

EFFECTO DEL CULTIVO *in vitro* EN LA MICROSPOROGÉNESIS DE DOS CULTIVARES DE PASTO LLORÓN

Nora Frayssinet,¹ Susana Cardone¹ y Viviana Echenique²

¹UBA, Buenos Aires. ²UNS, Bahía Blanca, Argentina.

Introducción

Entre las especies cultivadas de *Eragrostis* se encuentra una de notable aplicación como forrajera y consolidadora de suelos erosionables. Se trata del pasto llorón, *Eragrostis curvula*. En Argentina, el área de mayor concentración del cultivo obedece a regiones de climas subhúmedos y semiáridos (1). El cultivar *Morpa* se caracteriza por su buena palatabilidad, mientras que *Kromdraai* posee excelente vigor y producción de forraje.

La prevalencia del tipo reproductivo apomítico en esta especie limita los métodos convencionales de mejoramiento, por ello el cultivo *in vitro* aparece como una herramienta atractiva que puede generar variabilidad. En monocotiledóneas se ha observado inestabilidad cromosómica en regenerantes obtenidas a partir de inflorescencias y embriones inmaduros. Las mismas podrían estar relacionadas con variantes agronómicas factibles de ser utilizadas en especies como la anteriormente citada.

El estudio del comportamiento de cromosomas meióticos en plantas regeneradas provee un medio para revelar cambios numéricos y estructurales, particularmente en especies con cromosomas pequeños. Además este nivel de estudio resulta importante pues dado que el cultivo puede ocasionar quimeras es preciso determinar si el genotipo deseable se transmitirá a la progenie (2). Aunque en especies apomíticas como esta, el gameto masculino no interviene en la fecundación pero dispara el mecanismo de desarrollo del embrión (pseudogamia), alteraciones en la cantidad y tamaño del grano de polen podrían afectar la producción de semilla.

El objetivo de este trabajo fue estimar el impacto del cultivo *in vitro* en la microsporogénesis de dos cultivares de pasto llorón de diferentes niveles de ploidía.

Materiales y Métodos

Segmentos de inflorescencias jóvenes de los cultivares *Kromdraai* y *Morpa* se cultivaron en medio MS con diferentes combinaciones de 2,4-D (1, 2, 4, 6 u 8 mg/L) y BAP (0,01; 0,1; 1; 2 o 5 mg/L). Las plantas regeneradas fueron cultivadas en invernáculo. Como control se utilizó la planta donadora de explanto. Para los análisis meióticos se utilizaron inflorescencias inmaduras de diez plantas seleccionadas al azar. Las panojas se fijaron en Clarke y se colorearon por Feulgen.

Resultados y Discusión

La respuesta a la regeneración resultó ser diferencial en los dos cultivares, presentando mayor número de plantas regeneradas el cv. *Kromdraai* con respecto a *Morpa*. En este último cultivar, sobre 32 plantas regeneradas, el 22 % nunca floreció, el 34 % lo hizo el primer año y el 45 % dos años después. En el cv. *Kromdraai* sobre 88 plantas los correspondientes valores de floración fueron el 95,0 % para el primer año 100 % en los dos años sucesivos. Las dos plantas utilizadas como testigo poseen distintos comportamiento meiótico. Mientras *Morpa* (4x, apomítica obligada) presenta normalidad en todo el proceso, *Kromdraai* muestra un fenotipo meiótico con características propias de su nivel de ploidía (6x) y su modalidad reproductiva (apomixis facultativa). Tales características son: presencia de univalentes, disyunción precoz en MI y cromosomas rezagados en AI con un incremento en las plantas regeneradas del 20 al 59 %. Los correspondientes efectos registrados en las regenerantes primarias del cv. *Morpa* fueron: alteraciones en la condensación de la cromatina (6-52 %); citomixis (16, 5-24 %); desinapsis (14 al 25 %) y fallas en la formación del huso (14-65 %). Estos eventos condujeron a la formación de granos de polen de tamaños diferentes. También se presentaron en algunas plantas del cultivar *Morpa* anomalías no cuantificadas como degeneración de los meiócitos, fenómeno que determinó una disminución en la cantidad de polen y deposición aberrante de calosa, lo que impidió la formación de microsporas. El cultivo *in vitro* generó en la mayoría de las plantas regeneradas del cv. *Kromdraai* un incremento de las particularidades del testigo, no observándose nuevas anomalías. En *Morpa* se produjeron durante la microsporogénesis variaciones que no se encontraban presentes en la planta donadora de explanto, sumamente estable en este carácter. Estas diferencias podrían atribuirse al nivel de ploidía y al modo reproductivo. Estos datos explicarían la mayor variabilidad encontrada en el cultivar *Kromdraai*. Se trataría de un genotipo capaz de tolerar mayores desbalances genéticos que los restantes, pudiendo esto estar relacionado con su mayor nivel de ploidía. Esto puede haber contribuido a la mayor variabilidad encontrada en este cultivar (además de la contribución aportada por la sexualidad), ya sea en forma natural o inducida, la

