

Capítulo XXXIV

Presente y futuro de la biotecnología en gramíneas y leguminosas forrajeras

Sunshine C. Florio del Real

El mejoramiento genético convencional ha tenido un gran impacto en el incremento del rendimiento, calidad y resistencia a plagas y enfermedades en cereales y oleaginosas. En las especies forrajeras los progresos han sido significativamente menores, especialmente en lo referido al rendimiento (Evans, 1998; Vargas-Sánchez & Estrada-Álvarez, 2011). Esto obedece a varios factores, como al proceso más reciente de domesticación, la complejidad de objetivos, problemas reproductivos, de mercado y las menores inversiones realizadas en el área. Las herramientas biotecnológicas desarrolladas en los últimos 20 años ofrecen interesantes alternativas que pueden contribuir a mejorar esta situación (López *et al.*, 2013).

Es importante describir los aportes de las herramientas biotecnológicas utilizadas para ampliar la variabilidad genética como el cultivo de tejidos o micropropagación, la variación somaclonal, la hibridación somática, la transformación genética, la utilidad de los marcadores moleculares para la selección de caracteres agronómicos complejos y el rol de la genómica para la identificación de genes de interés para los cultivos forrajeros (Snaydon, 1985; Díaz *et al.*, 2004).

MEJORAMIENTO TRADICIONAL

De acuerdo a lo establecido por Valerio *et al.* (2013), la ganancia genética de los cultivos forrajeros, en términos de materia seca cosechada, ha sido muy baja, con una tasa promedio del 4% por década, debido a distintos factores, tales como:

1. La domesticación reciente o ausente, que imposibilita la utilización de especies con alto potencial forrajero debido a la escasa o no rentable producción de semilla de deficiente germinación;
2. El producto que se consume (hojas) no es el mismo que se comercializa (semillas);
3. Sistemas reproductivos complejos que garantizan la alogamia, como la autoincompatibilidad o la presencia de una fuerte depresión por endocría, dificultan la

- propagación y la conservación de la identidad de los genotipos e imposibilitan la obtención de líneas endocriadas;
4. En especies perennes, es necesario realizar evaluaciones por 3 ó 4 años, en especial porque el rendimiento del primer año no puede predecir el rendimiento acumulado;
 5. La producción de forraje no necesariamente predice la producción secundaria (carne, leche o lana) y
 6. Se requieren menores inversiones en el mejoramiento de especies forrajeras con respecto al resto de los cultivos agrícolas.

TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS

En los últimos años, la biotecnología ha aportado varias metodologías para complementar los programas de mejoramiento, como el cultivo de tejidos, la hibridación somática, la variación somaclonal, genómica, marcadores moleculares, transgénesis ó transformación genética, entre otros (Figura 1). Esta última resulta muy promisoría, especialmente para incrementar la calidad del forraje, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y para manipular el crecimiento y desarrollo (Spangenberg *et al.*, 2011).

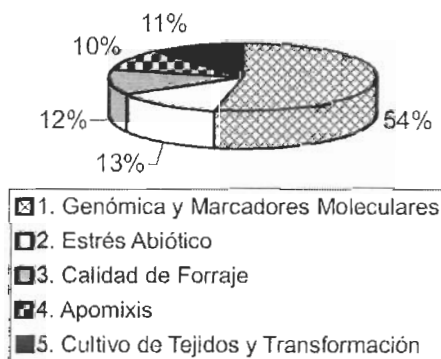


Figura 1. Aportes realizados por cada una de las metodologías biotecnológicas a la producción de gramíneas y leguminosas forrajeras (Fuente: Florio *et al.*, 2013a).

Entre algunas de las técnicas y/o metodologías biotecnológicas se encuentran:

Cultivo de tejidos o micropropagación

La denominación de micropropagación se debe al diminuto tamaño del propágulo empleado durante el proceso; sin embargo, la principal característica que diferencia a esta técnica, es que se realiza bajo condiciones asépticas. El cultivo consiste en aislar cualquier parte de una planta (explante) y aportarle todas las condiciones físicas (luz, temperatura y humedad) y químicas (sales inorgánicas, pH, reguladores del crecimiento, vitaminas, aminoácidos, proteínas, carbohidratos y agua), adecuadas para inducir las respuestas morfogénicas de los propágulos (Bernadett, 2000; Michelangeli, 2000; Florio *et al.*, 2013a).

