



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

BIOSÍNTESIS DE LIGNINA Y COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO EN TRES PASTOS DE CLIMA TEMPLADO

JUAN MANUEL VARGAS ROMERO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: **Biosíntesis de lignina y comportamiento productivo en tres pastos de clima templado**, realizada por el alumno **Juan Manuel Vargas Romero** 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



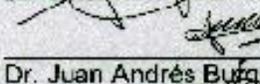
Dr. Sergio Segundo González Muñoz

ASESOR



Dr. Balamero Marcón Zúñiga

ASESOR



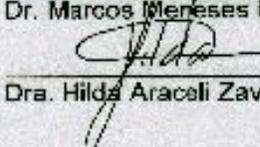
Dr. Juan Andrés Burgueño Ferreira

ASESOR



Dr. Marcos Meneses Mayo

ASESOR



Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2012

BIOSÍNTESIS DE LIGNINA Y COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO EN TRES PASTOS DE CLIMA TEMPLADO

Juan Manuel Vargas Romero, Dr.
Colegio de Posgraduados 2012

RESUMEN

Tres especies de gramíneas de clima templado, el híbrido *Festulolium* y sus progenitores *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne*, se evaluaron en invernadero para determinar el crecimiento, fracciones de la fibra y características anatómicas de cada especie. Además se extrajo el ADN de las tres gramíneas para realizar un análisis molecular y calcular correlaciones entre los marcadores y las variables analizadas. De acuerdo con los resultados, el *Festulolium* fue distinto a *F. arundinacea* y *L. perenne* en el número de láminas por tallo; respecto a la abundancia relativa de lignina, área de xilema y floema, el contenido fue similar entre *Festulolium* y *L. perenne*, mientras que los valores de densidad de tricomas en el haz fueron semejantes entre *Festulolium* y *F. arundinacea*. Se encontraron tres marcadores moleculares (LPSSR H01 A 10, NFAA 027 y NFAA 036) correlacionados significativamente con la abundancia relativa de lignina en las tres especies. El análisis de los resultados permite concluir que el *Festulolium* no segregó hacia *F. arundinacea* o *L. perenne* de manera determinante en patrón de crecimiento o características anatómicas.

Palabras clave. paredes celulares, FDN, FDA, estomas, tricomas, microscopía electrónica, *Festuca*, *Lolium*, *Festulolium*

LIGNIN BIOSYNTHESIS AND PERFORMANCE IN THREE TEMPERATE CLIMATE GRASSES

Juan Manuel Vargas Romero, Dr.
Colegio de Posgraduados 2012

ABSTRACT

Three species of temperate climate grasses, *Festulolium* hybrid and its parents *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*, were evaluated in a greenhouse to determine growth, fiber fractions and anatomical characteristics of each species. Besides, DNA was extracted from the three grasses to carry out molecular analysis and calculate correlations between the markers and the analyzed variables. According to the results, *Festulolium* was different to *F. arundinacea* and *L. perenne* in the number of blades per stem; regarding the relative abundance of lignin, xylem and phloem area, content was similar between *Festulolium* and *L. perenne*, whereas values of adaxial trichomes density were similar between *Festulolium* and *F. arundinacea*. We found three molecular markers (LPSSR H01 A 10, 027 and NFAA NFAA 036) significantly correlated with the relative abundance of lignin in the three species. The analysis of the results allows concluding that *Festulolium* did not segregate decisively towards *F. arundinacea* or *L. perenne* in growth pattern or anatomical features.

Key Words cell walls, NDF, FDN, trichomes, electron microscopy, *Festuca*, *Lolium*, *Festulolium*.

DEDICATORIA

A la gente que me quiere y quiero.

AGRADECIMIENTOS

Quiero patentar el reconocimiento a:

Comité Académico, por la ayuda brindada durante este trabajo de investigación.

CONACYT por el financiamiento recibido en el periodo.

Dr. González (asesor principal), que desde el primer día y hasta el último de este trabajo, tuvo la disposición y las palabras exactas para cada situación.

Dra. Zavaleta porque me compartió la emoción y gusto por el campo del conocimiento en donde ella trabaja.

Dr. Burgueño porque este trabajo no habría culminado de no contar con sus conocimientos y experiencia.

Dr. Alarcón, que brindó todas las facilidades para trabajar en las instalaciones pertinentes.

Dr. Meneses, que en muchas ocasiones tuvo el tino de mediar adecuadamente y contribuir como persona y profesional al trabajo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema.....	1
-------------------------------------	---

2. REVISIÓN DE LITERATURA..... 3

2.1 Evolución de los pastos y herbívoros.....	3
2.1.1 Evolución de los pastos.....	3
2.1.2 Evolución de los herbívoros.....	4
2.1.3 Convivencia planta-herbívoro.....	4
2.1.4 Las plantas y sus metabolitos secundarios.....	5
2.2 Biosíntesis de paredes celulares en plantas.....	6
2.2.1 Carbohidratos estructurales.....	7
2.2.1.1 Grupo péctico.....	8
2.2.1.2 Grupo hemiceluloso.....	8
2.2.1.3 Grupo celuloso.....	9
2.2.1.4 Grupo glicoprotéico.....	9
2.2.2 Variaciones de los polisacáridos en las plantas.....	10
2.3 Lignina.....	11
2.3.1 Biosíntesis y composición química.....	12
2.3.2 Uniones lignina-carbohidratos.....	16
2.3.3 La lignina en la digestibilidad de los forrajes.....	17
2.4. Fracciones de la fibra.....	18
2.4.1 Degradación ruminal de la fibra.....	18
2.4.2 Implicaciones de las fracciones de la fibra.....	20
2.5 Anatomía foliar de gramíneas.....	21
2.5.1 Xilema y floema.....	21
2.5.2 Anatomía de plantas C3 y C4.....	23
2.6 Selección genética de los forrajes.....	25
2.6.1 Marcadores genéticos.....	26
2.6.2 Polimorfismo genético.....	29
2.7 Gramíneas <i>Festuca</i> , <i>Lolium</i> y <i>Festulolium</i>	31
2.7.1 <i>Festuca</i>	31

2.7.2 <i>Lolium</i>	32
2.7.3 <i>Festulolium</i>	33
3.- OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo General.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4.-JUSTIFICACIÓN	36
5.-HIPOTESIS	37
6.-MATERIAL Y MÉTODOS	37
6.1 Invernadero.....	37
6.2 Anatomía vegetal.....	39
6.2.1 Microscopía óptica.....	39
6.2.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	40
6.3 Análisis molecular.....	40
6.4 Análisis de resultados.....	45
7.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1 Análisis de valores observados y residuales.....	46
7.2 Anatomía foliar.....	48
7.2.1 Microestructura de la epidermis.....	51
7.3 Análisis molecular.....	52
8.-CONCLUSIONES	58
9.-REFERENCIAS	58
ANEXO	69

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro 1. Propiedades de los grupos de polisacáridos en plantas.....	9
Cuadro 2. Procesos derivados de la oxidación fenólica en la biosíntesis de lignina...	14
Cuadro 3. Niveles recomendados de fibra neutro detergente (FDN), en la dieta de rumiantes, en función del peso vivo (PV) según el NRC, 2000.....	20
Cuadro 4. Especies, ploidías, fenotipo y usos del <i>Festulolium</i>	35
Cuadro 5. Iniciadores SSR con denominación NFFa (Noble Foundation <i>Festuca arundinacea</i>).....	41
Cuadro 6. Iniciadores SSR con denominación NFFa (Noble Foundation <i>Festuca arundinacea</i>).....	42
Cuadro 7. Iniciadores SSR con denominación LPSSR (<i>Lolium perenne</i> , University of Victoria, Australia).....	44
Cuadro 8. Medias y desviaciones estándar de las diferentes variables analizadas...	47
Cuadro 9. Variables que presentaron correlación entre los datos observados y los residuales.....	56
Cuadro 10. Media de las diferentes variables que mostraron correlación significativa con los diferentes iniciadores polimórficos.....	57

FIGURAS

Figura 1. Enlace glucosídico en los polisacáridos.....	7
Figura 2. Biosíntesis de lignina.....	15
Figura 3. Principales estructuras en una lámina de planta C4.....	24
Figura 4. Principales estructuras en una lámina de planta C3.....	24
Figura 5. Corte transversal de la lámina. Lignina teñida con Safranina O y Verde fijo en las tres gramíneas evaluadas.....	50
Figura 6. Micrografías Electrónicas de Barrido de la epidermis de <i>Festuca arundinacea</i>	53
Figura 7. Micrografías Electrónicas de Barrido de la epidermis de <i>Lolium perenne</i> ..	54
Figura 8. Micrografías Electrónicas de Barrido de la epidermis de <i>Festulolium</i>	55

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Las fracciones de la fibra (celulosa, hemicelulosa y lignina) determinan la digestibilidad de un forraje, la cual disminuye al aumentar la edad de la planta (Jung *et al.*, 1997). Esta reducción se atribuye parcialmente a la lignina, y específicamente a las variaciones en su estructura tridimensional, características hidrofóbicas, incrustación y enlaces con otros componentes matriciales (Chesson, 1986). La lignina es importante en el crecimiento y desarrollo de los forrajes por ser un componente determinante de la rigidez en las células de soporte (esclerenquima) y de transporte (xilema), contribuyendo también a prevenir la entrada de algunos patógenos a la planta. Hay varios estudios e investigaciones acerca de su biosíntesis y modelos de pared celular (Önerud *et al.*, 2002).

La variación genética constituye la base de la evolución la cual depende de la información genética disponible y está en función de los tipos de alelos en los *loci*, sus frecuencias entre los individuos y sus combinaciones particulares como genotipos; además, el grado y clase de variación son afectados por la mutación, flujo genético, recombinación, deriva genética y selección natural (Marzorcca, 1985). Esta variabilidad molecular (genética) sucede en las proteínas y ácidos nucleicos; puede evaluarse mediante la comparación de las características morfológicas o con marcadores moleculares usados en los estudios taxonómicos porque no son influenciados por el ambiente y proporcionan numerosos caracteres que se pueden comparar y analizar para el establecimiento de relaciones filogenéticas (Moody, 2001). Las poblaciones que

presentan variaciones genéticas serán diferentes en sus procesos biosintéticos y tendrán diferente comportamiento productivo; por ello se requieren estudios genéticos para analizar esta variación y posibles diferencias productivas entre especies forrajeras (Barriere *et al.*, 2004; Raes *et al.*, 2003).

En clima templado hay especies que tienen un valor nutricional sobresaliente y otras poseen características de resistencia a condiciones agroclimáticas adversas en sacrificio del valor nutricional. Con el cruzamiento entre especies se puede recombinar la información genética para presentar un valor nutricional mayor a la media sin decremento de la rusticidad. Una crusa estudiada es la que utiliza la *Festuca* spp. y *Lolium* spp. como progenitores, con la cual se obtiene un buen valor nutricional y rusticidad en una sola planta (Casler *et al.*, 2002).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la segregación genética mediante la caracterización de variables de rendimiento, fracciones de la fibra, anatomía foliar y abundancia relativa de lignina en un híbrido interespecífico segregante (*Festulolium*) así como de sus progenitores *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne* en condiciones de invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Evolución de los pastos y herbívoros

Los sistemas de pastoreo son la base de la producción de los rumiantes y comenzaron con la domesticación de los bovinos hasta llegar a los sistemas de pastoreo intensivo actuales en casi todo el mundo. Esta evolución se relaciona con los procesos para satisfacer las necesidades de la alimentación del ser humano, en lo cual los bovinos tienen una participación importante.

2.1.1 Evolución de los pastos

Actualmente se conocen cerca de 600 géneros y 6,000 especies de angiospermas, que pueden o no ser pastos, los cuales utilizan la energía del sol para convertir el bióxido de carbono y agua en moléculas orgánicas consumidas por los herbívoros. Las plantas en convivencia con los herbívoros han desarrollado diversos tipos de protección y sobrevivencia. La protección de tipo mecánico presenta estructuras externas en tallos, hojas, frutos, flores, con diferentes tamaños, como los cactus cuyas hojas tienen forma de espinas y repelen a los grandes mamíferos; esta protección mecánica contra pequeños insectos o ácaros es importante en plantas cultivadas (Chapman, 1992). También hay defensas de tipo químico, básicamente polímeros o cristales inorgánicos, convirtiendo a las paredes celulares en elementos indigeribles por los animales debido a la naturaleza de las paredes celulares cuya digestión será lenta y los herbívoros debieron desarrollar diferentes compartimentos con microorganismos simbióticos para estas funciones. Además, algunos metabolitos secundarios de las plantas pueden ser tóxicos y son almacenados en la pared celular de tejidos que aún no tienen la rigidez

proporcionada por la lignina o los silicatos, como en los rebrotes, hojas jóvenes, y frutos inmaduros.

Las plantas pueden compensar la pérdida de hojas incrementando la tasa fotosintética de las hojas remanentes, pero pueden sufrir efectos negativos por la pérdida de nutrientes, según la edad y los tejidos extraídos (Könner, 1991). Al ir madurando, las hojas se convierten en un exportador neto de nutrientes, alcanzando un máximo de producción justo antes de la senescencia (Shoohoven *et al.*, 2005).

2.1.2 Evolución de los herbívoros

Los rumiantes, en especial bovinos, caprinos y ovinos, evolucionaron, adquirieron la capacidad de fermentar el alimento en el rumen y tienen enzimas que hidrolizan la configuración beta de los enlaces glucosídicos 1-4 de la celulosa. La morfología y fisiología de los rumiantes están adaptados para albergar simbiontes microbianos que ayudan a la degradación de los polímeros de la pared celular, permitiendo la digestión de fibras vegetales. Algunos materiales vegetales se digieren poco debido a la alta proporción de fibra lignificada (Nielsen, 1995).

2.1.3 Convivencia planta-herbívoro

No todos los vegetales se consumen porque pueden tener muy pocas proteínas o sustancias químicas tóxicas que dificultan y dañan a los animales. Los ciclos de vida de ciertos mamíferos folívoros (que se alimentan de hojas) surgieron bajo la presión selectiva de las sustancias químicas que disminuyen la digestibilidad y las plantas de escaso contenido energético (Nielsen, 1995). Los herbívoros ramoneadores se alimentan principalmente de las hojas más gustosas y nutritivas (jóvenes) y evitan las hojas más viejas que contienen compuestos secundarios, como los taninos. El pastoreo

moderado puede ser un efecto estimulante y aumenta la producción de biomasa, pero en detrimento del vigor y de nutrientes almacenados en las raíces, por lo cual el pastoreo de partes jóvenes debe regularse (Hodgson, 1990).

Los primordios de nuevas hojas y tallos (meristemas) en los pastos se sitúan cerca del suelo, y los ramoneadores comen primero las partes viejas y después los tejidos jóvenes. El ramoneo moderado estimula la producción de tejidos nuevos al eliminar los tejidos viejos con tasas fotosintéticas bajas; además, las hojas inferiores jóvenes reciben más luz y crecen más rápido. Cuando la planta es sometida a una excesiva presión de pastoreo y su persistencia es amenazada, sintetizará defensas químicas que repelen su consumo (Heitschmidt *et al.*, 1991).

2.1.4 Las plantas y sus metabolitos secundarios

Hay poco más de 10,000 metabolitos secundarios en las plantas y las tres principales categorías de metabolitos secundarios de defensa son los fenólicos, los alcaloides, y los terpenos. Los compuestos de defensa adicional incluyen productos primarios como proteínas y aminoácidos tóxicos, inhibidores de proteasas, y compuestos cianogénicos. Los metabolitos secundarios actúan sobre el sistema nervioso de los insectos herbívoros, imitan las hormonas naturales de los insectos, dañan el sistema digestivo de los herbívoros, etc. Además, los taninos desnaturalizan algunas enzimas digestivas y los terpenoides ejercen un efecto antimicrobiano en el rumen, lo cual altera considerablemente el valor nutricional de los pastos (May *et al.*, 1996). Los compuestos fenólicos, como los taninos, consisten químicamente de un anillo aromático con un grupo hidroxilo unido, -OHL, están en altas concentraciones en las vacuolas celulares de *Fabaceae*, *Fagaceae*, *Mirtaceae*, y *Poligonaceae*. Otro grupo fenólico está

conformado por ligninas que se encuentran en las paredes celulares, dando fuerza estructural a la planta y proporcionan una barrera contra el ataque de herbívoros y patógenos (Baldwin, 1983).

