Santacruz et al. 2001; Osuna and Barrow, 2004).

Organogenic callus were developed from mature Sideoats grama cv El Reno caryopses during the culture period. Friable callus type identified as embryogenic callus (Asano et

al. 1996) and friable callus combined with semicompact callus and compacts hard calli, were prevalent during the induction period. This type of callus also called type I callus, is typical to monocots species and characterized by compact shape, white-light yellow in color, and highly organized (Vasil and Vasil, 1986), and has been reported for Switch grass (Burris et al. 2009) and Pearl millet (Lambé et al. 1999). Other type calli reported here were soft, watery and dry, similar to those indicated by Wang et al. (2010) for zoysiagrass.

The addition of 2,4-D at  $2 \text{ mg L}^{-1}$  improved calli induction frequency and the highest was observed for this level. Low auxin levels combined with low cytokinins (BA) has been used with great success for monocots crops (Rakshit et al. 2010; Wang et al. 2010). Calli induction frequency for cv El Reno, decreased as the level of auxin increased to  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . Similarly, in maize, highest calli induction frequency was observed for MS medium supplemented with lower 2,4-D concentrations and the response was reduced as 2,4-D levels increased within the media (Rakshit et al. 2010). However, the induction process is not fully understood and has been controversial, due to the intervention of various factors such as: plant genotype, culture media, auxin type, and concentrations critical for calli induction (Kathum et al. 2010; Rakshit et al. 2010). Although genotype's capacity to promote optimal endogenous auxin and cytokinin conditions supporting induction and regeneration, could be attributed to the auxin type within the media (Visser et al. 1992), a significant role for calli induction has been attributed to the hormone type, but no interaction genotype-hormone has been reported (Rakshit et al. 2010). Moreover, phytohormones have been reported as promoters for all types of morphogenic and embryogenic calli induction phenomena in plants (Visser et al. 1992). In addition, calli induction has been a result of better interaction of factors involved in this process, for each specific genotype.

Organogenic calli on media supplemented using  $4 \text{ mg L}^{-1}$  of 2,4-D showed the highest growth rate, slower growth was observed during first 20 days at 3 and  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D levels, while faster growth phase was observed on media supplemented using  $2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D. A higher 2,4-D concentration stimulated actively calli growth. A similar effect was reported by Capelle et al. (1983), for others cytokinins for legumes, but a better

response was found using TDZ. Growth rates and calli characteristics differences *in vitro*, are strongly influenced by the type and amount of endogenous plant hormone and dependent on genotype (Aina et al. 2012).

Plant regeneration best responses were obtained applying higher 2,4-D levels, using BAP. This auxin type is related to growth-promoting and synthesis of both DNA and RNA (Mustafa and Khan, 2012) promoting changes in DNA methylation and leading to the reprogramming of differ-reinitiated cells (Chen et al. 2001). Pretreatment using MSBKT had higher efficiency at lower 2,4-D levels, while the MSB pretreatment was more efficient for plant regeneration at any 2,4-D levels. Highest plant regeneration responses were obtained using MSB pretreatment and regeneration efficiency was significant ( $P < 0.05$ ) using higher 2,4-D levels. Regeneration efficiency has been described as a quantitative trait which often varies among plant species (Aina et al. 2012), and affected for culture media type, cell density, plant growth regulators, conditioned media (Manninen, 1997), genotype, growth rate, embryogenic callus morphology (Bregitzer, 1992), and explant source and age (Aina et al. 2012). The 2,4-D effect in combination with cytokinins has been widely used successfully for Barley plant regeneration (Castillo et al. 1998), Blue grama (Aguado- Santacruz et al. 2001); however, a better plant regeneration response was obtained using Dicamba for Black grama (Osuna and Barrow, 2004), variations in the response was mainly attributed to plant genotype (Khatum, et al. 2010) and its interaction with media (Immonen and Anttila, 1999).