Este tipo de propagación se caracteriza por tener la capacidad de generar gran cantidad de plantas en corto plazo, libres de algunas enfermedades ocasionadas por organismos patógenos (Florio, 2007; 2011). Se han desarrollado protocolos exitosos de regeneración para un amplio rango de especies gramíneas y leguminosas forrajeras a partir de órganos (ejemplo pecíolos, hojas), tejidos y células.

La utilización de explantes como embriones, semillas e inflorescencias es frecuente para la inducción de callo (Figura 2). Las semillas y embriones maduros poseen la ventaja de hallarse disponibles durante todo el año; sin embargo, si son sexuales segregan y no son clones de individuos destacados, por lo cual se han ideado protocolos partiendo de la semilla (Cholo & Bolívar, 2011). En estos casos, se utiliza una semilla o embrión para iniciar una línea celular a partir de la cual se realizarán todas las manipulaciones de interés. Las vías de regeneración son la embriogénesis somática y la organogénesis (Florio *et al.*, 2013a).

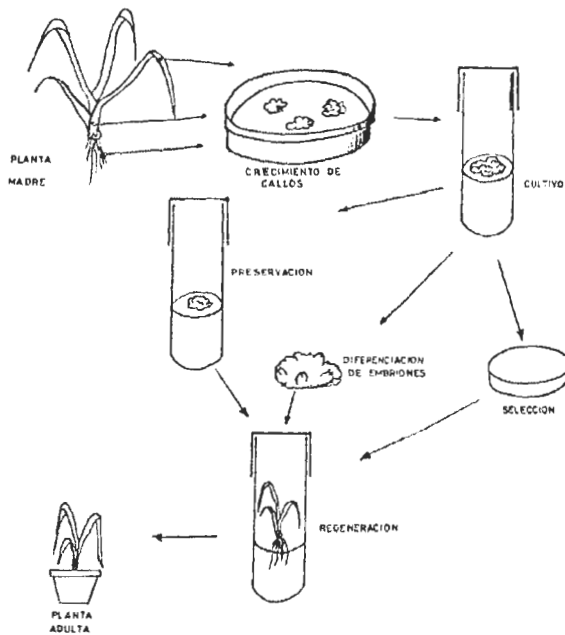


Figura 2. Técnica de cultivo de callos en gramíneas forrajeras (Fuente: Medrano & Pol, 1985; p. 59).

La embriogénesis somática consiste en la formación, diferenciación y desarrollo de embriones, a partir de células que no son el producto de una fusión gamética; estos embriones somáticos son estructuras bipolares, ya que presentan tanto ápice caulinar como radicular, que surgen, por lo general, a partir de una sola célula (Gómez, 1998; Grapin *et al.*, 1998). La embriogénesis ha sido orientada al mejoramiento genético y a la propagación masiva de leguminosas y gramíneas forrajeras, para evaluar la posibilidad de obtención de semillas sintéticas. Para iniciar los cultivos embriogénicos se han empleado diferentes partes de la planta, como explantes: inflores-

cencias (flores masculinas y femeninas inmaduras), bases de las hojas jóvenes, fragmentos del cormo sin primordios meristemáticos, secciones de frutos, ápices florales y microcormos de plantas *in vitro* (Trujillo, 1994).

A través de la técnica de cultivo de ápices caulinares ó meristemas se producen plántulas asépticas, las cuales se originan de brotes axilares aislados del ápice vegetativo. El ápice se cultiva en un recipiente que contiene un medio nutritivo artificial, se mantiene bajo condiciones controladas y es inducido a producir brotes adventicios por eliminación de la dominancia apical y por el uso adecuado de reguladores de crecimiento (Figura 3). La utilización de meristemas minimiza el riesgo de inestabilidad genética que representan los callos, por lo cual se han empleado para la conservación de germoplasma y para la micropropagación de géneros como *Lolium*, *Festuca* y *Dactylis* (Trujillo, 2008).