Los alcaloides son moléculas relativamente pequeñas, en su mayoría son tóxicos para los herbívoros y altamente específicos para las especies de plantas o grupo de especies en las que se encuentran. Son efectivos en cantidades pequeñas aunque en algunos casos particulares las plantas o partes de ellas producen altas concentraciones de alcaloides.

Los terpenos están presentes en todas las plantas, tienen diferentes funciones en los vegetales, se componen de múltiples unidades isopreno y pueden ser moléculas grandes o pequeñas. El isopreno está en las hojas de algunas especies de plantas (como el género *Eucalyptus*), en grandes cantidades y puede servir para protegerlos del daño por calor; los aceites son los responsables de las características de sabor y aroma de las mentas (Lamiaceae) y son terpenos (Alonso, 1988).

2.2 Biosíntesis de paredes celulares en plantas

Las paredes celulares de las plantas están compuestas por carbohidratos estructurales que son cadenas de polisacáridos con pequeñas cantidades de lignina y proteínas, y no son utilizados en el metabolismo de la planta. Para el valor nutricional de los forrajes es un factor negativo, pero en las plantas tiene funciones esenciales y la biosíntesis de estos polisacáridos es determinada por factores genéticos, climáticos, nutricionales y el sistema de pastoreo (Birchman *et al.*, 1983; Goujon *et al.*, 2003).

La fibra vegetal se forma de un entramado tridimensional de celulosa, hemicelulosa y lignina, y frecuentemente se asocian minerales y otros componentes. La celulosa es una estructura compuesta por unidades de glucosa que posee enlaces β 1-4 de glucopiranososa; la hemicelulosa se deriva de las cadenas de pentosas y actúa como cemento junto con la celulosa (Van Soest, 1982).

2.2.1 Carbohidratos estructurales

Los polisacáridos son polímeros de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos (Figura 1) y cada una de esas uniones involucra una condensación con la eliminación de una molécula de agua. Los monosacáridos pueden ser unidos en cadenas lineares con un enlace glucosídico en diferentes átomos de carbono, y los hidroxilos C-1 pueden ser de alguna configuración espacial (alfa o beta), y hay dos tipos de isómeros para cada enlace posicional. Los monosacáridos con anillo de piranososa pueden ser alfa o beta y tener enlaces de tipo 1-2, 1-3, 1-4 y 1-6.

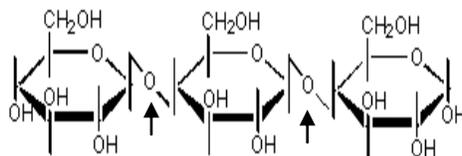


Figura 1. Enlace glucosídico en los polisacáridos

Otras propiedades generales de los polisacáridos son el tamaño de la molécula, forma, cristalinización, solubilidad en algunos solventes y resistencia a diferentes ácidos; sus propiedades pueden ser amplias y diversas de acuerdo con el número de monómeros distintos. En su estructura hay aldohexosas (D-glucosa, D-galactosa y D-manosa), aldopentosas (L-arabinosa y D-xilosa) y ácidos urónicos (ácido D-galacturónico, ácido

D-glucurónico y éter 4-O metílico), y además pequeñas cantidades de monosacáridos como L-rhamnosa y L-fucosa, en los anillos de piranosa. El enlace más común es el tipo beta-glucosídico dominado por beta 1-4 (Mc Murry, 2008).

Los polisacáridos estructurales están principalmente en la fibra de polisacáridos y en la matriz de las paredes celulares. Las fibras son compuestos cristalinos presentes como microfibras unidos por varios puntos de cemento amorfo de monosacáridos, lignina y proteínas insolubles que conforman la pared celular. La matriz de polisacáridos se divide en cuatro grupos: los compuestos pécticos, hemicelulósicos, celulósicos (los más comunes) y glicoproteicos, tienen composición química y funciones muy distintas, como se muestra en el Cuadro 1 (Butler y Bailey, 1973).

2.2.1.1 Grupo péctico

Es un grupo de polisacáridos amorfos que funcionan como cemento inter celular y está conformado por la pectina, galactano, arabano y un galacto arabano neutro. Las pectinas en los pastos no son tan importantes como en frutas, pero se encuentran en algunas leguminosas.

2.2.1.2 Grupo hemiceluloso

El nombre hemicelulosas se debe a su estrecha relación con la celulosa y por ser precursores de ella, las pentosanas en particular. Este término es incorrecto, pero se utiliza para los compuestos polisacáridos no celulósicos en la matriz diferentes a la pectina. El grupo hemiceluloso se divide en pentosanas (basadas en las pentosas) y las hexosanas no celulosas que están libres de pentosas.

2.2.1.3 Grupo celuloso

Son moléculas altamente polimerizadas linealmente (hasta 10,000 unidades). La celulosa está presente en todos los tejidos vegetales como fibras compuestas de microfibrillas, su función principal es proveer rigidez a las especies vegetales, y se observan cristalizadas a lo largo de las fibras; El término alfa-celulosa se aplica a la celulosa pura aislada de celulosa nativa.

Cuadro 1. Propiedades de los grupos de polisacáridos en plantas

	Forma física	Función en la planta	Soluble en
Sustancias pécticas	Amorfa	Cemento intracelular	Agua caliente, oxalato de amonio caliente o EDTA
No celulósicos (hemicelulosa)	Diversa	Paredes celulares o matriz	Agua, álcali débil o fuerte
Celulósicos	Cristalina	Micro fibrillas	Insoluble

Modificado de Hoffman, 2004.

2.2.1.4 Grupo glicoprotéico

Pequeñas cantidades de proteína son constituyentes normales de la pared primaria celular y esta proteína, llamada extensina, difiere de las proteínas citoplasmáticas por su alto contenido de hidroxiprolina, arabinosa y galactosa. La extensina es muy importante en el control del desarrollo celular y transporte pasivo de metabolitos intercelulares.

2.2.2 Variaciones de los polisacáridos en las plantas

Al crecer las células son rodeadas por una delgada pared celular primaria y los espacios son ocupados por una lámina media. Al detener las células su crecimiento aparece una lámina secundaria y entonces se distinguen tres capas de láminas dentro de la pared primaria: S1- lámina externa a la pared primaria, S2- en medio y S3- dentro de la pared primaria. En este entramado hay una cadena de fibras compuestas por micro fibras de celulosa medianamente orientadas dentro de la matriz de hemicelulosa y sustancias pécticas. Estas variaciones son las responsables de la alta variación de los niveles de celulosa entre especies vegetales y dentro de ellas.

Los niveles de polisacáridos estructurales en la planta son muy diferentes entre las hojas, tallo e inflorescencia; por lo cual el valor nutricional del forraje consumido por los rumiantes dependerá directamente de la proporción de estas secciones (Casler, 2000). El tallo es generalmente más alto en celulosa y hemicelulosa respecto a las hojas (láminas), porque en el tallo se requiere mayor rigidez celular para soportar el peso de la planta; también es notable la mayor proporción de xilosa:arabinosa. Esta diferencia es más contrastante en los forrajes tropicales donde la diferencia nutricional entre hojas y tallos ha derivado en la selección de especies forrajeras con una proporción de hojas mayor a la del tallo. También existe diferencia en el contenido de carbohidratos estructurales entre las especies forrajeras, por ejemplo, el contenido de celulosa en el género *Lolium* spp. es menor respecto al género *Festuca* spp., aun cuando son dos pastos de clima templado. Por lo tanto, la investigación sobre la composición de sustancias de la pared celular debe ser en pastos relacionados estrechamente y en condiciones de crecimiento iguales (Grabber *et al.*, 2004).

El clima donde se desarrollan las especies forrajeras es determinante en la biosíntesis de la pared celular y los pastos tropicales tienen mayor contenido de celulosa en las hojas comparado con las especies en clima templado. Los pastos en general pueden entrar en un estado de latencia de acuerdo con la estación o adelantar la producción de inflorescencia y semillas según las condiciones agroclimatológicas, lo cual significa una predominancia de tallos sobre las hojas. Las cantidades de celulosa serán mayores en los tallos durante las épocas de temperaturas extremas, sequía o en suelos de fertilidad pobre (Ilayama *et al.*, 1994). Entonces es necesario conocer para cada especie forrajera sus condiciones óptimas de crecimiento y las condiciones adversas y después analizar la composición de cada tejido (hoja, tallo e inflorescencias) respecto al contenido de polisacáridos estructurales, para así entender mejor el desarrollo de ese forraje (Chaves *et al.*, 2006).

2.3 Lignina

La lignina limita la digestibilidad de los forrajes pero cumple funciones específicas dentro de los forrajes y la mayoría de los estudios se han desarrollado en árboles debido a la importancia económica en la producción de pulpa para papel. La información de estos estudios se puede aplicar al conocimiento de los forrajes, porque la mayoría de las características de las ligninas son comunes entre las especies maderables y forrajeras (Hatfield y Fukushima, 2005). Así, Boudet (2000) sugiere usar y adecuar la información de numerosas investigaciones realizadas en bambú para especies forrajeras importantes.

Las plantas forrajeras al alcanzar la madurez presentan contenidos de lignina mayores principalmente en tallo, porque provee estabilidad y soporte para realizar la actividad fotosintética en las hojas. La lignina se estudia en rumiantes porque limita la digestibilidad del forraje, la disponibilidad de proteínas y carbohidratos solubles, y reduce el consumo voluntario (Ortega, 1987).

2.3.1 Biosíntesis y composición química

La lignina es un polímero que se origina de tres monómeros de fenilpropanoide, p-cumarico, coniferil y alcohol sinapil, que están estrechamente relacionados entre sí y poseen cero, uno y dos grupos metoxilos (Boerjan *et al.*, 2003). La proporción de cada uno de los residuos en la lignina determina su grado de condensación y al aumentar los residuos metoxilados la lignina será menos compacta y fácil de remover por los microorganismos ruminales (Boudet, 2000).

La conversión de p-cumárico, coniferílico y alcohol sinapílico en material polimerizado es compleja y no es simplemente una reacción en cadena, sino que involucra la condensación de un doble enlace alifático de manera aleatoria de pequeñas unidades en varios puntos de la molécula a través de procesos iniciados por la oxidación de los fenoles. El proceso inicia con la fenol oxidasa que cataliza la reacción y el alcohol coniferílico como donador para generar la forma activa de esta enzima que removerá un electrón del ion fenóxido y creará un radical libre que es altamente conjugable con la estructura de los alcoholes; este radical libre estará estabilizado pero aún no iniciará el proceso de polimerización (Grabber *et al.*, 2010). Estos radicales son especies químicas altamente reactivas y se estabilizan combinándose con otros radicales o intercambiando radicales libres con otras moléculas, por esta razón el proceso

producirá compuestos intermediarios inestables. Entonces, una oxidación fenólica da origen a diversas reacciones que no están bajo control enzimático y suceden simultáneamente, lo cual resulta en la formación de compuestos producidos aleatoriamente (Amthor, 2003). Algunos de estos procesos se muestran en el Cuadro 2.

Los compuestos intermedios de bajo peso molecular formados por estos procesos se denominan lignoles, pudiendo ser mono, di, tri, tetra...n, o bien pueden ser llamados oligolignoles si contienen 2,3,4...n – fenilpropanoides. Estos compuestos se han aislado de simulaciones de lignificación en laboratorio por la deshidrogenación del alcohol coniferílico simple con fenol-oxidasas. Este modelo es aceptado para la lignificación en árboles, pero en plantas forrajeras se supone un proceso ligeramente distinto (Chen *et al.*, 2001).

Todos los procesos metabólicos están relacionados entre sí, en especial de las rutas metabólicas de las plantas destinadas a la formación de carbohidratos proteínas y lignina, aun y cuando los productos resultantes tengan funciones diametralmente distintas (Butler y Bailey, 1973). En general los biopolímeros contienen uniones recurrentes dentro de sus moléculas y pueden ser aislados por hidrólisis con agentes químicos o enzimáticos para revertir el polímero por completo y separarlo en sus monómeros constituyentes, como celulosa, hemicelulosa, almidón, etc., y poder dilucidar su secuencia, unidades y enlaces. Pero no en la lignina porque no se puede revertir su polimerización por enzimas o compuestos químicos, lo cual se debe a que los constituyentes de la lignina tienen fuertes uniones carbono-carbono no hidrolizables mediante reacciones hidrolíticas típicas (Donaldson, 2001).

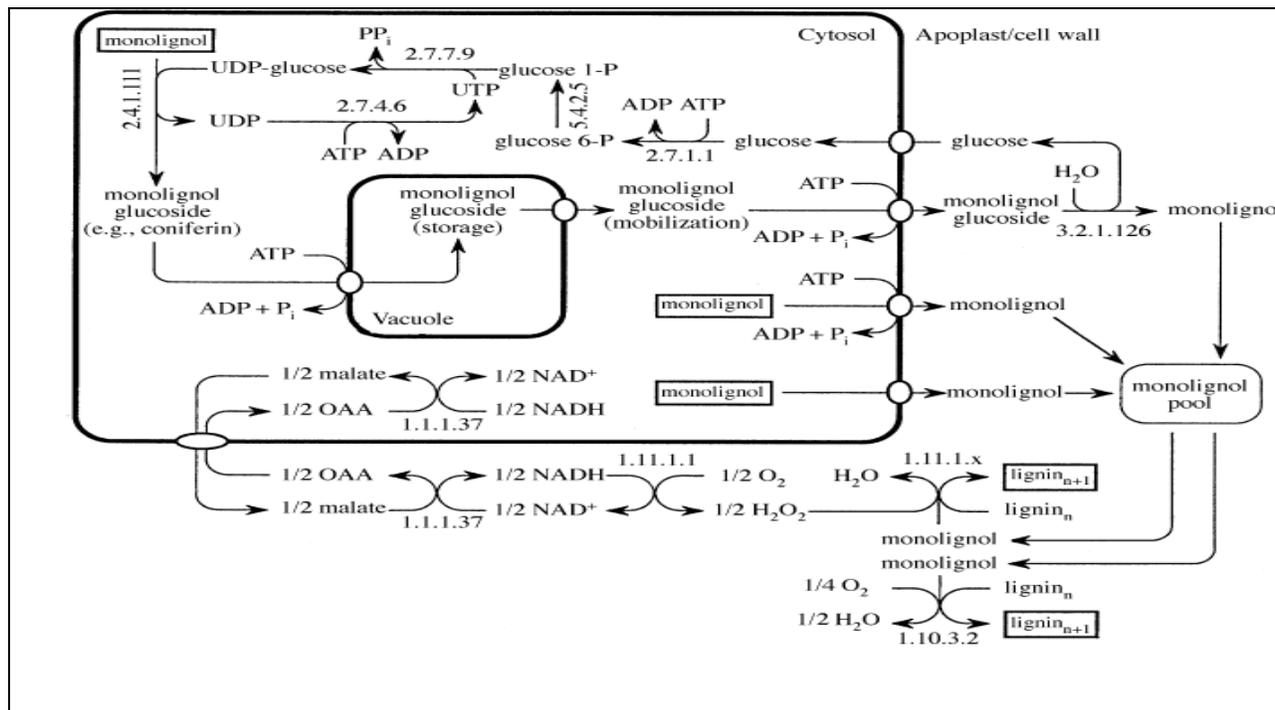
Cuadro 2. Procesos derivados de la oxidación fenólica en la biosíntesis de lignina

Proceso	Actividades
1	Crecimiento molecular con la formación de radicales libres para formar enlaces C-C y C-O formando productos quinales intermedios (quinol éter y metiluro de quinona)
2	Arreglos intramoleculares prototrópicos de algunos metiluros de quinona para reformar fenoles que pueden generar nuevos radicales libres.
3	Estabilización de algunos metiluros de quinona por adición de algunos nucleófilos más protones de agua, otros fenoles ácidos o carbohidratos aniónicos para reformar fenoles capaces de ocasionar oxidaciones adicionales.
4	Oxidaciones incidentales de la cadena lateral debido a la transferencia de radicales libres y la subsecuente desproporcionalidad de los compuestos.
5	Estabilización de algunos éter quinoles por la completa eliminación de la cadena lateral (otro tipo de desproporcionalidad)
6	Estabilización de algunos quinoles por la eliminación del fenol o metanol para resultar en O- o P- quinona.