1. Covas G. El pasto Llorón, su biología y manejo. (Fernández O, Brevedan R y Gargano A eds) 1991;1-2:1-17.

2. Peschke V, Phillips R. Adv. Genet 1992;30:41-75.

mejor respuesta al cultivo *in vitro* y la excelente capacidad de florecer y producir semilla de los regenerantes. El particular modo reproductivo permitió la perpetuación de los nuevos citotipos una vez establecidos.

Por lo cual se concluye que el método es válido para ampliar la variabilidad en complejos apomicticos como el pasto llorón, generando cambios en cultivares estables, como *Morpa*, e incrementando la capacidad natural de producirlos, como en *Kromdraai*.

GENETIC ENGINEERING OF CEREALS: TRANSGENE EXPRESSION IN MAIZE AND WHEAT

RH Vallejos, ML Álvarez, GD Cervigni, CM Heisterborg, MM Morata, JL Morre, JP Ortiz, CM Palena, HR Permingeat, RA Ravizzini, GL Rossi and MA Spitteler

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI) (CONICET, Fundación M Lillo, Universidad Nacional de Rosario) Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.

Introduction

Maize and wheat are two of the most important crops plowed around the world. The potential of plant breeding is limited by the existent incompatibility of sexual crossing within different species. Plant genetic engineering offers to overcome the incompatibility barrier by mean of the recombinant DNA technology. Methodologies development to the genetic transformation of plants, including cereals, implies to have available a complementation tool for traditional plant breeding, that makes easier to improve the grain production in quantity as well as in quality. In this communication, we report the stable transformation of maize and wheat using two home-made microprojectile accelerators with selectable markers, reporter and agronomic interest genes.

Materials and Methods

Embryogenic calli from commercial cultivars of maize and wheat were transformed by using either a gun-power (1) or a helium-drive microprojectile accelerator, both of them built at CEFOBI. Gold or tungsten microparticles were coated with plasmids containing either the hpt or bar gene as selectable markers and the uidA gene as reporter. In addition, genes of interest-agronomic traits such as resistance to herbicides, insects and fungi were also introduced in the same plasmid or, more frequently, by co-transformation. Resistant calli to a selective agent

were identified after two months of culture and resistant plantlets were regenerated.

Transgenic plants were detected by PCR and Southern blots and enzymatic activity of the introduced genes.

Results and Discussion

We were able to reach the stable transformation of wheat and maize using two microprojectile accelerators developed and built at our laboratory. Molecular analyses of regenerated resistant plants revealed a transformation efficiency higher than 5 % (transgenic plants per bombarded explant) in the case of wheat (2) and higher than 1 % in the case of maize. When a mixture of two plasmids was used, co-transformation efficiency was between 40 and 60 %. *In vitro* and *in vivo* activity of the enzymes, products of the introduced genes, was detected in transgenic plants of different generations. Transgenes were stably integrated into the plant genomes and transmitted to the (wheat) and fourth (maize) generation following the Mendelian fashion. Transformation of wheat was achieved with varieties and hybrids with genes expected to improve bread-making and nutritional quality, and resistance to rust and *Fusarium*. Transformation of maize was reached using the F1 hybrid A188/B73 and a commercial interest one, which shows the attractive possibility of introducing agronomic traits into commercial germplasm.

1. Reggiardo MI, Arana JL, Orsaria LM, Permingeat HR, Spitteler MA, Vallejos RH. Transient transformation of maize tissues by microprojectile bombardment. *Plant Sci* 1991;75:237-243.

2. Ortiz JP, Reggiardo MI, Altabe S, Cervigni GD, Spitteler MA, Morata MM, Elias FE, Vallejos RH. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep* (in press) 1995.