Calli directly placed on regeneration media (MSBK) without pretreatment, showed no plant regeneration. Pretreatments promoted plant regeneration for Sideoats grama cv El Reno, but response was variable among 2,4-D levels. In our research, MSB pretreatment effect showed higher regeneration, although results were not extraordinary. The combined use of TDZ, kinetin and BAP (pretreatment MSBKT) did not improve regeneration response, although chlorophyll pigment showed calli on the surface and its effect was similar to that for MSB pretreatment. The effect of TDZ, on embryogenic calli induction and plant regeneration have been successfully reported in dicots, but the answer may depend on the auxin and cytokinin type used (Visser et al.

1992). The use of TDZ has been reported to improve response for recalcitrant species (Murthy and Saxena, 1998) and has been used effectively in species in which purine-type cytokinins were ineffective (Lu, 1993). Calli placed on MSB pretreatment during 10 days, stimulated a better response for plant regeneration cultured on MSBK. Pretreatments based in BAP and the use cytokinins primarily KIN and BAP improved response on calli induction and plant regeneration for several plant species (Castillo et al. 1998; Mustafa and Khan 2012), and its effect has been related to nitrogen accumulation, decreased calcium levels, and Boron uptake stimuli (De Oliveira et al. 2010). This effect stimulated chlorophyll production in calli and was a feature observed for all 2,4-D levels tested. Pretreatments of auxins and cytokinins significantly increased plant regeneration from cotyledon explants in *Brassica rapa* (Burnett et al. 1994). Other pretreatments based on DL-alpha-difluoromethylarginine (DFMA) caused a rejuvenation on calli, which improved both morphogenic and regeneration response (Tiburcio et al. 1991). Pretreatment using BAP, KIN and casein hydrolyzate improved plant regeneration in Sugarcane (Mustafa and Khan, 2012). Currently, studies on hormonal balance of endogenous levels in calli, have been very important and linked to plant regeneration response (Huang et al. 2012).

## 6. CONCLUSIONS

The development of an *in vitro* culture system for Sideoats grama is an important step for molecular breeding within this specie. Best response on calli induction were obtained at lower 2,4-D concentrations, while better plant regeneration was obtained using BAP as pretreatment to higher 2,4-D levels; however, pretreatments using BAP, Kinetin and TDZ did not improve plant regeneration response. Our contribution is the first research of its kind developed to increase the efficiency of regeneration in organogenic calluses of Sideoats grama cv El Reno.

## 7. REFERENCES

- Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Olalde-Portugal V, Sánchez-González Ma R, Márquez-Guzmán J and Herrera-Estrella L (2001) Tissue Culture and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) LAG. EX STEUD. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 37:182-189.
- Aina O, Quesenberry K and Gallo M (2012) Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. Crop Sci. 52:1076-1083.
- Alderson J and Sharp WC (1995) Grass varieties in the United States. USDA. CRC. Lewis Publishers. Boca Ratón, FL. pp.21
- Asano Y, Katsumoto H, Inokuma C, Kaneko S, Ito Y and Fujie A (1996). Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and  $\alpha$ -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. J Plant Physiol 149:413-417.
- Bai Y and Qu R (2001) Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. Plant Breeding 120:239-242.
- Bregitzer P (1992) Plant regeneration and callus type in barley: effect of genotype and culture medium. Crop Sci 32:1108-1112.
- Burnett L, Arnoldo M, Yarrow S and Huang B (1994) Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica napus* ssp. oleifera through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. Plant Cell Tiss Org Cult 37:253-256.
- Burris JN, Mann DGJ, Joyce BL and Neal-Stewart Jr C (2009) An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Bioenerg. Res. 2:267-274.
- Capelle SC, Mok DWS, Kirchner SC and Mok MC (1983) Effects of thidiazuron on cytokine autonomy and the metabolism of (N<sup>6</sup>- $\Delta^2$ -Isopentenyl) (8-<sup>14</sup>C) Adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73:796-802.
- Castillo AM, Egaña B, Sanz JM and Cistué L (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Reports 17:902-906.
- Chai ML, Jia YF, Chen S, Gao ZS, Wang HF, Liu LL, Wang PJ and Hou HQ (2011) Callus induction, plant regeneration, and long-term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* (L) Merr. Plant Cell Tiss Organ Cult. 104:187-192.
- Chen JG, Shimomura S, Sitbon F, Sandberg G and Jones AM (2001) Role of auxin-binding protein 1 in leaf cell growth. Plant J. 28:607-617.