Adaptado de Boerjan *et al.*, 2003

La enzima ferulato-5-hidroquilasa puede hidroxilar el ferulato a 5-hidroxi ferulato, originando un sustrato en la planta susceptible de generar alcohol sinapílico el cual puede formar en la lignina residuos con dos grupos metilo, confiriéndole mayor densidad y menor facilidad para su remoción (Fahmi *et al.*, 2008). La polimerización de los monómeros de lignina tiene como sustrato la sucrosa que originará prefenato que a su vez será precursor de monolignoles, de los cuales se derivarán los monómeros de lignina, como se muestra en la Figura 2 (Amthor, 2003).

Figura 2. Biosíntesis de lignina



Fuente: Amthor *et al.*, 2003

La lignificación ocurre durante las fases finales del crecimiento de la pared celular y el proceso comienza durante la diferenciación del xilema. La lignina es depositada dentro de la matriz de los carbohidratos interlaminares y forma uniones fuertes con las

sustancias no celulolíticas. El forraje al envejecer aumenta la lignificación de sus componentes celulares (Hatfield *et al.*, 2005).

2.3.2 Uniones lignina-carbohidratos

El éter bencil-azúcar o enlaces éster no son los únicos enlaces posibles entre la lignina y los carbohidratos contenidos en la pared celular. Se ha observado un enlace a nivel C-alfa cuya formación sólo puede ser mostrada con las teorías de la oxidación fenólica de la formación de lignina, considerando que un radical libre ha sido formado en el extremo C-alfa, y este radical puede combinarse con radicales simples formados por la oxidación fenólica. Este cambio también puede suceder con proteínas o carbohidratos en general de la pared celular cuyos enlaces pueden hacerse muy estables y de muy baja solubilidad (C-C o C-O) a través de un emparejamiento con los radicales lignol libres.

En la mayoría de los estudios se ha mostrado que la lignina se une preferentemente a la hemicelulosa (Boudet, 2000). Otro enlace que puede encontrarse entre estos compuestos es el tipo glicosídico producido por la glicosidación de un grupo fenol o alcohol en la lignina con la previa transformación de un UDP en ADP-activado. También hay enlaces que se forman entre aldehídos y grupos de cetonas de la lignina con grupos hidroxilos de los carbohidratos, todo lo cual significa una alta estabilidad y dificulta la acción enzimática de las bacterias ruminales. En varios estudios se ha observado que solamente procedimientos de laboratorio o técnicas industriales y un pH cercano a 4 pueden deshacer las uniones entre la lignina y los carbohidratos (Morrison, 1973; Morrison, 1974).

2.3.3 La lignina en la digestibilidad de los forrajes

Los enlaces covalentes entre la lignina y los carbohidratos son el factor limitante en la calidad nutricional de los forrajes debido a que la lignina posee una naturaleza aleatoria de la policondensación entre las uniones estrechas a los polisacáridos estructurales. Esto representa una barrera física para que las bacterias ruminales penetren en la célula vegetal y utilicen los contenidos intracelulares solubles; además, los enlaces no glucosídicos inhiben el proceso de digestión de los derivados de la celulosa, porque la celulosa no puede aproximarse a más de 2 o 3 azúcares del enlace, lo cual también se presenta en la xilanas (Salmén, 2004). Esto explica por qué en los residuos de las digestibilidades *in vitro* se encuentran restos de hemicelulosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa y galactosa que se digieren en estas condiciones de ensayos enzimáticos. En conclusión, los enlaces de lignina no son exclusivos para la hemicelulosa aunque sí son predominantes (Anterola *et al.*, 2002).

Generalmente los pastos de clima templado tienen un crecimiento acelerado de hojas desde la primavera hasta la etapa de inflorescencia en verano, lo cual es un cambio radical en la proporción de tejidos (hoja-tallo) y en el aumento gradual del contenido de lignina en toda la planta. En pastoreo las plantas son cosechadas sistemáticamente, la inflorescencia no se presenta y los niveles de lignina se mantienen relativamente estables y bajos (Muslera y Ratera, 1991). Una fertilización alta en nitrógeno aumenta el contenido de lignina en los forrajes, porque promueve el crecimiento acelerado de tejidos de soporte como el tallo. Pero temperaturas bajas o pocas horas luz resultan en niveles relativamente bajos de lignina, pero el efecto de estos factores ambientales es

indirecto al favorecer o reprimir el crecimiento de los diferentes componentes botánicos (hoja, tallo, raíz o inflorescencias) (Boudet, 2000).

2.4. Fracciones de la fibra

La fibra detergente neutro (FDN) es el material insoluble en una solución detergente neutra, y se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina (pared celular); además, hay componentes minoritarios como residuos de almidón, cenizas y nitrógeno. Para determinar FDN Van Soest *et al.* (1991) recomiendan usar amilasas termoestables específicas (libres de actividad hemicelulasa, proteasa o glucanasa), especialmente en concentrados o ensilados de maíz, y una corrección por el contenido en cenizas, por lo cual es el método más apropiado para determinar paredes celulares.

La fibra detergente ácido (FDA) es el material insoluble en una solución detergente ácida y está constituido por celulosa y lignina, aunque hay componentes minoritarios como nitrógeno (ligado a FDA) o minerales. La diferencia entre FDN y FAD consiste en el contenido de hemicelulosa, el cual se calcula como la diferencia entre estas dos fracciones.

2.4.1 Degradación ruminal de la fibra

Los forrajes presentan valores altos de carbohidratos fibrosos (estructurales) y contienen además nutrientes nitrogenados proteínicos y no proteínicos, en cambio los granos poseen valores elevados de carbohidratos solubles o no estructurales, como el almidón. Hay cuatro factores principales que regulan la degradación de las paredes celulares en las plantas (Ortega, 1987):

- Estructura y composición de las plantas que regulan el acceso microbiano a los nutrientes.
- La naturaleza de las poblaciones microbianas predominantemente fibrolíticas.
- Factores microbianos que controlan la adhesión y la hidrólisis por complejos de las enzimas hidrolíticas de las poblaciones microbianas adherentes.
- Factores del animal que incrementan la disponibilidad de los nutrientes a través de la masticación, salivación y cinética del quimo.

La digestión de las fracciones de la fibra se realiza mediante una fermentación ruminal, ocasionada por las bacterias fibrolíticas (Russell y Wilson, 1996). Primero debe existir una adhesión de las bacterias a la pared vegetal la cual se realiza a una velocidad inversamente proporcional al grado de lignificación de dicha pared. Luego comienza la degradación de los componentes de la pared celular debido a la acción de las celulasas y hemicelulasas, lo cual varía en función de la composición, el entramado tridimensional de los componentes y el grado de lignificación de las paredes celulares. Las bacterias fibrolíticas producen celobiosa, glucosa o pentosas como productos intermedios, y utilizan vías fermentativas con acetato como producto final (Church, 1993) que es importante en la síntesis de grasa.

La fibra que por sus características físicas puede estimular la motilidad ruminal se conoce como fibra efectiva, contribuye al mantenimiento del adecuado funcionamiento de la rumia, llenado ruminal, estímulo de las contracciones ruminales y de las condiciones ruminales. Por lo tanto, la fibra de baja digestibilidad y con un alto contenido de lignina es inconveniente porque limita el contenido energético de las raciones y el potencial de ingestión (Van Soest, 1982).

2.4.2 Implicaciones de las fracciones de la fibra

El contenido de FDN es uno de los factores que determinan la ingestión de la materia seca y la correcta función ruminal; este valor está ligado a la forma de la fibra debido a su efecto físico (Lycos *et al.*, 1997). El funcionamiento normal del rumen requiere el mantenimiento de una masa de forraje y el National Research Council (2000) sugiere proporcionar un mínimo de FDN procedente de forrajes (Cuadro 3).

En bovinos para carne estabulados el consumo de materia seca en dietas altas en concentrado está influenciado más por factores metabólico-ruminales que por un llenado físico, el cual sí determina el consumo en vacas lecheras. Este consumo se puede regular directamente por los cambios en la FDN de la dieta (Jung, 1995) y se puede reducir la FDA si el nivel de FDN es adecuado y se usan amortiguadores como factor preventivo de acidosis (National Research Council, 2000).

Cuadro3. Niveles recomendados de fibra neutro detergente (FDN), en la dieta de rumiantes, en función del peso vivo (PV) (National Research Council, 2000).

Contenido de FDN ^a	Observaciones
0.75	Mínimo si la dieta contiene 1.3 a 1.4% del PV como FDN total a través del uso de fibras de subproductos.
0.85	Mínimo si la dieta proporciona 1.1 a 1.2% del PV como FDN total en dietas ricas en almidones
0.90	Nivel moderadamente bajo
0.95	Nivel adecuado
1.00	Nivel moderadamente alto
1.1-1.2	Máximo recomendado

^a nivel recomendado proveniente de forrajes (% del peso vivo).

2.5 Anatomía foliar de gramíneas

2.5.1 Xilema y floema

El xilema es el tejido de conducción de agua y sales. En las láminas (hojas), el xilema se encuentra formado por haces vasculares distribuidos en un patrón de nervaduras, paralelinerves en hojas de gramíneas; es un tejido complejo formado por elementos traqueales (células de conducción), fibras y esclereidas (esclerénquima) y parénquima. Los elementos traqueales son células alargadas, muertas a la madurez, con paredes secundarias lignificadas, y pueden clasificarse en traqueidas y elementos de vaso (Esau, 1985):

Traqueidas: Células sin perforaciones en los extremos y con puntuaciones simples.

Elementos de vaso: Células con placa de perforación en los extremos.

Fibras: Células lignificadas, más alargadas que los elementos traqueales, con función de sostén.

Células de parénquima: Células vivas de pared primaria no lignificada. En el xilema las células de parénquima acompañan a los elementos traqueales.

Como las secuencias de especialización de estas células se observan con bastante claridad, el estudio del xilema aporta claves importantes para dilucidar la evolución de las plantas superiores (Stevenson 1980).

El floema es el tejido vascular que conduce a los fotosintatos producidos en las hojas y los distribuye a los diferentes sitios en crecimiento, y es un tejido complejo formado por elementos cribosos (células de conducción no lignificadas), parénquima acompañante y fibras. El floema se encuentra formando haces junto con el xilema en filamentos que forman las nervaduras de la lámina foliar.

Típicamente, el xilema ocupa el lado del haz vascular más próximo a la médula, aunque no son raras disposiciones distintas. En las partes más viejas de la planta, las células blandas del floema son abatidas y empujadas hacia afuera por el floema nuevo el cual se forma durante el proceso de crecimiento (Stevenson, 1980).

Los elementos cribosos son células vivas, de pared primaria no lignificada, alargadas que contienen áreas cribosas y placas cribosas y son las células más especializadas del floema ya que conducen fotosintatos.

Células acompañantes: Células de parénquima contiguas a los elementos cribosos que ayudan en el movimiento de los materiales orgánicos, son células parenquimatosas.

Células de parénquima: En las dicotiledóneas se encuentran en el sistema axial, formando cordones y aparecen como pequeños grupos rodeados de fibras, cuando estas últimas son muy abundantes.

Fibras: En coníferas aparecen en bandas tangenciales uniseriadas, alternando con bandas similares de células parenquimáticas y cribosas. En las dicotiledóneas en ocasiones están ausentes, están dispersas o pueden estar en bandas tangenciales en disposición paralela o dispersas.

Esclereidas: Pueden aparecer solas o en combinación con las fibras, se diferencian típicamente en las partes más viejas del floema como resultado de una esclerosis de las células parenquimáticas.

En gramíneas los haces son colaterales, el xilema está orientado hacia la cara superior de la hoja (haz) y el floema está orientado hacia la cara inferior (envés) de la lámina (Stevenson, 1980).

2.5.2 Anatomía de plantas C3 y C4

Existen dos mecanismos básicos de concentración de CO₂ en plantas vasculares, donde antes de la incorporación y reducción de CO₂ en el ciclo de Calvin, el CO₂ atmosférico se incorpora transitoriamente en otro compuesto. Esta fijación previa de CO₂ actúa como un mecanismo de captación complementario del ciclo de Calvin y representa una adaptación evolutiva asociada a determinadas condiciones ambientales. Para lograr esto hay dos mecanismos: el C4 o plantas C4, que son frecuentes en climas cálidos, y se denominan así porque el primer producto de fijación de CO₂ es un ácido dicarboxílico de 4C; y el mecanismo CAM en plantas típicas de ambientes desérticos, que exhiben un ciclo diario de acumulación y metabolización de ácidos orgánicos. Las plantas que no presentan estos mecanismos y tienen solamente el ciclo de Calvin se denominan plantas C3 (Figura 3), tienen pocos organelos, cloroplastos pequeños y las células están vacías y claras, en contraste con el mesófilo rico en cloroplastos de las plantas C4 (Salisbury y Ross 2000).

Las hojas de las gramíneas C4 (Figura 4) se caracterizan por tener grandes cloroplastos las células de la vaina del haz vascular y un arreglo concéntrico del mesófilo en forma de corona, por lo que se le denomina Anatomía Kranz (del alemán: corona). En contraste con las células de la vaina, las células del mesófilo, las células del mesófilo tienen espacios intercelulares. En el corte transversal se observan dos tipos de células fotosintéticas en el mesófilo, unas grandes, que rodean a los haces conductores (a modo de “corona”), y las restantes que ocupan el mesófilo, menores y dispuestas por lo general más o menos radialmente alrededor de la vaina (Esau, 1985).

En contraste las hojas de las gramíneas C3 (Figura. 3) no presentan esta anatomía Kranz o corona. La vaina del haz vascular no posee grandes cloroplastos y tampoco hay un arreglo concéntrico del mesófilo (Figura. 4)

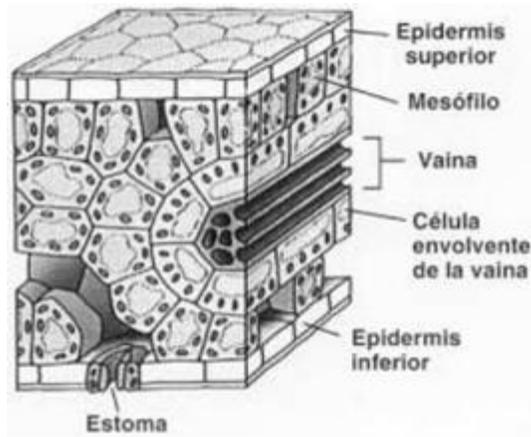


Figura 3. Principales estructuras en una lámina de planta C4
Adaptado de Esau, 1985.

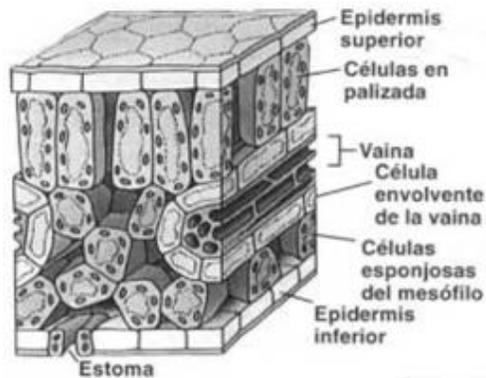


Figura 4. Principales estructuras en una lámina de planta C3. Adaptado de Esau, 1985

2.6 Selección genética de los forrajes

Para aprovechar las características deseables de una planta se realizan cruzamientos y se fijan dichos caracteres. El cruzamiento consiste en la transferencia de polen de un individuo a otro y cuando sucede entre individuos de la misma especie se denomina recombinación, y se denomina hibridación cuando son dos especies diferentes. El intercambio de material genético entre diferentes especies (de manera natural o inducida) resulta en híbridos con diferentes características a las de los progenitores y por lo tanto distintos requerimientos y productividad, y por lo tanto es probable que los híbridos no puedan adaptarse a las condiciones donde se desarrollan sus progenitores; sin embargo, la segregación de ciertas características anatómicas o metabólicas permite que el híbrido posea mejores características adaptativas o productivas que los progenitores (Van tuyl, 1991). En la naturaleza existen limitantes para que esta polinización no suceda tan fácilmente, como el impedimento de la fertilización, por falla o ineffectividad del crecimiento del tubo polínico, o por incompatibilidad gamética antes de la fertilización. Cuando sucede la fertilización y se forma el cigoto, los híbridos pueden ser débiles, estériles o no sobrevivir a las condiciones ambientales donde se desarrollaron los progenitores. Las limitantes pre-cigóticas son más frecuentes que las post-cigóticas, pero en el mejoramiento forrajero estas barreras se evitan mediante técnicas de polinización asistida, polinización *in vitro* y regulación de condiciones de luz y temperatura, así como aislar protoplastos de dos especies distintas y fusionarlos para obtener un híbrido (Lowry *et al.*, 2008).