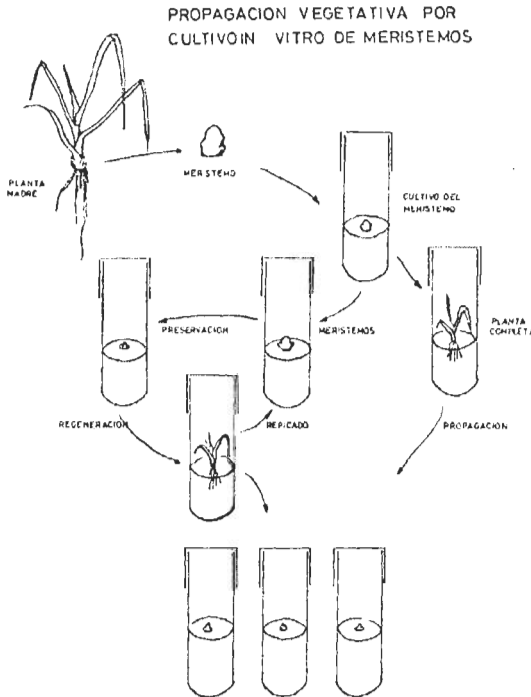


Figura 3. Técnica de propagación *in vitro* de meristemas en gramíneas forrajeras (Fuente: Medrano & Pol, 1985).

Los meristemas resultan además un método efectivo para la eliminación de virus, logrando sólo o combinado con quimioterapia la erradicación del virus del mosaico del tabaco (TMV) en *Trifolium pratense* y *Lolium multiflorum* (Ortíz, 2003). Este método permite la preservación a largo plazo en nitrógeno líquido (-196°C) o el almacenamiento a corto plazo en condiciones de crecimiento limitado para gramíneas (Spangenberg *et al.*, 2011) y leguminosas (Ortíz, 2003; Díaz *et al.*, 2004; Trujillo, 2008).

Las suspensiones celulares corresponden al cultivo de células que no están diferenciadas ni organizadas en forma de tejidos y se encuentran “suspendidas” en un medio líquido, donde se mantienen y se dividen constantemente. De estas suspensiones se originan embriones somáticos que son aislados y transferidos a medios de germinación sólidos, con una eficiencia de 20 a 36% en la recuperación de plantas completas (Florio *et al.*, 2013a). Representan un método adecuado de la transformación por biobalística, para la propagación clonal de un genotipo determinado y como fuente de protoplastos. Se han utilizado en *Dactylis glomerata*, *Festuca* spp. *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Elymus gigantea*, *Paspalum* sp, *Pennisetum purpureum*, *Phragmites communis* y *Eragrostis curvula* (Echenique *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2004).

Los protoplastos son células cuya pared celular ha sido digerida por acciones enzimáticas, los cuales desde los años 70's han sido usados en programas de cruzamientos y mejoramiento genético, básicamente es el cultivo de células sin pared celular (Matsumoto & Oka, 1998). Al igual que en otras especies de monocotiledóneas, sólo con la utilización de células embriogénicas en suspensión se han podido aislar protoplastos con un alto potencial embriogénico, es decir, capaces de producir embriones que darán origen a una nueva planta completa (García *et al.*, 1998; Trujillo, 2008). Los protoplastos se utilizan para la obtención de híbridos somáticos y para la transformación genética, logrando plantas en *Festuca* spp, *Lolium* spp, *Bromus inermis*, *Dactylis glomerata*, *Paspalum dilatatum*, *Pennisetum* spp y *Poa pratensis*. En *Medicago sativa* se han obtenido protoplastos a partir de raíces, de cotiledones y de hojas (Borges *et al.*, 2007).