- Chen LZ, Okabe R, Guan LM and Adachi T (2002) A simple and efficient culture of leaflets for regeneration in guineagrass (*Panicum maximum*). Japan Plant Biotechnology. 19:63-68.
- Couillerot J-P, Windels D, Vazquez F, Michalski J-C, Hilbert J-L and Blervacq A-S (2012) Pretreatments, conditioned medium and co-culture increase the incidence of somatic embryogenesis of different *Cichorium* species. Plant Signaling & Behavior 7:1, 1-11.
- Craig D, Sedivec K, Tober D and Russell I (2001) Nutrient composition, productivity, and growth of selected warm-season grasses: Preliminary report.  
<http://www.ag.ndsu.edu/greenhouse/hettinger-rec/sheep/2001-and-past-sheep-day-articles/Warm-season%20Grasses%202001.pdf>
- De Oliveira LM, Paiva R, de Santana JRF, Pereira FD, Nogueira RC and Silva LC (2010) Effects of cytokinins on *in vitro* mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. Cienc. Agrotec., Lavras. 34(6):1439-1445.
- Franklin G, Arvinth S, Sheeba CJ, Kanchana M and Subramonian N (2006). Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segments explants. Plant Growth Regul. 50:111-119.
- González, R.S.L., Quero, C.A.R., Franco, M.O., Ramírez, A. C., Ortega, E.H.M. y Trejo, L. C. 2010. Efecto de la salinidad y la temperatura sobre el crecimiento del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.)). CIENCIA ergo sum. Vol. 18(1), marzo-junio. pp.59-69.
- Gould FW (1959) Notes on apomixis in sideoats gramma. Journal of Range Management. 12(1):25-28.
- Gould FW (1979) The genus *Bouteloua* (Poaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden. 66(3):348-416.
- Gould FW and Kapadia ZJ (1964) Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex. II. Taxonomy. Brittonia.16:182-207.
- Hosmer DW and Lemeshow S (2000) Applied logistic regression. Second edition. Willey, New York.
- Huang W-L, Lee Ch-H and Chen Y-R (2012) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. Plant Cell Tiss Organ Cult 108:257-263.
- Hunt R (1982) Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. London England. 248p.