La mejora de las especies forrajeras, se realizó en un principio seleccionando a los individuos por sus características fenotípicas, es decir aquellas que se podían observar

y medir. En este tipo de selección la evaluación genotípica era circunstancial y la variabilidad genética y heredabilidad de los caracteres evaluados presentaba una intensidad baja, porque no se seleccionaban directamente los genes o regiones genéticas involucradas en la expresión fenotípica. En la actualidad es necesario utilizar técnicas de selección y mejora genética que evalúen la variabilidad genética directamente, es decir, las diferencias en el ADN de los individuos evaluados (Ralph *et al.*, 2004). Para lograrlo se pueden utilizar marcadores moleculares, que son moléculas asociadas a determinado rasgo genético, y pueden ser proteínas (antígenos o isoenzimas), genes conocidos o fragmentos de ADN de secuencia y función desconocida (Arus *et al.*, 1993).

Generalmente las expresiones genéticas no son dependientes de un solo gen o región, por lo cual es necesario caracterizar las diferentes regiones o genes involucrados en la expresión genotípica cuantificable, lo que se conoce como QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables) (Lauvergeat *et al.*, 2005). Después de conocer los marcadores moleculares involucrados y determinar que una población los posee, se podrán seguir observando diferencias en la intensidad de la expresión genética. Esto significa que hay diferencias incluso dentro de los mismos marcadores, por lo cual un marcador molecular puede ser monomórfico (invariable entre los individuos) o polimórfico (diferencias en el peso molecular de la misma región) (Ayala, 1984).

2.6.1 Marcadores genéticos

Los marcadores pueden ser de tipo morfológicos o moleculares. Los marcadores morfológicos son los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y son identificados y analizados por tener una utilidad específica. Por

ejemplo, el peso o tamaño de las semillas que se asocia en la mayoría de las poblaciones a la supervivencia, crecimiento y la reproducción. Estos marcadores son muy utilizados para evaluar la variación morfológica en una población, pero su principal limitante es que este fenotipo es influenciado por el ambiente y además generalmente se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos (Cornide *et al.*, 2000).

Los marcadores moleculares permiten evaluar cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas y genotípicas) y se transmiten según las leyes de la herencia mendeliana, pero no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos (Nishitani, 2002).

Hay dos tipos de marcadores moleculares: los bioquímicos y los de ADN. Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción y traducción, así que son menos influenciados por el ambiente. Las isoenzimas son variantes moleculares de una misma enzima presentes en una especie, las cuales desempeñan la misma actividad pero pueden tener diferentes propiedades. Las diferencias en la movilidad electroforética de las isoenzimas resultan de las diferencias en las secuencias del ADN que codifican tales enzimas (Forster *et al.*, 2001). El control genético de la mayoría de las isoenzimas es conocido y permite realizar inferencias genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles electroforéticos. Su uso es limitado porque representan una estrecha fracción del contenido genético y sólo detectan la variación de los genes que codifican para la expresión de una

característica del individuo; la precisión de los datos se dificulta debido al polimorfismo en el tejido de las isoenzimas y son específicas para determinados sustratos.

Respecto a los marcadores de ADN, existen varias técnicas agrupadas en tres categorías: las de hibridación tipo Southern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las que combinan PCR o sus productos de ADN con la hibridación tipo Southern. La hibridación consiste en la formación de una molécula de doble cadena mediante el apareamiento o unión de bases complementarias de dos moléculas de una sola cadena. Dentro de esta técnica se encuentran los marcadores RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable) (Cornide *et al.*, 2002).

La técnica de PCR o reacción en cadena de la polimerasa se utiliza para multiplicar (sintetizar) *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo estudiado. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de secuencias de nucleótidos denominadas iniciador (primer) que reconocen una secuencia blanco para la cual es complementaria (Mullis y Faloona, 1987). Dentro de esta metodología se encuentran los marcadores RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), PCR iniciada con microsatélites (MP-PCR), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y DAF (amplificación de huellas del ADN), entre otros (Koreth *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 1990). Dentro de las metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern, están los RAHM y RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites).

Los polimorfismos amplificados al azar (RAPDs) fueron los primeros marcadores moleculares utilizados en especies forrajeras (Williams *et al.*, 1990). Actualmente los más usados son los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) y los polimorfismos en las secuencias simples repetidas (SSRPs) (Lauvergeat *et al.*, 2005). También se emplean para mapeo y selección asistida (SAMM). Debido a que muchos cultivos forrajeros son complejos poliploides con genomas derivados de varios progenitores o con herencia polisómica, el desarrollo de mapas de ligamiento es más complicado y más costoso que en especies diploides.

2.6.2 Polimorfismo genético

La evaluación de la variabilidad genética es difícil pero se puede estimar en una muestra de la población al observar un carácter o marcador que propicie la medición de dicha variabilidad (Ayala, 1984). Los polimorfismos detectados en el ADN están ocasionados por diferencias en cuanto al número de determinadas regiones no codificantes, que se encuentran dispersas en el genoma (regiones repetidas) o por mutaciones puntuales. En función de estas características se pueden clasificar los diferentes métodos de detección de polimorfismos: los marcadores asociados a variaciones debidas al número de repeticiones en su secuencia, y los marcadores que detectan cambios puntuales en el genoma detectables por enzimas de restricción. La selección del método depende de la aplicación específica que se desea (Posselt, 2000). Si el objetivo es identificar el genoma o evaluar la diversidad genética, los métodos con radio múltiple de elevado volumen (AFLP), son apropiados debido a que pueden ser detectados muchos *loci* distribuidos al azar por el genoma. Este tipo de marcadores también son muy útiles en análisis genotípicos y taxonómicos para

construir mapas genéticos y para identificar marcadores unidos a un carácter en particular (Cornide *et al.*, 2002).

El mejoramiento de las especies forrajeras a través de técnicas moleculares se enfoca en la calidad de los forrajes, específicamente en los subcaracteres involucrados como digestibilidad de la materia seca, contenido de carbohidratos solubles, contenido de proteínas, metabolitos secundarios, alcaloides, etc. (Martin, 2006). Los resultados del mejoramiento genético se han aplicado en: calidad del forraje, aplicación de la biosíntesis de lignina, manipulación del metabolismo de fructanos, expresión transgénica de proteínas de sobre paso (*by-pass*) en el rumen, operación de la biosíntesis de taninos condensados, resistencia a plagas y enfermedades, para aumentar la resistencia a enfermedades fúngicas, incrementar la resistencia a enfermedades virales, aumentar la resistencia a plagas, crecimiento y desarrollo, manipulación de alérgenos del polen y fases de floración, administración de la senescencia y biosíntesis de lignina (Humphreys *et al.*, 2001).

El establecimiento de las metodologías requeridas para el mejoramiento molecular de plantas forrajeras muestra progresos, y se usan varias estrategias biotecnológicas para el mejoramiento de la calidad nutritiva a través de la alteración de la biosíntesis de lignina, carbohidratos solubles y protoantocianas y de la expresión regulada de proteínas ricas en aminoácidos esenciales, resistentes a la fermentación en el rumen. También se pretende incrementar la resistencia a patógenos y plagas, manipular el crecimiento y desarrollo a fin de aumentar la persistencia y demorar la senescencia, impedir la floración y regular negativamente los alérgenos del polen (Ramírez, 1991).

Las primeras plantas forrajeras transgénicas se han evaluado a campo y se usan eventos de transformación seleccionados para el desarrollo de cultivares.

2.7 Gramíneas *Festuca*, *Lolium* y *Festulolium*

Festuca y *Lolium* son dos gramíneas utilizadas por sus características sobresalientes de calidad y resistencia en climas templados. Debido a que su uso se limita a zonas con climas no extremos, se han desarrollado cruza de estas dos especies, obteniendo un híbrido interespecífico (*Festulolium*) con cualidades nutritivas y de resistencia de ambos progenitores recombinantes. A continuación se describen las características de ambos progenitores y su recombinante.

2.7.1 *Festuca*

Los pastos del género *Festuca* son perennes amacollado de clima templado, son cultivados para praderas, heno y ensilaje, y se encuentran en climas fríos y templados en el continente americano. Es un pasto valorado por su tolerancia a una amplia variedad de factores de suelo y clima, y por su alto potencial de producción (Muslera y Ratera, 1991).

La inflorescencia es una panícula hasta 50 cm, pero normalmente es de 10 a 35 cm. Las panículas varían desde abiertas y ramificadas sin orden a muy angostas. Las ramificaciones cortas tienen varias espiguillas. Está bien adaptado a áreas húmedas y templadas, particularmente en las zonas de transición donde las gramíneas de clima frío y caliente se cultivan exitosamente (Muslera y Ratera, 1991).

El *Festuca* crece mejor en suelos profundos, húmedos, de textura pesada a media y altos en contenido de materia orgánica, se desarrolla mejor en suelos con pH de 4.7 a

9.5 y el mejor pH es de 5.5 a 8.5. Es adecuado para suelos con drenaje excesivo a pobre drenaje, tolerando períodos largos de inundación (24 a 35 días) cuando la temperatura es inferior a 27 °C. La precipitación pluvial mínima requerida es 375 a 450 mm, aunque en áreas con alta evapotranspiración se puede requerir más de 900 mm (Alderson *et al.*, 1995).

2.7.2 *Lolium*

Es una gramínea amacollada adaptable a climas fríos, su sistema radicular es superficial altamente ramificado y con producción de raíces adventicias de los nudos basales del tallo. Debido a que puede formar nuevos tallos y macollos densos, presenta una vida prolongada en relación a otros pastos de clima templado (Muslera y Ratera, 1991). Posee hojas brillantes, lisas y dobladas en el nudo, miden de 2 a 6 mm de ancho y de 5 a 15 cm de largo. Las vainas de las hojas son comprimidas y en ocasiones casi cilíndricas, no tienen vellos y son de color verde pálido y rojizo en la base. Sus lígulas son membranosas de 1 mm de longitud como máximo. La inflorescencia consta de una espiga de 10 a 20 cm de largo con espiguillas (de 5 a 40) acomodadas y unidas de forma alterna, directamente a lo largo del borde del raquis central, estas espiguillas contienen de cuatro a 20 flores alternas, hermafroditas y cuyas lemas no tienen aristas. Su forma de ahijamiento y hábito de crecimiento es adaptable a las diferentes situaciones ambientales a las que se someta (Alderson *et al.*, 1995).

Tolera suelos con pH desde 5.1 a 8.4, y el intervalo óptimo es 5.5 a 7.5 para expresar el potencial productivo de la especie. La temperatura idónea es 18 a 25 °C (Schot y Weihing, 1980), pero el *Lolium perenne* tolera menos temperaturas extremas y

periodos prolongados de sequía. En México el *L. perenne* está adaptado a zonas de clima templado con temperatura media anual de 10 a 18 °C, siempre y cuando la temperatura del mes más caluroso no supere los 30 °C; requiere de una precipitación anual mayor a 700 mm (Heitschmidt *et al.*, 1991).

2.7.3 Festulolium

El objetivo principal de la recombinación de *Festuca* spp. y *Lolium* spp. es la incorporación de rasgos deseables de ambos progenitores en una sola población de plantas. El género *Lolium* aporta a este híbrido su calidad nutricional y palatabilidad, además de su crecimiento acelerado en primavera, mientras que el género *Festuca*, aporta su tolerancia al estrés de las épocas invernales y de estiaje (Casler *et al.*, 2002). En general se utilizan dos formas de producción de *Festulolium*: 1) cruzamiento directo de dos especies con el mismo nivel de ploidía (cada híbrido debería contener 50 % de información de cada progenitor), y 2) utilizar especies con diferente nivel de ploidía, por ejemplo *Lolium* 2X x *Festuca* 4X. En este sistema se mejora la fertilidad con retocruzadas con las especies parentales, en muchos casos el contenido ADN del segundo progenitor es mayor (introgresión). Ambos tipos de cruzamientos son válidos para establecer individuos de interés forrajero (Kopecky *et al.*, 2006).

Debido a que los géneros *Festuca* y *Lolium* tienen especies con diferentes características, se han utilizado diversas combinaciones de estas especies para obtener la gramínea *Festulolium* de acuerdo con la zona geográfica donde se establecerá, y la forma en que se empleará. Hasta ahora el *Festulolium* se comercializa y emplea productivamente en Europa (Cuadro 4).

Los híbridos interespecíficos como el *Festulolium* combinan distintas características deseables como calidad nutricional y resistencia (Casler *et al.*, 2002). Aceptar esto implica que cada híbrido resultante puede tener diferentes rendimientos y calidad nutricional durante las estaciones del año y ser alternativas en la producción forrajera. Existen diferentes cultivares de *Festulolium*, como *xFestulolium pabulare* que es un híbrido resultante de la cruce de *F. arundinacea* x *Lolium multiflorum* (Lam), o *Festulolium braunii* K.A., que es el híbrido de *Festuca pratensis* (Huds) x *L. multiflorum* (Opitz *et al.*, 2006).

Se ha comparado directamente los rendimientos productivos de los híbridos respecto a sus progenitores, en la parte norte de EE.UU. y centro de Alemania, donde la persistencia de *xFestulolium braunii* es mayor que su progenitor *F. arundinacea* en invierno. En estos estudios hubo una recuperación más rápida luego de los cortes de homogenización durante la etapa crítica del invierno, respecto al progenitor *Lolium* spp. (Casler y Walgenbach, 1990). Respecto a estos híbridos, la selección genética resulta en un rango de individuos semejantes a *Festuca* (festucoides) o a *Lolium* (loloides), es decir los resultados no son consistentes ni en un solo tipo de híbrido estudiado y se reportan niveles de calidad y productividad diferentes (Opitz *et al.*, 2006).

Otro cultivar registrado es el [*xFestulolium loliaceum* (Huds) P. Fourn.], desarrollado entre la Universidad de Wisconsin y una empresa transnacional. Durante este desarrollo el *Festulolium* mostró mejor adaptabilidad a las condiciones invernales respecto a sus progenitores, se puede utilizar en pastoreos rotacionales y sobrevive a las nevadas (Casler *et al.*, 2001).

Cuadro 4. Especies, ploidías, fenotipo y usos del *Festulolium*

País	Especies utilizadas	Nombre	Fenotipo	Usos específicos*
Alemania	<i>L. multiflorum</i> 4x x <i>F. pratensis</i> 4x	Paulita, Paulena		
Reino Unido	<i>L. multiflorum</i> 4x x <i>F. pratensis</i> 4x	Emrys, Elmet		
República Checa	<i>L. multiflorum</i> 4x x <i>F. pratensis</i> 4x	Perun, Perseus	<i>Lolium sp</i>	Forraje de corte
República Checa	<i>L. multiflorum</i> 2x x <i>F. arundinacea</i> 6x	Beeva	<i>Lolium m.</i> 4X	
República Checa		Lofa	<i>Lolium sp</i>	Pastoreo de vacas altas Productoras
República Checa		Felina Hykor	<i>Festuca a.</i> 6X	Ensilados con trébol de Temporal
Lituania	<i>L. multiflorum</i> 4x x <i>F. pratensis</i> 4x	Punia	<i>Festuca a.</i> 6X	
EE.UU.	<i>L. perenne</i> 4x x <i>F. pratensis</i> 4x	Spring green		Forraje único de invierno
Nueva Zelandia	<i>L. perenne</i> 2x x <i>F. pratensis</i> 2x	Matrix		

*Todas las variedades son utilizadas en sistemas rotacionales intensivos

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la composición de las fracciones de la fibra, abundancia relativa de lignina, crecimiento y los marcadores moleculares ligados a la formación de lignina en tres pastos de clima templado: el híbrido *Festulolium* y sus progenitores *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar las regiones del genoma involucradas en la síntesis de pared celular y lignina, mediante marcadores moleculares, determinar el posible polimorfismo entre *F. arundinacea*, *L. perenne* y *Festulolium*.
- Analizar las variables de crecimiento, caracteres anatómicos y abundancia relativa de lignina de *F. arundinacea*, *L. perenne* y *Festulolium* y su correlación con los marcadores moleculares.