El cultivo de anteras y micrósporas consiste en producir plantas haploides, mediante la inducción de la embriogénesis a partir de microesporas o de granos de polen inmaduros. Estas plantas pueden emplearse en programas de mejoramiento para seleccionar características, o bien, para desarrollar líneas homocigóticas para la producción de híbridos en especies incompatibles entre sí (Florio *et al.*, 2013a).

En el caso particular de las anteras, la fase recomendable para que se produzcan plantas haploides es la fase de microesporofito uninucleado (Hardy & García, 1994). Esta metodología se ha utilizado para acelerar el proceso de mejoramiento a través de la producción de haploides en *Festuca arundinacea*, *Festuca pratensis*, *Bromus inermis*, *Dactylis glomerata*, *Trifolium alexyrum*, *Medicago sativa*, *Avena sativa*, *Medicago denticulata*, *Lolium* spp y *Poa pratense* (Lascano, 2002). Un eficiente sistema de producción de haploides por cultivo de micrósporas permite obtener alrededor de 10.000 embriones de cebada en tiempos relativamente cortos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2004).

Variación somaclonal

Puede surgir de la variación preexistente en las células del explante o inducirse durante el proceso de cultivo. Se ha observado variación cromosómica en *Festuca arundinacea* y *Eragrostis curvula*, albinismo en *Lolium perenne* y *Festuca pratense*, cambios en la morfología de la planta, forma y tamaño de hoja y espiga, desarrollo floral, vigor y supervivencia en somaclones de *Lolium* y *Festuca arundinacea* y disturbios reproductivos en esta misma especie (Aguado-Santacruz *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2004).

El desarrollo de nuevos cultivares por esta técnica involucra un balance entre la cantidad de variación inducida y el mantenimiento de los caracteres agronómicos del cultivar. Como ejemplo, puede citarse el caso de somaclones de pasto bermuda que dieron origen al cultivar Brazos-R3, que es resistente a la oruga militar y la repelencia en *Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Brachiaria brizantha* y *Cenchrus ciliaris* sobre larvas de garrapata (*Amblyomma cajennense*) (Del Hoyo et al., 2013). Si bien desde el punto de vista práctico la variación somaclonal no resulta una técnica muy eficiente en planes de mejoramiento constituye una excelente herramienta para estudios de estrés genómico (Borges et al., 2007).

Hibridación somática

Se utiliza para sortear barreras precigóticas para la hibridación, transferir resistencia a enfermedades o tolerancia a estreses y obtener citoplasmas híbridos (cíbridos). La hibridación asimétrica y cibrización sirve como puente para la transferencia de genes individuales. Se han obtenido híbridos intergenéricos entre *Panicum maximum* (+) *Pennisetum americanum*, *Triticum monococcum* (+) *Pennisetum americanum*, *Festuca arundinacea* (+), *Lolium multiflorum*, entre otras. El primer caso de regeneración de plantas completas de híbridos intergenéricos en gramíneas fue el *Festulolium* (Spangenberg et al., 2011).

Transformación genética

Las primeras gramíneas forrajeras transgénicas se obtuvieron por transformación de protoplastos. En la actualidad, el bombardeo de cultivos embriogénicos con microproyectiles y con *Agrobacterium tumefaciens* representan los métodos más utilizados para la obtención de gramíneas y leguminosas transgénicas, respectivamente. Entre los caracteres «blanco» para la transformación, se incluyen la calidad del forraje, resistencia a plagas, enfermedades y estreses abióticos y la manipulación del crecimiento y desarrollo (Florio et al., 2012).

La calidad del forraje es muy importante. Un incremento del 1% en la digestibilidad *in vitro* del forraje conducen a un aumento promedio del 3,2% de peso vivo. Entre los sub-caracteres de calidad se encuentran la lignina, los fructanos y proteínas de alto valor nutritivo. En cuanto a la lignina, existe una correlación negativa entre su contenido y la digestibilidad de la materia seca en gramíneas y leguminosas. Por ello se han desarrollado técnicas moleculares basadas en la regulación negativa de su biosíntesis, introduciendo genes en sentido o antisentido que codifican para enzimas clave en este proceso, como la o-metil transferasa del ácido cafeico (COMT), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), entre otras. Este enfoque se ha aplicado en *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* y *Medicago sativa* (Spangenberg et al., 2011).