- Immonen S, and Anttila H (1999) Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57:121-127.
- Khatum R, Islam SMSH, and Miah MAB (2010). Studies on plant regeneration efficiency through *in vitro* micropropagation and anther culture of twenty five rice cultivars in Bangladesh. *Journal of Applied Sciences Research* 6(11):1705-1711.
- Lambé P, Mutambel HSN, Deltour R, Dinant M (1999) Somatic embryogenesis in Pearl millet (*Pennisetum glaucum*): strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:23-29.
- Lenis-Manzano SJ, Guerra de AAC, Borges do VC, Santana E de F, Campos CVT (2010) Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45(5):435-441.
- Lu, CY (1993) The use of TDZ in tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol* 29:92-96.
- Manninen O (1997) Optimizing anther culture for barley breeding. *Agric Food Sci* 6:389-398.
- Morales NCR, Quero CAR and Avendaño ACH (2007). Caracterización de la diversidad nativa del zacate banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], mediante su nivel de ploidía. *Téc. Pec. en México*. 45 (3): 263- 278.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Murthy BNS and Saxena PK (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) *Plant Cell Rep.* 17:469-475
- Mustafa G. and Khan MS (2012) Reproducible *in vitro* regeneration system for purifying sugarcane clones. *African Journal of Biotechnology*. 11(42): 9961-9969.
- Osuna P and Barrow JR (2004) Regeneration of black grama (*Bouteloua eriopoda* Torr. Torr) plants via somatic embryogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 40:299-302.
- Pytman WD and Jaynes Ch C (1980) Strains of blue grama and sideoats grama evaluated for the Southern Great Plains. *Journal of Range Management*. 33(5):381-384.
- Rakshit S, Rashid Z, Sekhar JC, Fatma T and Dass S (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 100:31-37.
- SAS (2004) SAS/STAT® 9.1user's guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Seo M-S, Takahara M, Ebina M and Takamizo T (2008) Evaluation of tissue culture response from mature seeds of *Panicum* spp. Japanese Society of Grassland Science. 54:125-130.
- Smith SE, Haferkamp MR and Voigt PW (2004) Gramas. Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America. Madison, USA. pp.1-28.
- Tiburcio AF, Figueras X, Claparols I, Santos M and Torné JM (1991) Improved plant regeneration in maize callus cultures after pretreatment with DL-alpha-difluoromethylarginine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27:27-32.
- Vasil V and Vasil IK (1986) Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension culture of *Zea mays* L. J Plant Physiol 123:211-227.
- Visser Ch, Qureshi JA, Gill R and Saxena PK (1992) Communication. Morphoregulatory Role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. Plant Physiol 99:1704-1707.
- Wang X, Hoshino Y and Yamada T (2010) Rapid and efficient callus induction and plant regeneration from seeds of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). Grassland Science. 56:198-204.
- Wang Z-Y and Ge Y (2006) Invited Review: Recent advances in genetic transformation of forage and turf grasses. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 42:1-18.
- White LM (1986) Forage yield and quality of warm-and cool-season grasses. J. range Management. 39:264-268.
- Zhao W, Zheng S and Ling H-Q (2011) An efficient regeneration system and Agrobacterium-mediated transformation of Chinese upland rice cultivar Handao297. Plant Cell Tiss Organ Cult. 106:475-483.
- Ziauddin A, Simion E and Kasha KJ (1990) Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. igri. Plant Cell Reports 9:69-72.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Diferencias en las características anatómicas fueron observadas entre ecotipos de *B. curtispindula*, siendo los tejidos de mayor área los que mostraron alta variación y contribución a la explicación de la varianza.
- El ecotipo-16 fue el que presentó los mejores atributos forrajeros con base en su área total foliar y el que mostró los mayores porcentajes de tejido altamente digestible, situándolo como el más sobresaliente de los ecotipos evaluados.
- La deposición de lignina a diferente edad de rebrote en tejidos, mostró alta variación entre ecotipos, siendo la extensión de la vaina-lignificada la principal característica en genotipos con mayor lignificación.
- La mayor deposición de lignina fue registrada en ecotipos con menor área foliar, por lo que la lignificación celular es independiente del área en los tejidos. En general, se observó que los ecotipos más lignificados, mostraron una mayor cantidad de lignina a los 20 días y esa tendencia se mantuvo hasta los 65 días.
- El estrés osmótico ocasionado por el sorbitol en los medios de cultivo, estimuló la embriogénesis somática en *B. curtispindula*.
- Sólo los callos provenientes de un medio con 0.6 mM de sorbitol, 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP, formaron embriones somáticos.
- La mayor eficiencia de conversión fue obtenida en medios suplementados con KIN/ANA/AG<sub>3</sub>, la utilización de igual concentración de los reguladores ANA y AG<sub>3</sub> fue determinante en la regeneración de plantas.
- En esta investigación se estableció el primer protocolo de regeneración *in vitro* de *B. curtispindula*, sentando las bases para el mejoramiento de esta especie mediante herramientas biotecnológicas.