4.-JUSTIFICACIÓN

Las herramientas genómicas permiten comprender mejor la genética, fisiología y bioquímica de varios procesos vegetales complejos y acelerar la aplicación de estrategias de tecnología génica para el mejoramiento de plantas forrajeras. Muchos

genes vegetales representan un recurso valioso para ser insertados en diversas plantas de cultivo utilizando tecnología génica y para utilizarse como marcadores en selección asistida. Es importante conocer la relación que tienen estos marcadores con las diferentes especies forrajeras, con su contenido de pared celular y de lignina, así como su patrón de acumulación, con la finalidad mejorar la utilización de estas especies en la producción de rumiantes.

5. HIPÓTESIS

Los marcadores moleculares seleccionados para el presente estudio presentarán polimorfismo en los pastos *F. arundinacea*, *L. perenne* y *Festulolium*; entonces, habrá diferencias en la composición de la pared celular, abundancia relativa de lignina, crecimiento y características anatómicas entre los pastos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Invernadero

En los campos experimentales de la Universidad Autónoma Chapingo se recolectaron 142 individuos de la población *Festulolium* (septiembre 2008), de cada macollo (individuo) fueron separados 10 tallos y trasplantados a charolas contenedoras de 200 cavidades con sustrato peat moss (Kekkila®, Dark seeding mix). Transcurridos 45 días, cinco clones de cada individuo fueron seleccionados por tamaño y vigorosidad para

trasplantarlos a macetas de 17 cm de diámetro, con un sustrato a base de suelo franco (50 %) y peat moss (50 %). En total se estudiaron 710 macetas con *Festulolium* (142 individuos con 5 clones de cada uno). Además, se sembraron 200 semillas de cada uno de los progenitores *F. arundinacea* y *L. perenne* en charolas contenedoras. A los 65 días después de la siembra, se trasplantaron 50 individuos de cada especie a las macetas con el mismo sustrato en el cual fueron colocados los clones de *Festulolium*. En total se mantuvieron 810 macetas en el invernadero las cuales eran ferti-irrigadas. Una vez estabilizadas las condiciones de mantenimiento, se realizó la aleatorización de las macetas para distribuir las en 10 mesas. En cada mesa se colocaron 71 clones de *Festulolium*, cinco individuos de *F. arundinacea* y cinco de *L. perenne*.

Después de un corte de homogenización a los 60 días, en cada individuo se midió la altura total de la planta a los 0, 4, 7, 11, 14, 19 y 22 días, conteo y medición de láminas. Para determinar el crecimiento laminar se marcaron 20 tallos por especie de acuerdo con lo descrito por Birchman y Hodgson (1983), en los cuales se midió semanalmente el crecimiento en longitud de las hojas (láminas), utilizando una regla con precisión de 1 mm; la longitud fue considerada desde la lígula hasta el ápice laminar. Además se midió la longitud de porción senescente, con lo cual se obtuvieron dos valores, crecimiento y senescencia laminar, y el resultado de la resta entre estos valores correspondió al crecimiento de lámina por día (cm). En la última fecha (22 d) se recolectó la biomasa (viva y muerta) de las plantas a 3 cm desde el suelo, y parte de este material fue procesado para la determinación de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest *et al.*, 1991).

6.2 Anatomía vegetal

6.2.1 Microscopía óptica

Del material recolectado en el día 22 de los tres pastos, se seleccionaron las láminas con mejor integridad física. El material vegetal seco se rehidrató en agua durante 24 h a 60 °C, se lavó y fijó en FAA (50 mL alcohol etílico 95 %, 10 mL aldehído fórmico 40 %, 2 mL ácido acético puro y 40 mL agua destilada). Fragmentos de 0.5 cm de la parte media de 10 láminas se cortaron (50 μm) con un micrótomo de mano y se tiñeron para lignina fluoroglucinol al 2 % en etanol y HCl para determinar la abundancia relativa de lignina, mediante el cociente entre el área de las células lignificadas y el área total del mesófilo (Zavaleta y Engleman, 1994). Fragmentos de 0.5 cm de la parte media de las mismas hojas se procesaron para su inclusión en parafina. Los tejidos se deshidrataron en una serie gradual de etanoles (30, 40, 50, 80, 95, 100 %), e infiltraron en etanol:xileno (1:1), xileno 100 %, xileno 100 %, xileno 100 % por periodos de 4 h en cada uno. Se infiltraron en parafina y se obtuvieron cortes transversales (20 μm) con un micrótomo rotatorio (American Optical, USA). Los cortes fueron teñidos con Safranina y Verde Fijo para describir los caracteres anatómicos. Las láminas fueron analizadas con un Microscopio Óptico Compuesto (Axiostar Plus, Zeiss) y fotografiadas con una cámara digital AxioCam MRc 5. Se midió el área del xilema, número de células buliformes, área total y lignificada de la lámina, número de haces vasculares y distancia entre ellos en corte transversal. Estas mediciones se realizaron con el programa Motic Images Plus 2.0 (2004).

6.2.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Con la finalidad de describir la densidad estomática (No. estomas/mm²) y densidad de tricomas (No. tricomas/mm²) en el haz y envés de la hoja, fragmentos (0.5 cm²) de la parte media de cinco hojas por genotipo se postfijaron en 2 % de glutaraldehído en amortiguador de fosfatos Sørensen 0.1 M pH 7.2 (Ruzin, 1999). Después de 48 h los tejidos se deshidrataron en una serie de etanoles graduales y luego se deshidrataron a punto crítico (secadora Samdri-780, Tousimis). Los fragmentos de hoja se montaron en portamuestras de cobre con una cinta de carbón doble adhesiva y se cubrieron con oro:paladio (80:20) en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, JEOL Fine Coat; Japón) para hacer conductiva la muestra. El haz y envés de cinco hojas de cinco individuos por genotipo fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6390) operado a 15 kV. La densidad estomática y de tricomas (10000 μm²) se determinó usando el programa Motic Images Plus 2.0 (2004).

6.3 Análisis molecular

Para obtener ADN se recolectaron hojas sanas y limpias y solamente las láminas fueron lavadas con agua destilada y alcohol al 75 %, mantenidas 2 h en refrigeración y después congeladas a -20 °C. Este material fue liofilizado y mantenido a -80 °C para realizar la extracción de ADN de acuerdo con el protocolo CTAB modificado (Hoisington *et al.*, 1994). El ADN obtenido se almacenó en viales a -20 °C y una porción fue diluida en viales de 2 mL a una concentración de 20 ng μL⁻¹ que se utilizó para determinar posible polimorfismo, probando diferentes iniciadores relacionados con el contenido de

paredes celulares y abundancia relativa de lignina. Los diferentes iniciadores utilizados se muestran en los Cuadros 5, 6 y 7.

Se probó si los iniciadores eran polimórficos con los diferentes individuos (PCR, electroforesis en Acrilamida, revelado en plata y toma de fotografía), para que en caso de ser positivo se tomaran y almacenaran las imágenes, las cuales se utilizaron después para construir las matrices de datos que contenían el número de bandas polimórficas.

Cuadro 5. Iniciadores SSR con denominación NFFa (Noble Foundation *Festuca arundinacea*)

Nombre		Secuencia 5´-3´	T (°C)	Tamaño (Pb)
NFFa002	Forward	GCT CCA GCT TCT CCA TCA TC	55.	5963.9
	Reverse	ACC AAG TCG TCC AAG TCA GC	57.4	6071.0
NFFa004	Forward	AAG CGG GAG GAG AGA TGG	56.5	5702.8
	Reverse	CAC CAC GAC GTC GCT CTC	58.4	5380.5
NFFa009	Forward	TCC AAC CCT AGA TCC ACA CC	56.1	5950.9
	Reverse	GGT GAA CTC GTC CGT GAT CT	56.5	6164.0
NFFa015	Forward	GCG TCC ACT AAC AAC ACC AA	55.6	6024.0
	Reverse	AGC AAG GCC AGC AAA AAT TA	53.3	6152.1
NFFa019	Forward	TGG ATT TGC AAT TAG CCT CA	52.3	6107.0
	Reverse	GCT CGT GTA TGG CCT TCA AT	55.4	6099.0
NFFa021	Forward	CAC AGC TCG TAT AGG CGT CA	56.7	6102.0
	Reverse	CTT GTC GAA GAG CGG GAA CA	55.9	5877.9
NFFa023	Forward	AGT CGG TGG TGA AGC TGA AG	57.2	6262.1

	Reverse	TAC AAC TAG GGG GCT GGT CA	57.7	6182.1
NFFa024	Forward	TGCCCACGAGGTCTATCTTC	56.3	6044.0
	Reverse	AGC TTC CCC TTC ATT CCA CT	56.2	5938.9
NFFa027	Forward	CGA GGT CTC AAT CCT CCA TT	54.0	6028.0
	Reverse	GAC AGA GAC GAC GAC GAC AT	56.5	6169.1
NFFa030	Forward	AGT CGG TGG TGA AGC TGA AG	57.2	6262.1
	Reverse	ACA ACT AGG GGG CTG GTC A	58.4	5877.9
NFFa031	Forward	ACG GTC TGT ACC GTG GAT GT	58.2	6164.0
	Reverse	GCT GTA GAC TCA GCC GAA CC	57.8	6087.0
NFFa034	Forward	GCTGGGTGTAGGGCTGTAAA	57.1	6253.1
	Reverse	CTC CTT TCC ATC ACC TCT GG	54.9	5954.9
NFFa036	Forward	AGA GGA AGA GCG AAA GAG CA	55.9	6282.2
	Reverse	CCC TGG TAC TCG TGG ATG TT	56.6	6115.0
NFFa039	Forward	GTC TGC ACC CCT CTC CTC TC	59.2	5915.9
	Reverse	CTC CTT ATC TTG GCG ATG GA	54.1	6099.0
NFFa041	Forward	TCC TGA GAG ACA TCG AGC AG	55.9	6151.0
	Reverse	TCA AAA GCC CAA ACA CTT CC	53.7	5999.0
NFFa045	Forward	ACG AGG GAA AGG TAG GGT TT	55.8	6286.1
	Reverse	GAT GAA GCC AAT TTC CTT GG	51.9	6132.0

Cuadro 6. Iniciadores SSR con denominación NFFa (Noble Foundation *Festuca arundinacea*)

Nombre		Secuencia 5´-3´	T (°C)	Tamaño (Pb)
NFFa047	Forward	TTC CTT CCT CTT TCC CAA CA	53.6	5913.9
	Reverse	ATG GTC TCC CTC TGC TCG TA	57.3	6034.9

NFFa048	Forward	CAG GCT GTT AAC GGT GTC CT	57.2	6124.0
	Reverse	CCT TCT TCT TGG GAG GGA AA	54.3	6148.0
NFFa049	Forward	CTA CTA CGG GGG AGG TGG AG	58.5	6263.1
	Reverse	CGC AAC AGT TGT ACC GAC AG	56.3	6111.0
NFFa052	Forward	GTG GAT CCA AAC GAA TCG AA	52.9	6159.1
	Reverse	GTG CTC TTC CTT CCA GTT CC	55.5	5985.9
NFFa058	Forward	CAATCTACCGTCGCTTCACC	55.7	5972.9
	Reverse	CAAACCCAGGTGGCAGATTT	53.8	6150.1
NFFa059	Forward	GTC GCC GGA GAA GAG AAG AG	57.2	6265.1
	Reverse	AAC CGT AGC CGT GAT GAC TT	56.7	6117.0
NFFa061	Forward	TGG ATT TGC AAT TAG CCT CA	52.2	6265.1
	Reverse	GCT CGT GTA TGG CCT TCA AT	55.4	6117.0
NFFa064	Forward	TCA TTT GAC GCC ACT TGA AC	53.6	6052.0
	Reverse	GTC TTA GCG CCT TCC TTG GT	57.3	6066.0
NFFa066	Forward	CTC CCC GTC CTT CCA TCT	56.2	5297.5
	Reverse	CAA CCT CCT CCA CCA TCT TG	55.4	5932.9
NFFa068	Forward	GAG GTT TTG CTC CCT CCT GT	57.1	6066.0
	Reverse	AGG GTC CTT CTG CAA GTC CT	58.2	6084.0
NFFa069	Forward	CCC AAG AAG AAG ACG ACC AA	54.6	6122.1
	Reverse	ACG ACC GAA TGG ACA GAG AC	56.6	6169.1
NFFa073	Forward	TTC CTT CCT CTT TCC CGA AC	54.4	5929.9
	Reverse	ATG GTC TCC CTC TGC TCG TA	57.3	6034.9
NFFa074	Forward	TTC CTT CCT CTT TCC CAA CA	53.6	5913.9
	Reverse	ATG GTC TC CCT CTG CTC GTA	57.3	6034.9
NFFa075	Forward	CTC TGC CCT TCC TTC CTC TT	56.4	5896.8

Reverse ATG GTC TCC CTC TGC TCG TA 57.3 6034.9

Cuadro 7. Iniciadores SSR con denominación LPSSR (*Lolium perenne*, Universidad de Victoria, Australia)

Nombre		Secuencia 5´-3´	T (°C)	Tamaño (Pb)
LPSSRH01A02	Forward	AAA GAC CGT ATA CGA AGT	51.3	5525.7
	Reverse	AAC CAA AGC CTC AAG ACA	51.5	5454.6
LPSSRH01A07	Forward	TGG AGG GCT CGT GGA GAA GT	60.5	6728.1
	Reverse	CGG TTC CCA CGT CTT GC	60.1	5098.3
LPSSRH01A10	Forward	GAG GCA CCG GCC ATG GAG	61.6	5574.7
	Reverse	AGG ACG AGC CAC TCA CTT G	57.0	5797.8
LPSSRH01E10	Forward	CGC AGC TTA ATT TAG TC	45.1	5160.4
	Reverse	GCT TTG AGT ATG TAA AGT T	44.9	5872.9
LPSSRH01H06	Forward	ATT GAC TGG CTT CCG TGT T	54.6	5800.8
	Reverse	CGC GAT TGC AGA TTC TTG	51.9	5505.6
LPSSRH02C11	Forward	TGG AAT GAT GAA AAG	44.3	5604.7
	Reverse	CAT CAG GAA TTA ACA AGA G	45.9	5813.9
LPSSRK01A11	Forward	CGG CCA CCC TTG ATA GAG	55.1	5484.6
	Reverse	TCG TCA AGG ATC CGG AGA	55.2	5548.7

6.4 Análisis estadístico de los resultados

Para las variables de rendimiento y anatómicas los datos fueron analizados con el programa de cómputo SAS mediante el método genmod- zero inflated Poisson, para determinar si existía correlación en el análisis de los datos observados y de los residuales (Xie *et al.*, 2001). Este modelo de correlación es válido cuando existen muchos ceros en los datos analizados (Cui *et al.*, 2009); consiste en encontrar una correlación significativa (>0.5) en los datos observados, los esperados o en ambos. Para la interpretación se consideró lo siguiente:

1. Cuando existió una correlación significativa (>0.5) para los valores observados y los residuales, se consideró que las especies no se comportaron distinto y las variables involucradas son dependientes entre sí (la correlación se debió al efecto de la especie y la naturaleza de las variables).
2. Si existió una correlación en los valores residuales y no en los observados, se consideró que las especies se comportaron distinto para ambas variables y que las variables se correlacionaron entre ellas (la correlación existente se debió efecto de la variable y no al efecto de la especie)
3. Al encontrar una correlación significativa en los valores observados y no en los residuales, se consideró que las variables no se encontraban relacionadas entre sí y las especies se comportaron distinto.

Cuando se detectó diferencia entre las variables por especie, se realizó una prueba de rango múltiple Tukey para identificar cuáles eran las distintas (Cochran y Cox., 2001)

Para el análisis de la correlación de los marcadores con las variables de crecimiento y anatomía vegetal se realizó primero una prueba F-Máxima para comparar la varianza, y

después una prueba T corregida por Satterwhite cuando las varianzas eran heterogéneas (Martínez, 1988)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *Festulolium* se comportó distintamente a sus progenitores en el número de láminas por tallo, respecto a la abundancia relativa de lignina y el área de xilema y floema el *Festulolium* fue similar al de *L. perenne*, pero en la densidad de tricomas en el haz el *Festulolium* tuvo valores semejantes a los de *F. arundinacea*. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Casler *et al.* (2002), quienes indican que en las primeras generaciones (como en el presente estudio), los individuos resultantes de la cruce entre *Lolium* y *Festuca* no mostrarán tendencia significativa hacia algún progenitor en la expresión de sus características fenotípicas; sin embargo, se espera que las futuras generaciones segregarán hacia *Lolium*. En el Cuadro 8 se muestra el valor de las medias en las diferentes variables.