Los fructanos están involucrados en las respuestas de las plantas al estrés ambiental, como la sequía y el frío. Su acumulación en gramíneas evita las reducciones en la digestibilidad durante el verano. Los levanos, fructanos sintetizados por ciertos microorganismos, se han expresado en *Lolium multiflorum*, *Trifolium repens* y *Medicago sativa*, mediante la introducción de genes como el de la fructosiltransferasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis* y de otros microorganismos (Díaz et al., 2004). Por otro lado, la obten-

ción de plantas transgénicas capaces de producir proteínas no degradables por la flora ruminal representa una alternativa a los suplementos de metionina y cisteína post-ruminales. Estos aminoácidos son esenciales para el crecimiento de la lana en ovinos. Han sido aislados genes que codifican para proteínas de este tipo, caracterizados e introducidos en plantas de festuca alta, alfalfa, trébol blanco y subterráneo. Estas proteínas serían, ovoalbúmina de pollo, albúmina de arveja y de semilla de girasol.

Resistencia a estreses bióticos

Se han introducido genes que codifican para proteínas antifúngicas (AFPs) como quitinasas en pasto miel, glucanasas y quitinasas en alfalfa y otras AFPs (identificadas en ensayos *in vitro*) en trébol subterráneo. La expresión de genes virales completos o parte de ellos confiere una protección efectiva contra distintos virus que afectan a los forrajes, como ha sido el caso de genes de la cápside viral en trébol blanco, trébol rojo y raigrás perenne (Trappe *et al.*, 2011).

Tolerancia a estreses abióticos

La toxicidad por aluminio, que representa un obstáculo severo en suelos ácidos, puede ser contrarrestada por la sobreexpresión de la enzima malato deshidrogenasa, que incrementa la síntesis de ácidos orgánicos y confiere tolerancia al aluminio en alfalfa transgénica. La introducción en alfalfa de genes de enzimas que neutralizan los radicales libres que se forman en situaciones de salinidad, frío o sequía, como la superóxido dismutasa (SOD), permiten una mayor supervivencia a campo en situaciones de estrés (Colomba, 2011).

MARCADORES MOLECULARES

Los polimorfismos amplificados al azar (RAPDs) fueron los primeros marcadores moleculares utilizados en forrajeras (Díaz *et al.*, 2004). En la actualidad, los más usados son los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) y los polimorfismos en las secuencias simples repetidas (SSRPs). En un futuro cercano prevalecerán los marcadores basados en el polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) (Florio *et al.*, 2012).

Entre los objetivos para su utilización se encuentra la diferenciación de cultivares, la certificación de pureza varietal, la selección de parentales divergentes en caracteres específicos para obtener poblaciones de mapeo, el monitoreo de la estabilidad genética de especies que se propagan vegetativamente y por apomixis, la evaluación de la estructura poblacional de pasturas naturales y artificiales y la discriminación entre especies similares (Forster *et al.*, 2001).

Se están desarrollando mapas genéticos de raigrás perenne, festuca alta y alfalfa (Forster *et al.*, 2001), siendo este último el más avanzado. Se mapearon varios genes y QTLs (loci de caracteres cuantitativos), incluyendo hojas unifoliadas, tolerancia a aluminio, embriogénesis somática, color de la flor, enanismo, rendimiento y resistencia a frío. En algunas gramíneas, el mapeo se ha orientado a la localización de genes de apomixis, que es un tipo de reproducción agámica característico de muchas forrajeras como

Bothriochloa, *Cenchrus*, *Chloris*, *Digitaria*, *Eriochloa*, *Heteropogon*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Sorghum*, *Themeda*, *Urochloa*, *Setaria* y *Eragrostis* (Bauchan et al., 2002).