7.1 Análisis de valores observados y residuales

Se detectaron algunas variables que presentaron dependencia biológica, es decir, que su valor se comportó de manera similar entre ellas porque la naturaleza de una depende la otra. Entonces, no hubo diferencia en su expresión y las variables fueron dependientes entre sí, como en el caso de: 1) número de haces y densidad de tricomas en haz; 2) densidad de estomas en haz y área del xilema; 3) densidad de estomas en envés y área del xilema; 4) crecimiento de lámina (cm dia^{-1}) y número de láminas por tallo. De acuerdo con Chaves *et al.* (2006) y Casler (2000), algunas características anatómicas suelen evolucionar conjuntamente y las especies forrajeras emparentadas

Cuadro 8.-Medias y desviaciones estándar de las diferentes variables analizadas

	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Festulolium</i>	<i>Lolium perenne</i>	Desv. Est
Crecimiento de lámina (cm día ⁻¹)	0.6	0.9	0.7	0.215
Láminas por tallo	1.7 b	2.7 a	1.9 b	0.598
FDN (%)	52.7	44.7	46.0	11.27
Abundancia de lignina (% de lámina)	30.2 a	10.9 b	8.5 b	3.50
Distancia promedio entre haces (mm)	0.281	0.232	0.204	0.049
Ancho de lámina (mm)	3.92	3.79	3.58	1.04
Densidad de tricomas en haz (No. tricomas/ mm ²)	4.2 a	6.9 a	15.0 b	4.76
Densidad de estomas en haz (No. estomas/ mm ²)	7.2	5.6	7.3	2.88
Densidad de estomas en envés (No. estomas/ mm ²)	4.9	4.7	0.5	4.42
No. células buliformes asociadas a la nervadura	4.8	4.4	5.6	4.57
Área de xilema (μm ²)	8180.4 a	5021.5 b	3776.7 b	1989.32
Área de floema (μm ²)	3459.3 a	1654.4 b	1165.7 b	663.23

Literales distintas en la misma hilera indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

o evolutivamente cercanas no las podrán expresar de manera diferente, a pesar de la distancia genética entre ellas.

Al observarse una correlación entre los residuales y no entre los observados, se puede deducir que las especies se comportaron diferentes para la expresión de ese carácter, aunque las variables hayan sido dependientes entre ellas. Entonces, las especies se comportan distinto pero sin alterar esta correlación biológica de las variables, lo cual fue detectado en: 1) distancia promedio entre haces vasculares-FDN, 2) distancia promedio entre haces vasculares- FDA, y 3) número de células buliformes –FDN. Esta correlación es explicada estructuralmente porque los haces vasculares contienen la mayor parte de la lignina de la hoja, y la lignina se ubica en los vasos y fibras del xilema. La relación entre FDN y FDA es entendible ya que la FDA es una fracción de la FDN, de manera que mientras aumente la FDN, la FDA tenderá a disminuir, considerando que esta variable se expresa en porcentaje de la materia seca.

De acuerdo con el análisis de los resultados obtenidos, la distancia entre los haces vasculares y el contenido de células buliformes determinarán el contenido de FDN y de FDA, y los tres pastos expresarán de manera diferente estas variables. Estos resultados se asemejan a los planteados por Abdul *et al.* (2010), quienes reportan algunas características anatómicas que dependen entre ellas, como FDN, FDA y la distancia entre los haces vasculares.

7.2 Anatomía foliar

Festuca arundinacea presenta una hoja robusta con un grosor de la lámina de 3.9 ± 1.4 mm, el cual fue mayor que el de los otros dos genotipos. *Festuca* se caracteriza por la

presencia de haces vasculares grandes con lignificación en las paredes tangenciales internas de la vaina del haz. El haz vascular central grande de *Festuca* muestra los vasos del metaxilema más grandes que los vasos de *Lolium* y *Festulolium*. La hoja de *Festuca* presenta extensiones de la vaina del haz, formada por células lignificadas que se extienden desde la vaina del haz hasta la epidermis del haz y envés de la hoja. La epidermis presenta células grandes con paredes externas lignificadas característica exclusiva de *Festuca*. El margen de la hoja presenta abundantes fibras, estructuras celulares que le dan rigidez y robustez a la lámina (Figura 5).

La lámina de *L. perenne* posee hojas más suculentas y digestibles, y en el corte transversal se observa una lámina más delgada que *Festuca* y *Festulolium*. La hoja presenta abundantes cloroplastos y un mesófilo con paredes celulares delgadas. En esta especie la lignificación es menor que en *Festuca* y *Festulolium*, y la presencia de paredes lignificadas se observó solamente en los vasos y fibras del xilema. La región abaxial de la nervadura central presenta un grupo de células sub-epidérmicas de paredes engrosadas pero no lignificadas (Figura 5).

El híbrido *Festulolium* presenta un grosor de lámina mayor que *Lolium* pero menor que *Festuca*. La epidermis muestra células grandes pero no lignificadas. La vaina del haz central no está lignificada pero todas las nervaduras presentan un grupo de células con paredes engrosadas debajo de la epidermis del haz. Las nervaduras presentan una mayor proporción de mesófilo fotosintético y las células buliformes son más pequeñas. La región del margen presenta de 4 a 6 células lignificadas como en *Festuca* pero menos abundantes, que le dan cierta rigidez al margen pero menos robusta que *Festuca*.

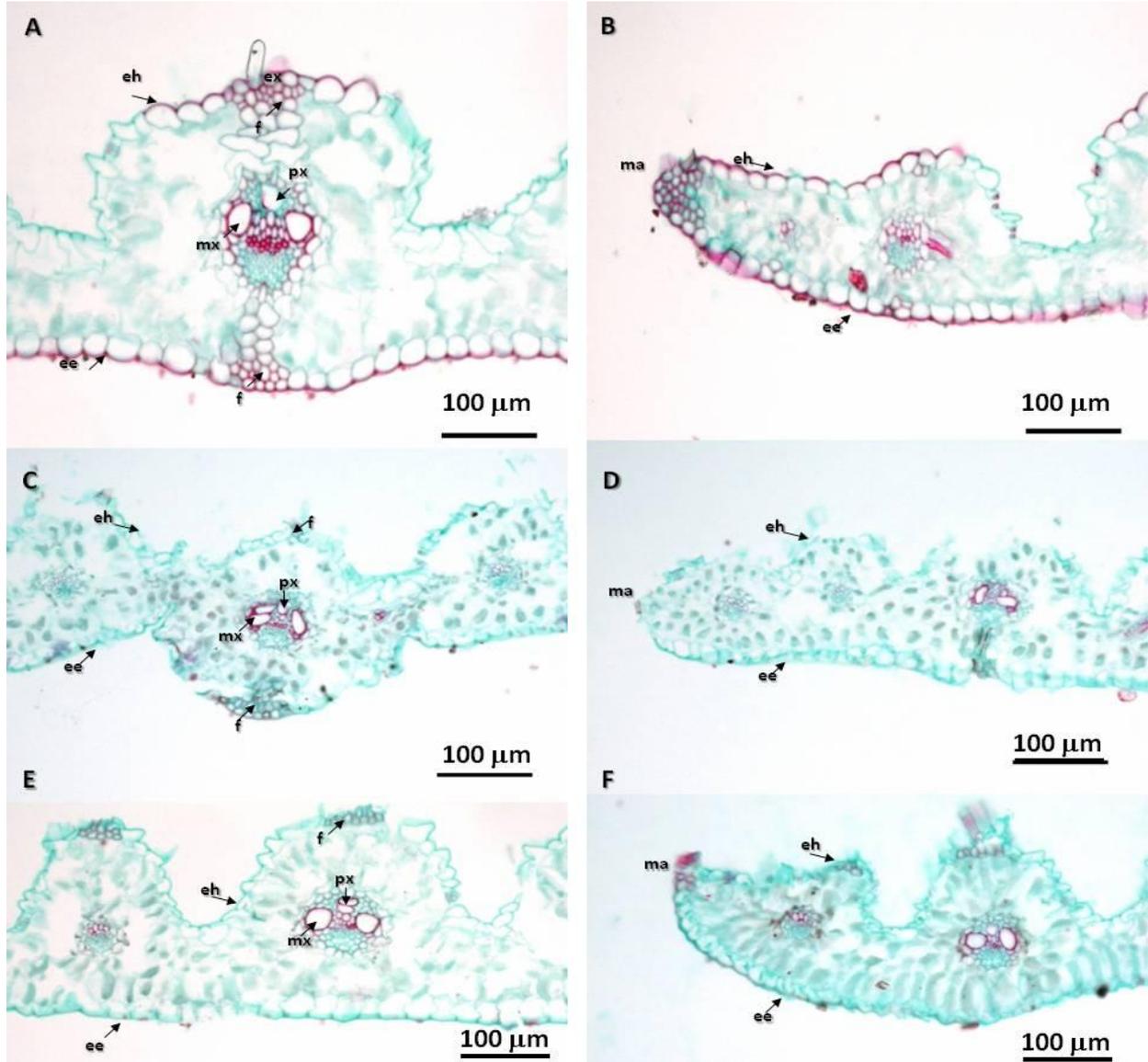


Figura 5. Corte transversal de la lámina de *Festuca arundinacea* (A, B) , *Lolium perenne* (C,D) y el híbrido *Festulolium* (E,F). Tinción con Safranina O y Verde fijo. Nervadura central (A,C, E) y margen foliar (B,D,F). El color rojo indica la presencia de lignina. eh-epidermis del haz, ee-epidermis del envés, ex -extensión de la vaina del haz, ma-margen foliar, mx-metaxilema, px-protoxilema

7.2.1 Microestructura de la epidermis

En los tres pastos, las láminas fueron pubescentes en el haz y glabras en el envés (Figura 6). Los tricomas fueron unicelulares y asociados a las nervaduras en el haz. La densidad promedio de tricomas fue mayor en *Lolium* (15 tricomas mm²) que en *Festuca* y *Festulolium* (4.2 y 6.9 tricomas mm²) pero los tricomas de *Festuca* fueron más robustos, con bases más anchas y longitud (7-10 μm) mayor que los tricomas de *Festulolium* y *Lolium* (5-4 μm). Los tres pastos estudiados presentaron hojas anfiestomáticas con estomas en el haz y envés de la lámina. Los estomas del haz fueron hundidos, ubicados en las criptas formadas por los haces vasculares. Los estomas del envés estuvieron más uniformemente distribuidos. Respecto a la densidad estomática no hubo diferencias significativas entre pastos (Figura 6).

Algunos caracteres pueden expresarse distinto entre las especies, pero la correlación entre las variables puede no alterarse, debido a que el efecto es debido a la especie y no a la variable por si misma (Goujon *et al.*, 2003).

La expresión de algunas características puede manifestarse de manera distinta entre las especies, pero la correlación entre las variables puede no alterarse porque el efecto es debido a la especie y no a la variable por si misma (Goujon *et al.*, 2003). Cuando existió una correlación entre los valores observados pero no entre los residuales, se determinó que las especies se comportaron similarmente y las variables no fueron dependientes entre ellas, lo cual evidenció el parentesco de los individuos, es decir, son variables que tenderán a expresarse y a evolucionar conjuntamente en las especies emparentadas por la semejanza genética y no porque las variables se encuentren correlacionadas biológicamente (Goujon *et al.*, 2003). Esta interpretación

se determinó en las correlaciones: 1) FDN y FDA- área del xilema, 2) número total de haces vasculares –área del floema, 3) densidad de estomas en haz –distancia promedio entre haces vasculares, y 4) densidad de tricomas en haz -área del floema.

En el Cuadro 9 se muestran las variables que mostraron una correlación en los valores residuales, los observados o en ambos.

El detalle de los tricomas y los estomas en las tres gramíneas se puede observar en las Figuras 6, 7 y 8.

7.3 Análisis molecular

Respecto al análisis de los marcadores moleculares, de los 37 iniciadores utilizados, 15 resultaron polimórficos y se correlacionaron con alguna de las variables medidas. Las medias de la variable que presentaron correlación significativa con algún marcador se muestran en el Cuadro 10.

Se encontraron marcadores que mostraron polimorfismo, lo que representa diferencias en la expresión de esa fracción de ADN (Zhang *et al.*, 2006). Debido a que la síntesis de lignina es un proceso complicado debido a que hay muchos genes involucrados, difícilmente se puede encontrar un marcador que sea determinante en el contenido y distribución de lignina en la célula (Barrière *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011).

En la Figura 5 se muestran imágenes de la nervadura central y del limbo, en donde se distingue la diferencia en la abundancia relativa de lignina en las tres especies y se nota la presencia de una extensión de la vaina del haz lignificada en *Festuca*. Esta variable se correlaciona con los iniciadores LPSSR H01 A 10, NFAA 027 y NFAA 036.

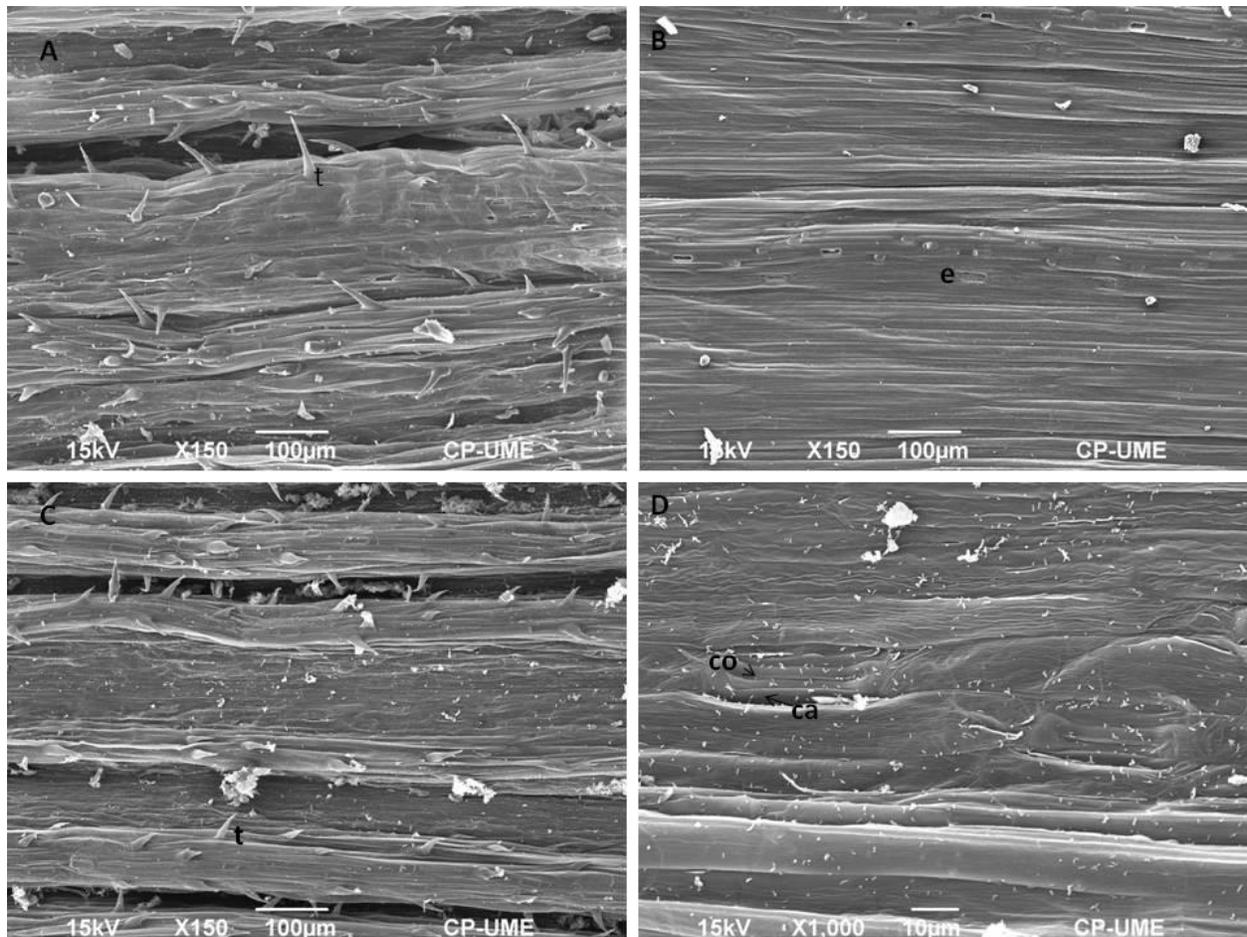


Figura 6. Micrografías Electrónicas de Barrido de la epidermis de *Festuca arundinacea*. A, C: haz, B y D envés. Tricomas(t), células oclusivas del estoma (co), células anexas del estoma (ca) .

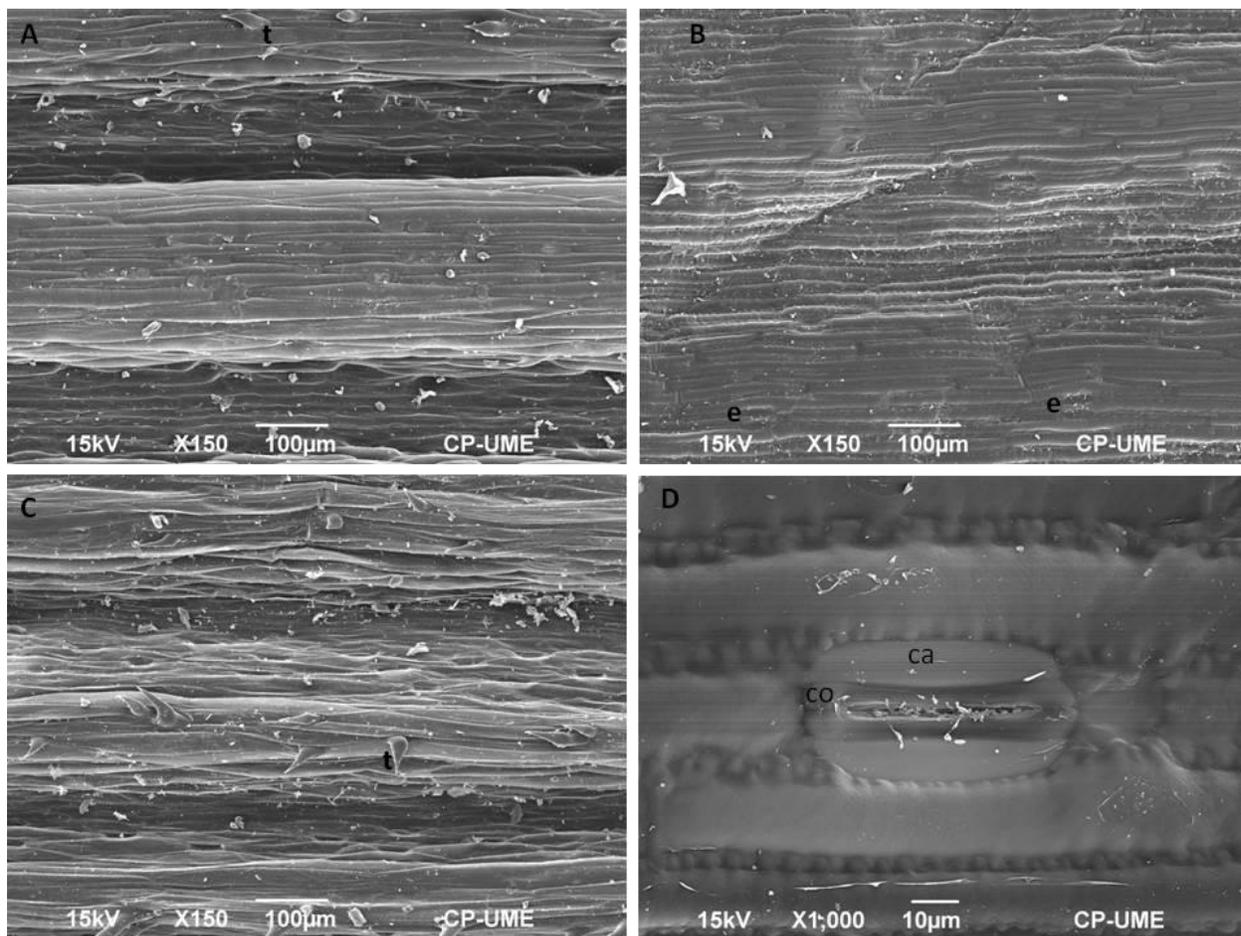


Figura 7. Micrografías Electrónicas de Barrido de la epidermis de *Lolium perenne*. A, C: haz, B y D envés. Tricomas (t), células oclusivas del estoma (co), células anexas del estoma (ca) .

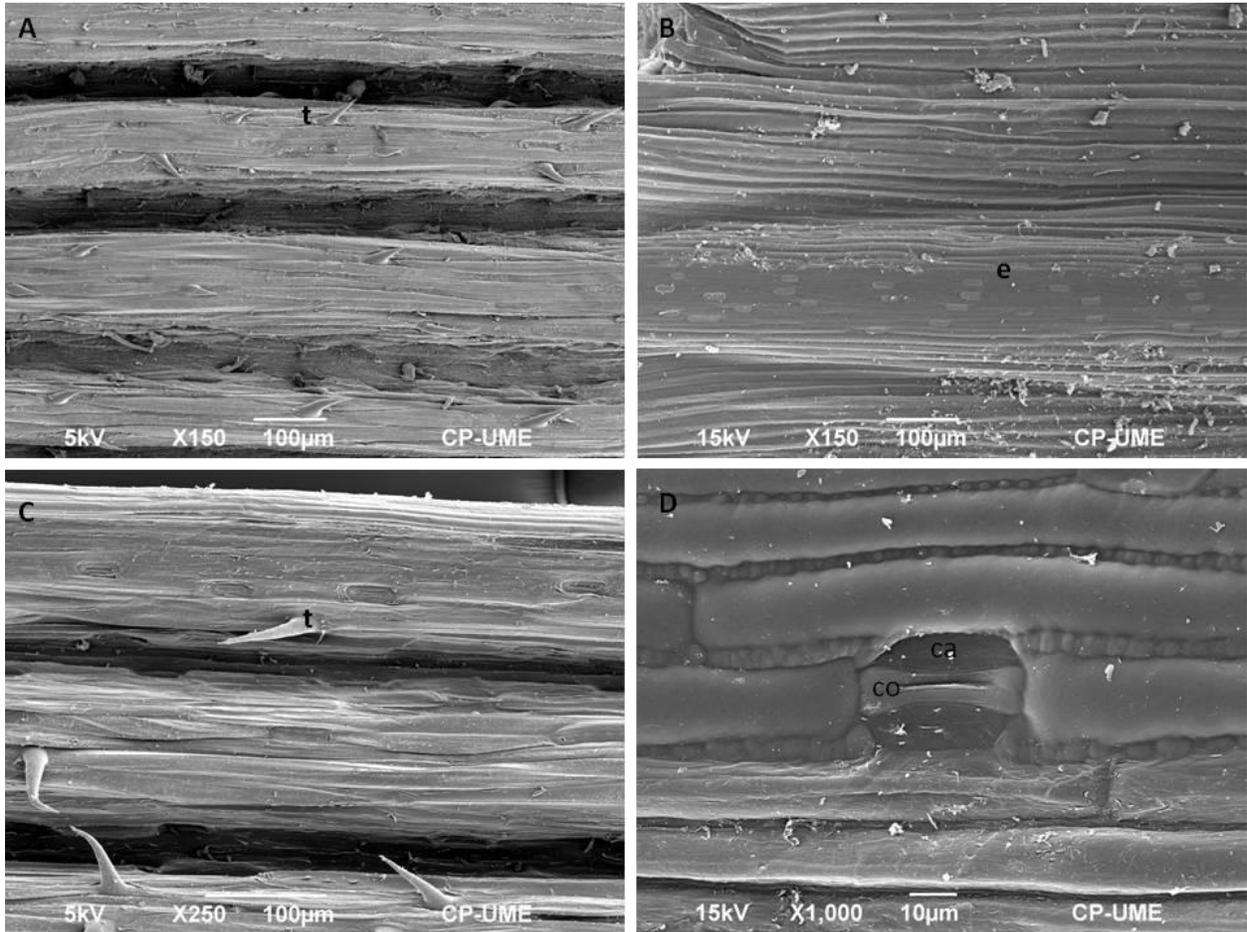


Figura 8. Micrografías Electrónicas de Barrido de la epidermis de *Festulolium*. A, C: haz, B y D envés. Tricomas (t), células oclusivas del estoma (co), células anexas del estoma (ca) .

Cuadro 9.- Variables que presentaron correlación entre los valores observados y los residuales

Variable 1	Variable 2	Valor de correlación	
		Observado	Residual
Crecimiento de lámina (cm día ⁻¹)	Número de láminas por tallo	0.74	0.65
Número de haces en corte transversal	Densidad de tricomas en haz (No. mm ²)	0.57	0.56
Densidad de estomas en haz (No/ mm ²)	Área del xilema (μm ²)	-0.56	-0.59
Densidad de estomas en envés (No/mm ²)	Área del floema (μm ²)	0.65	0.55
Distancia promedio entre haces (mm)	FDN (%)		0.77
Distancia promedio entre haces (mm)	FDA (%)		-0.80
No. de células buliformes	FDN (%)		0.53
FDN (%)	Área del xilema (μm ²)	-0.56	
FDA (%)	Área del xilema (μm ²)	0.62	
No. de haces vasculares en corte transversal	Área del floema (μm ²)	-0.52	
Densidad de estomas en haz (No mm ²)	Distancia promedio entre haces (mm ²)	0.50	
Densidad de tricomas en haz (No mm ²)	Área del floema (μm ²)	-0.59	

Cuadro 10.-Medias de las diferentes variables que mostraron correlación significativa con los diferentes iniciadores polimórficos

Marcador	Crecimiento de lámina (cm)	% FDA	% FDN	Número hojas	Contenido relativo lignina %	Densidad estomas envés	No Haces en corte transversal	Células buliformes Asociadas a nervaduras	Área Meta xilema	Área Proto Xilema	Densidad tricomas haz
LPSSR HO1 E10	13.73	9.40						3.54			
LPSSR H01 H06	-12.78										
LPSSR H01 A 10	10.18	8.02	-6.91	0.83	-10.55		3.00			5.49	
LPSSR K01 A11						-5.74			-8.95	-6.67	6.89
NFAA 002	-11.29	-8.36	7.80						-9.44		
NFAA 015						7.71			8.80	6.40	
NFAA 023						-5.74			-7.31	-5.40	
NFAA 024		10.09	-8.86			-5.24					6.21
NFAA 030						5.59					
NFAA 036	11.22	11.52	-11.15	0.98	-10.36						
NFAA 039						-4.59					
NFAA 048	-13.26	-4.57		-0.94							
NFAA 064		-9.40	11.86	-0.66							
NFAA 066		10.09	-10.94		-10.94		4.58				
NFAA 069						-6.92		-3.54	-11.50	-8.10	

8.- CONCLUSIONES

La semejanza determinante del *Festulolium* con *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne* no fue detectada en el presente estudio. Se encontraron variables que pueden expresarse diferente entre *Festuca*, *Lolium* y el *Festulolium* aunque estas variables estén correlacionadas entre sí (FDN, FDA y distancia promedio entre haces vasculares).

También fueron detectadas variables con un comportamiento similar entre las especies a pesar de que no se encuentran relacionadas de manera natural entre ellas, lo cual sugiere un efecto de parentesco entre el *Festulolium* con *Festuca* y con *Lolium*. Algunos marcadores moleculares se pueden asociar con determinadas características anatómicas o con la abundancia relativa de lignina (LPSSR H01 A10, NFAA 027 y NFAA 036)

9. REFERENCIAS

- Abdul H., Ireana Y., Bhat A., and Jawaid M. 2010. Cell wall ultrastructure, anatomy, lignin distribution, and chemical composition of Malaysian cultivated kenaf fiber. *Industrial Crops and Products* 31. 113–121
- Alderson J. and Sharp W. 1995. *Grass Varieties in the United States*. CRC Press. USA. 304 p.
- Alonso M. 1988. ¿Por qué las plantas producen metabolitos secundarios activos?. *Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes*. 26:10-16

- Amthor J. 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: A quantitative analysis. *Annals of Botany* 91: 673-695
- Anterola A. and Lewis N. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignifications and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294
- Arus P., and Moreno-González J. 1993. Marker Assisted selection. *In: Plant Breeding: Principles and Prospects*, Hayward, M.D., Bosemark, N.O and Romagosa, I. (eds). Chapman and Hall, London. pp:16-29
- Ayala F. 1984. Molecular polymorphism: How much is there and why is there so much? *Developmental Genetics* 4:379-391
- Baldwin R. and Allison M. 1983. Rumen metabolism. *Journal of Animal Science* 57:461-477
- Barrière Y., Ralph J., Méchin V., Guillaumie S., Grabber J., Argillier O., Chabbert B., and Lapierre C. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability II. *CR Biologies* 327: 847–860
- Birchman J. and Hodgson J. 1983. The influence of sward conditions on rates of herbage growth and senescence in mixed swards under continuous grazing management. *Grass and Forage Science* 38: 323-331
- Boerjan W., Ralph J. and Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519–546
- Boudet A. 2000. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 81–96

- Butler G. and Bailey R. 1973. Chemistry and Biochemistry of Herbage. Academic Press. New York, USA. 639 p.
- Casler D., Peterson R., Hoffman D., Ehlke E. and Rose-Fricke C. 2002. Natural selection for survival improves freezing tolerance, forage yield, and persistence of *Festulolium*. Crop Science 42: 1421-1426
- Casler M. and Walgenbach R. 1990. Ground cover potential of forage grass cultivars in binary mixtures with alfalfa at divergent locations. Crop Science 30: 825-831
- Casler M., Peterson P., Hoffman L., Ehlke N., and Rose-Fricke C. 2002. Natural selection for survival improves freezing tolerance, forage yield, and persistence of *Festulolium*. Crop Science 42: 1421-1426
- Casler M., Pitts P. and Rose-Fricke C. 2001. Registrations of cultivars. Crop Science 41:1365–1366
- Casler M. 2000. Advances in Agronomy. Academic Press. Wisconsin, USA. pp: 51-104
- Chapman G. 1992. An Introduction to the Grasses: Including Bamboos and Cereals. CAB International. USA. 111 p.
- Chaves A., Waghorn G., Brookes I., Woodfield D. 2006. Effect of maturation and initial harvest dates on the nutritive characteristics of ryegrass (*Lolium perenne* L.) Animal Feed Science and Technology 127:293–318
- Chen F., Kota P, Blount J. and Dixon R. 2001. Chemical syntheses of caffeoyl and 5-OH coniferyl aldehydes and alcohols and determination of lignin O-methyltransferase activities in dicot and monocot species. Phytochemistry 58:1035-1042

- Chesson A., Stewart C.S., Dalgarno K. and King T.P. 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. *Journal of Applied Bacteriology* 60:327–336
- Church DC. 1988. *The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition*. Ed. Prentice Hall. New Jersey. USA. 564 p.
- Cochran G. y Cox M. 2001. *Diseños experimentales*. Editorial Trillas. 5ª Reimpresión. México D. F., México. 661 p.
- Cornide M. 2002. *Marcadores Moleculares: Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección de las Plantas*. Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba. 366 p.
- Cui Y. and Yang W. 2009. Zero-inflated generalized Poisson regression mixture model for mapping quantitative trait loci underlying count trait with many zeros. *Journal of Theoretical Biology* 256 (2): 276–285
- Donaldson L. 2001. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57 : 859–873
- Esau K. 1985. *Anatomía de las Plantas con Semilla*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 729 p.
- Fahmi R., Bridgwater A., Donnison I., Yates N., Jones J. 2008. The effect of lignin and inorganic species in biomass on pyrolysis oil yields, quality and stability. *Fuel* 87: 1230-1240
- Forster F., Jones E., Kölliker R., and Smith K. 2001. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: *Molecular Breeding of Forage Crops*. Kluwer Academic Publishers. pp: 101-133

- Goujon T., Sibout R., Eudes A., MacKay J. and Jouanin L. 2003. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 677–687
- Grabber J., Ralph J., Lapierre C. and Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. *CR Biologies* 327: 455–465
- Grabber J., Hatfield R. and Ralph J. 2003. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in Maize. *Journal of agriculture and food chemistry*. 51: 4984-4989
- Grabber J., Ralph J., Lapierre C. and Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. *CR Biologies*: 455-465
- Grabber J., Schatz P., Kim H., Lu F. and Ralph J. 2010. Identifying new lignin bioengineering targets:1. Monoligno-substitute impacts on lignin formation and cell wall fermentability. *BMC Plant Biology* 10:114
- Hatfield R. and Fukushima S. 2005. Can lignin be accurately measured ? *Crop Science*. 45: 832-839
- Heitschmidt R. and Stuth J. 1991. *Grazing management : An Ecological Perspective*. Ed Timber, Oregon, EEUUAA. 259 p.
- Hodgson J. 1990. *Grazing Management: Science Into Practice*. Ed Longland scientific and technical, Inglaterra. 203 p.