GENÓMICA

Las leguminosas modelo para los emprendimientos genómicos han sido *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*, donde se han generado 100,000 ESTs (etiquetas de secuencias expresadas) a través de consorcios internacionales (Spangenberg et al., 2011). Para las gramíneas se utilizaron como modelos el arroz y *Brachypodium distachyon*, que en la evolución de las Poideae se encuentra antes de la divergencia de los géneros más importantes que incluyen a la mayoría de las especies de cereales y forrajes de clima templado.

CONCLUSIONES

En función del panorama descrito, es de esperar que en los próximos años el número de genotipos de especies gramíneas y leguminosas forrajeras incrementará de manera sustancial, como producto de complementar la biotecnología con los métodos convencionales de mejoramiento. El desafío actual es estudiar la base de caracteres complejos, realizar selección asistida por marcadores moleculares, evaluar el potencial de la transferencia de genes, generar variabilidad genética y un nuevo germoplasma élite para ser incorporados en programas de mejoramiento.

La utilización de marcadores moleculares permitirá entender y capturar la heterosis, identificar QTLs, desarrollar detallados mapas genéticos, intro-regresar variación genética, realizar selección y determinar los factores involucrados en las interacciones genotipo-ambiente. La aplicación de transgénesis y del mejoramiento molecular implicará avances significativos en la mejora de la calidad del forraje, la resistencia a plagas y enfermedades y brindará la posibilidad de agregar valor a los cultivos forrajeros mediante la incorporación de genes que permitan la obtención de proteínas recombinantes heterólogas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado-Santacruz A, Rascon Q, Pons J, Grageda O, García-Moya E. 2004. Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras. *Téc Pec Mex* 42(2): 261-276.
- Bauchan G, Campbell T, Hossain M. 2002. Chromosomal polymorphism as detected by c-banding patterns in Chilean alfalfa germoplasm. *Crop Sci* 42: 1291-1297.
- Bernadett O. 2000. Avances en la morfogénesis *in vitro* de trinitaria (*Boungainvillea glabra*) cvs 'Glabra' y 'Sanderiana Variegata'. Tesis de Grado. Fac Agronomía. UCV. Maracay, Venezuela. 77 pp.
- Borges C, Jank L, Simeão R. 2007. Genética de nuevas especies forrajeras tropicales. Trabajo en extenso. En: Tejos R, Zambrano C, García W, Tobía C, Mancilla L, Valbuena N, Ramírez F (eds). Mem XI Seminario de Manejo y Utilización Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. Barquisimeto, Estado Lara Pp 132-145.
- Cholo L, Bolívar H. 2011. Formación de callos en el cultivo de la morera (*Morus alba* L.). Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma (Cuba) y Universidad Técnica de Cotopaxi "La Maná" (Ecuador). 45 p.