- Hoisington D., Khairallah M. and González-de-León D. Laboratory protocols : CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2nd edition. México D.F., México 120p.
- Hoffman R. 2004. Organic Chemistry An Intermediate Text. Ed Hoboken. New Jersey, EEUUAA. ISBN 0471450243. 476 p.
- Humphreys M., Canter P., and Thomas H. 2003. Advances in introgression technologies for precision breeding within the *Lolium-Festuca* complex. Ann Applied Biology 143: 1–10
- Iiyama K., Lam T. and Stone B. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. Plant Physiology. 104:315–320
- Jung H., and Allen M. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. Journal of Animal Science 73: 2774-2790
- Jung H., 1997. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. Journal of nutrition 127: 810-813
- Könner C., 1991. Some often overlooked plant characteristics as determinants of plant growth: a reconsideration. Functional Ecology 5:162-173
- Kopecký D., Loureiro J., Zwierzykowski Z., Ghesquière M. and Doležel J. 2006. Genome constitution and evolution in *Lolium x Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*). Theoretical Applied Genetics 113:731–742
- Koreth J., O’Leary J. and McGee J. 2006. Microsatellite and genomic analysis. Review article. Journal of Pathology 178:39-48

- Lauvergeat V., Barre P., Bonnet M. and Ghesquière M. 2005. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses. *Molecular Ecology Notes* 5: 401–405
- Lowry D., Modliszweski J., Wright K. and Willis J. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 3009-3021
- Lycos T., Varga G. and Casper D. 1997. Varying degradation rates of total nonstructural carbohydrates: Effects on ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production and composition in high producing Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 80: 3341-3355
- Ma J., Yang G., Mao F. and Xu F. 2011. Characterization of anatomy, ultrastructure and lignin microdistribution in *Forsythia suspensa*. *Industrial Crops and Products*. 33. 358–363
- Martin N., Bouck A. and Arnold M. 2006 Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. *Genetics* 153: 965–977
- Martínez G. 1988. Diseños experimentales: Métodos y Elementos de Teoría. Ed Trillas. México D. F., México. 756 p.
- Marzorcca G. 1985. Taxonomía vegetal. IICA, San José Costa Rica. pp: 168-169
- May P., Ojeda U., Gamboa M., Borgez L. and Escalante F. 1996. Metabolitos bioactivos producidos por hongos y plantas. *Revista Lationamericana de Química* 24 (3) : 162-169
- Mc Murry J. 2008. Química Orgánica. Ed Cengage, Distrito Federal, México. 1224 p.

- Moody D. 2001. Genomic techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *Journal of Animal Science* 79:128–135
- Morrison I. 1973. Isolation and analysis of Lignin-carbohydrate complexes from *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry* 12: 2979-2984
- Morrison I. 1974. Lignin-carbohydrate complexes from *Lolium perenne*. *Phytochemistry* 13: 1161-1165
- Motic Images Plus. Version 2.0. 2004. Motic China Group Co. Ltd. 32 p.
- Mullis K. and Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Emzymology* 55:335-350
- Muslera E. y Ratera C. 1991. Praderas y Forrajes, Producción y Aprovechamiento. 2^a ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 674p.
- National Research Council. 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th. Ed National Academic Press .Washington, DC. EEUUAA. 234 p.
- Nielsen C. 1995. Animal Evolution. Ed Oxford University press. EEUUAA. 431 p.
- Nishitani K. 2002. A genome-based approach to study the mechanisms by which cell-wall type is defined and constructed by the collaborative actions of cell-wall-related enzymes. *Journal of Plant Research* 115:303–307
- Önerud H., Zhang L., Gellerstedt C. and Henriksson G. 2002. Polymerization of monolignols by redox shuttle mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *The Plant Cell* 14: 1953–1962
- Opitz W., Boberfeld V. and Banzhaf K. 2006. Yield and Forage Quality of Different *Festulolium* Cultivars in Winter. *Journal Agronomy and Crop Science* 192: 239—247

- Ortega M. 1987. Factores que afectan la digestibilidad del alimento en rumiantes. Estudio recapitulativo. *Revista Veterinaria México* 18:55-60
- Pociecha E., Płaz A., Janowiak F., Janeczko A. and Zwierzykowski Z . 2008. Physiological basis for differences in resistance to *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels and Hallet in two androgenic genotypes of *Festulolium* derived from tetraploids F1 hybrids of *Festuca pratensis* x *Lolium multiflorum* (*Festulolium*). *Journal of Phytopathology* 156: 155–163
- Posselt U. and Bolaric S. 2000. Genetic diversity among populations of *Lolium perenne* based on RAPD markers. Second International Symposium of Molecular Breeding of Forage Crops, Australia. 94p.
- Raes J., Rohde A., Holst J., Van de Peer Y. and Boerjan W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:1051–1071
- Ralph J., Guillamie S., Grabber J., Lapierre C. and Barriere Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall biosynthesis and degradability. III. Toward a forage grass ideotype. *CR Biologies* 327: 467-479
- Ramírez H. y Roca W. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura*. CIAT. Colombia. pp: 825-851
- Ruel K., Montiel D. and Joseleau J. 2002. Alterations of lignin biosynthesis have tissue-specific impact on cell wall formation. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* 21:13-19

- Russell J. and Wilson D. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *Journal of Dairy Science* 79:1503-1509
- Salmén L. Micromechanical understanding of the cell-wall structure. 2004. *CR Biologies* 327: 873–880
- Salisbury F. y Ross C. 2000. *Fisiología de las Plantas Vol. 2: Bioquímica Vegetal*. Ed Thompson-Paraninfo, Madrid, España. 212 p.
- Schoth H. y Weihing R. 1980. Los ballicos. In: *Forrajes*. Hughes H., Heath M. y Metcalf B. (Eds) Editorial CECOSA. México. pp: 343-349
- Shoonhoven L., van Loon J. and Dicke M. 2005. *Insect-Plant Biology: From Physiology To Evolution*. Ed Oxford university press. EEUUAA. 421 p.
- Stevenson F. 1980. *Anatomía Vegetal*. Ed Limusa, México. 209 pp
- Van Soest P., Robertson J. and Lewis B. 1991. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle . *Journal of Dairy Science* 74: 3586-3597
- Van Soest P. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ed. Corvallis O & B, Ithaca, NY. EEUUAA. 374 p.
- Van Tuyl J., Van Diën M., Van Creij J. and Bino M. 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses .*Plant Science* 74 (1): 115-126
- Vogel J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 11:301–307

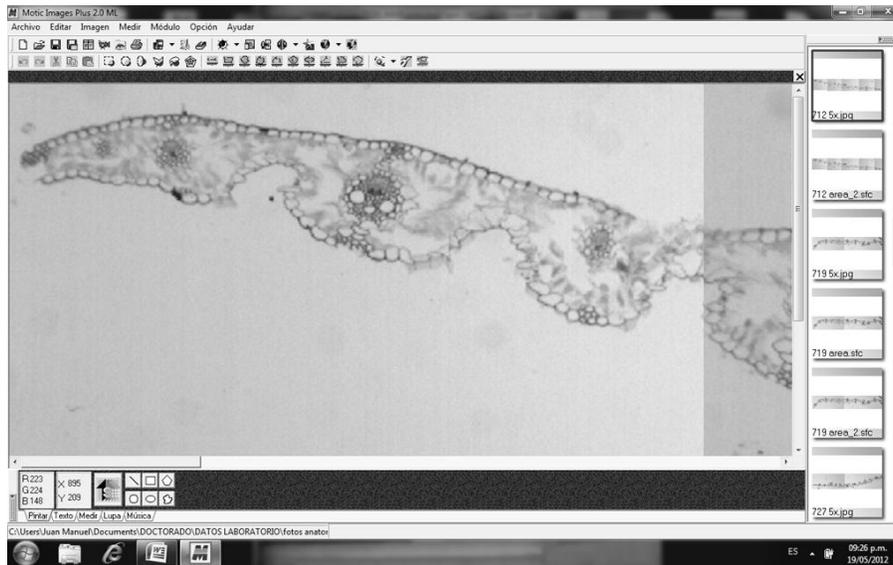
- Waugh R. y Powell W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. TIBTECH 10:186-191
- Williams J., Kubelik A., Livak K. and Tingay S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535
- Xie M., He B. and Goh T. 2001. Zero-inflated Poisson model in statistical process control. Computational Statistics & Data Analysis 38: 191–201
- Zavaleta-Mancera H. and Engleman M. 1994. Anatomy of the ovule and seed of Manilkara zapota (L.) Van Royen (Sapotaceae). Phytomorphology 44:169-175
- Zhang Y., Mian A. and Bouton J. 2006. Recent molecular and studies on stress tolerance of forage and turf grasses. Crop Science 46: 497-511
- Zwierzykowski Z., Kosmala A., Zwierzykowska E., Jones N., Joks W., and Bocianowski J. 2006. Genome balance in six successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* _ *Lolium perenne*. Theoretical and Applied Genetics 113: 539–547

ANEXO

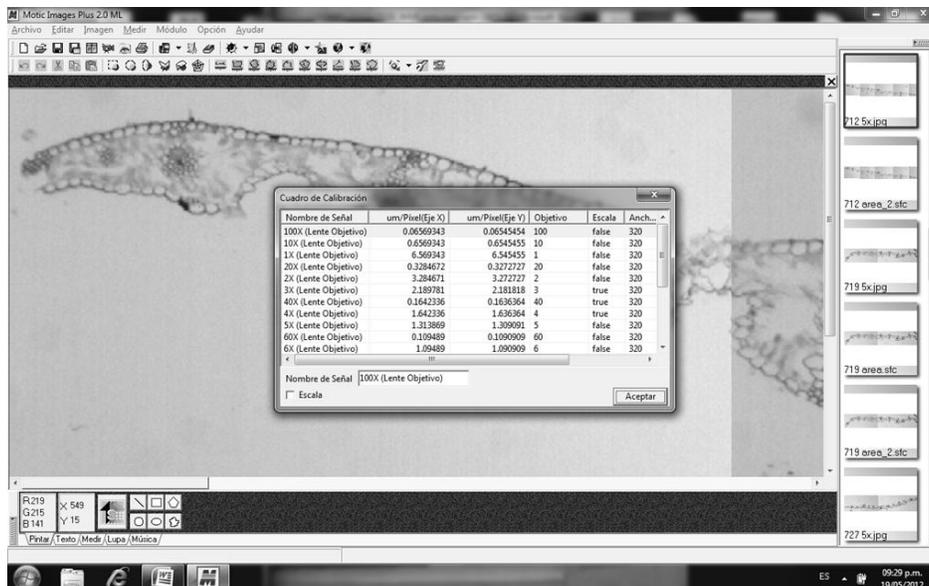
Medición de la abundancia relativa de lignina con análisis de imágenes

Con el programa Motic Image Plus (2004), se siguió la siguiente metodología:

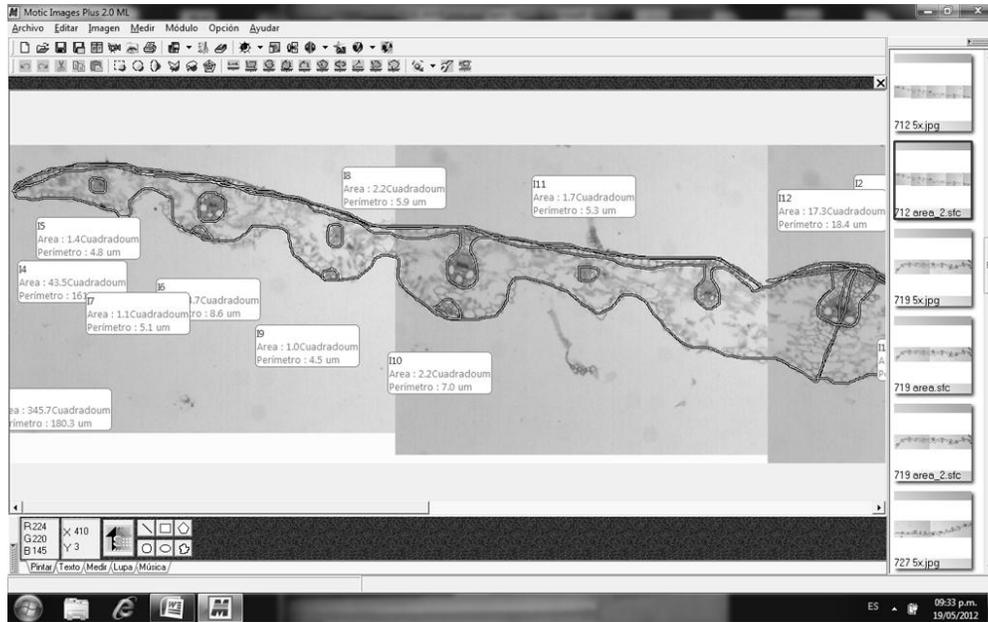
1.- Abrir la imagen del corte transversal, obtenida en el microscopio compuesto (5x)



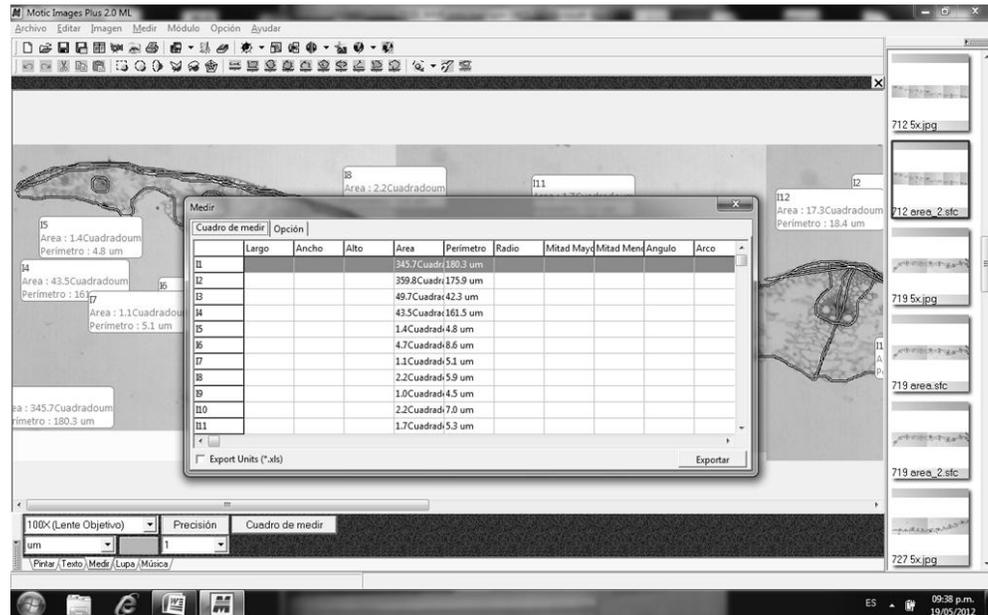
2.- Calibrar el cálculo del área (píxeles o μm^2) con la opción “calibrar”, seleccionando el objetivo con el cual fue capturada la imagen



3.- Con la opción “polígono irregular” se selecciona el área lignificada y aparecerán los recuadros con el área y perímetro de la selección, se recomienda hacer la selección de segmentos pequeños en lugar de uno solo de gran tamaño.



4.- En la pestaña “medir” se selecciona la opción “cuadro de medir” en donde aparecerá el área de todas las mediciones realizadas



5.- Estos valores se exportan a una hoja de cálculo (extensión .xls) en donde se pueden realizar los cálculos del área total de la lámina, área lignificada y determinar la abundancia relativa (%).