- Colomba E. 2011. Inducción de variabilidad genética para la tolerancia a estreses abióticos mediante técnicas de cultivo *in vitro* en *Cenchrus ciliaris* L. Tesis de Maestría. Universidad Internacional de Andalucía, Huelva, España. 113 pp.
- Del Hoyo I, Aguirre J, Martínez S, Gómez A, Loya J, Fernández M, Ulloa R. 2013. Repelección de los pastos *Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Brachiaria brizantha* y *Cenchrus ciliaris* sobre larvas de garrapata *Amblyomma cajennense* F. (Acari: Ixodidae). *Rev Bio Ciencias* 2 (3): 140-147.
- Díaz M, Echenique V, Schrauf G, Cardone S, Polci P, Lutz E, Spangenberg G. 2004. Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras. *RIA* 33 (3): 77-104.
- Echenique V, Díaz M, Polci P, Mroginski L. 2001. Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees *Biocell* 25: 131-138.
- Evans L. 1998. Feeding ten Billion. Cambridge. Univ. Press Cambridge. UK. 80 pp.
- Florio S. 2007. Evaluación del ácido indolacético y la kinetina en la propagación *in vitro* de Boca de Dragón (*Antirrhinum majus* L.). *Rev Fac Agron LUZ* 24. Suplem 1: 62-66.
- Florio S. 2011. Protocolo de cultivo *in vitro* (*Musa* AAB). Edit Académica Española. Saarbrücken, Alemania. 85 pp.
- Florio S. Real F, Florio J, Florio G. 2012. Tendencias de la Biotecnología. II Parte. *Rev Producción y Negocio*. 9 (53): 16-18.
- Florio S. Real F, Florio E. 2013. Tópicos de la embriogénesis somática vegetal. Edit Académica Española. Saarbrücken, Alemania. 153 p.
- Forster J, Jones E, Kolliker R, Drayton M, Dumsday J, Dupal M, Guthridge K, Mohoney N, Van Zijll E, Smith K. 2001. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: Spangenberg G (ed). *Molecular breeding of forage crops*. Kluwer Academic Publishers. pp 101-133.
- Hardy I, García E. 1994. Micropropagación de banano (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. *PHYTON* 1: 31- 41.
- García E. Trujillo I, Hardy I, Hermoso L, Vidal M, Giménez C. 1998. Mejoramiento genético del género *Musa* mediante la aplicación de Biotecnología Vegetal. *Mem Inst Biol Exper* 1: 157-160.
- Gómez R. 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez J (ed). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Inst Biotec Plantas. Villa Clara, Cuba pp: 57-79.
- Grapin A, Ortíz J, Domergue R, Babeau J, Monmarson S, Escalant J, Teisson C, Côte. F. 1998. Obtención de callos embriogénicos, iniciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas a partir de flores inmaduras masculinas y femeninas de *Musa*. *InfoMusa* 7 (1): 13-15.
- Lascano C. 2002. Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal. *Arch Latinoam Prod Anim* 10 (2): 126-132.
- López M, Hernández L, Ramírez W, Medina R, Perez J, González M. 2013. Estado del conocimiento del mejoramiento genético de cespitosas. *Pastos y Forrajes* 36 (3): 278-287.
- Matsumoto K, Oka S. 1998. Plant regeneration from protoplasts of a brazilian dessert banana (*Musa* spp. AAB group). *Acta Horticulturae* 490: 455-467.
- Medrano H, Pol A. 1985. Cultivo de tejidos y mejora genética en gramíneas forrajeras. *Pastos* 15 (1-2): 53-65.
- Michelangeli C. 2000. Biotecnología y producción de plantas transgénicas. *Rev Fundación Inlaca* 6 (10): 15-16.

Ortíz V. 2003. Caracterización de virus patógenos de leguminosas transmitidos por pulgones. Tesis doctoral. Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. España. 182 pp.

Snaydon R. 1985. Aspects of the ecological genetics of pasture species. In: Haeck J, Wol-dendorp J, Holl N (eds). Structure and functioning of plant populations. Pub. Amster-dam, Holanda pp 114-132.

Spangenberg G, Meierer M, Echenique V. 2011. Mejoramiento de plantas forrajeras en la era genómica. In: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L (eds). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ediciones INTA. Buenos Aires. Argentina. Cap 2: 389-402.

Trappe J, Karcher D, Richardson M, Patton A. 2011. Shade and traffic tolerance varies for bermuda grass and zoysia grass cultivars. *Crop Sci* 51: 870.

Trujillo I. 1994. Aplicación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del género *Musa*. Tesis doctoral. Posgrado en Biología mención Botánica. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 258 pp.

Trujillo I. 2008. Biotecnología aplicada al desarrollo sustentable de sabanas. *Acta Biol. Venez* 28 (1): 45-56.

Valerio D, Soto Y, Matos F. 2013. Evaluación y selección de once gramíneas forrajeras en la Provincia de la Vega. *Rev Agropecuaria y Forestal APF* 2 (1): 23-30.

Vargas-Sánchez J, Estrada-Álvarez J. 2011. Evaluación de la producción y la calidad nutricional de cinco especies forrajeras (arbustivas y arbóreas) para corte en condiciones de bosque seco tropical. *Vet Zoot* 5 (2): 55-67.