

BIOTECNOLOGIA EN ESPECIES FORRAJERAS

Daniel Pagliano*

INTRODUCCION

La biotecnología refiere a un conjunto de métodos que usan plantas, animales y microorganismos, enteros o en partes, para generar sustancias útiles o para mejorar las especies y variedades existentes.

La información genética de los seres vivos se encuentra contenida en moléculas de Acido Desoxirribonucleico (ADN). Se han generado una serie de técnicas que permiten el cultivo de células y tejidos, como así también analizar y/o modificar la información genética original de los organismos vivos. De acuerdo a los objetivos finales, estas técnicas se pueden usar aisladas o combinadas (cuadro 1).

Existen tres grandes objetivos de uso de las biotécnicas. Un grupo busca potenciar la base genética a través de la fijación y la multiplicación acelerada de determinados

genotipos de valor. Otro grupo tiene como objetivo la modificación de la información genética original para obtener una nueva capacidad o característica en el vegetal. Estas técnicas se basan en el reagrupamiento o modificación de la información ya existente, o en la introducción artificial de nueva información totalmente exógena. Por último, un grupo trata sobre la lectura y diagnóstico del valor genético de materiales.

En el caso de los vegetales las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen una gran plasticidad debido a la característica de totipotencia de las células. Esto refiere a que las células en forma individual o en tejidos, bajo ciertas condiciones, pueden presentar una competencia para regenerar un individuo completo.

Los protoplastos son células vegetales a las que se les ha removido la pared celular usando enzimas celulolíticas y pectinasas.

Cuadro 1. Técnicas usadas en biotecnología de plantas.

Objetivo	Técnicas
Fijar o multiplicar un genotipo	*Micropropagación *Haplometodos *Embriogénesis somática
Modificar un genotipo	*Selección <i>in vitro</i> y variación somaclonal *Hibridación somática *Ingeniería genética
Analizar un genotipo	*RFLPs *RAPDs

* Ing. Agr., M.Sc., Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.

Son usados como fuente de material para selección de materiales, manipulaciones genéticas, producir híbridos y nuevas combinaciones de genomas. Los protoplastos pueden regenerar la pared celular, dividirse y producir colonias que posteriormente se cultivan hasta obtener plantas enteras. Existe un fuerte desarrollo de métodos de cultivo tomando en referencia las características particulares de especies y aspectos biológicos. El cultivo individual de protoplastos y células permite observar la variabilidad existente a nivel de los tejidos (Schweiger *et al.*, 1987).

SISTEMAS DE CULTIVOS CELULARES EN FORRAJERAS

MICROPROPAGACION

La micropropagación refiere a la multiplicación *in vitro* de células de plantas en condiciones controladas. Se usa para producir copias idénticas (clones) de individuos superiores y consiste en reproducir un material a partir de un fragmento puesto en condiciones controladas de asepsia y medios de cultivo específicos.

En la micropropagación el concepto fundamental es la conformidad de las plantas obtenidas con el material parental, la estabilidad genética es la principal característica que define los procedimientos que se siguen en esta tecnología.

Permite también el uso de métodos de saneamiento de enfermedades, especialmente las debidas a virus. El cultivo de meristemas en combinación con termoterapia permite la obtención de plantas de alta calidad sanitaria.

La micropropagación tiene básicamente las siguientes etapas: Iniciación, Multiplicación, Enraizado y Aclimatación. Las primeras tres etapas se desarrollan en instalaciones de laboratorio y la última en invernáculos controlados.

Una de las aplicaciones de la micropropagación es el apoyo a los programas de mejoramiento. En este sentido, la multiplicación *in vitro* de genotipos de valor agronómico en

especies alógamas como *Lotus corniculatus* y *Trifolium pratense* permite proveer de plantas clonadas de genotipos seleccionados en buenas condiciones sanitarias.

Lotus corniculatus responde con facilidad al cultivo de tejidos (Webb, 1988; Armstead y Webb, 1987; Petit *et al.*, 1987; Pagliano 1989). La propagación *in vitro* partiendo de yemas de nudos tiene características de rapidez, bajo costo, ser muy conservativo en términos de inducir variabilidad y obtener plantas libres de patógenos (Tomes, 1979). *Trifolium pratense* se multiplica a partir de meristemas (Phillips y Collins, 1979).

El cultivo *in vitro* permite también la conservación en Bancos de Germoplasma a mediano y largo plazo de los genotipos seleccionados. Usando espacios reducidos y en condiciones controladas, el crecimiento de plantas en cultivo de tejidos puede ser enlentecido y así preservar sin modificaciones los genotipos originales de interés.

CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS PARA MEJORAMIENTO

Selección *in vitro*

Como variación somaclonal se entiende la generación de variabilidad genética en condiciones de cultivo de tejidos *in vitro*. Esta variabilidad se origina por varias causas como mutaciones, rearrreglos cromosómicos, cambios en el nivel de ploidía, etc. Puede darse en forma espontánea como consecuencia del efecto global del cultivo de tejidos o puede inducirse con agentes físicos o químicos.

Células y tejidos provenientes de distintos materiales pueden ser objeto de selección *in vitro* para encontrar nuevas variantes que permitan potenciar los programas de mejoramiento. Por ejemplo, incluyendo la toxina o sustancias relacionadas de patógenos en los medios de cultivo donde crecen las células vegetales, es posible seleccionar las variantes insensibles o resistentes a las mismas.

En cultivos de tejidos de alfalfa en los que se les incluyó en el medio de cultivo, filtrados de micelio de *Verticillium albo-atrum*, se pudo

identificar variantes que presentaron resistencia a la enfermedad (Frame *et al.*, 1991).

Plantas de *Lotus corniculatus* regeneradas desde protoplastos (proclones) mostraron cambios poligénicos y alteraciones menores estructurales en cromosomas. En algunos caracteres las diferencias fueron notorias respecto al control, como la producción de menores cantidades de ácido hidrociánico (Niizeki *et al.*, 1990). La frecuencia y tipo de variación encontrada a nivel genómico depende del tipo de explante inicial y el método de regeneración de las plantas (Webb y Watson, 1991).

En algunas gramíneas forrajeras se ha ajustado la regeneración de plantas enteras y fértiles. En *Paspalum dilatatum* se han obtenido niveles significativos de plantas a partir de protoplastos, lo que posibilita su uso para otras técnicas (Akashi y Adachi, 1992; Bôvo *et al.*, 1988). Se han establecido sistemas celulares para la regeneración de plantas de especies forrajeras de importancia como *Lolium* y *Festuca* (Wang *et al.*, 1993).

Hibridación somática

La hibridación somática usando la fusión de protoplastos puede ser usada para combinar genomas de manera intra o interespecifica. La fusión de protoplastos puede generarse por métodos físicos o químicos, y supone una capacidad para regenerar a la nueva combinación obtenida. La fusión dirigida de nucleoplasmas y citoplasmas permite combinar genomas nucleares y citoplasmáticos (Spangenberg *et al.*, 1990).

Híbridos somáticos asimétricos han sido obtenidos entre *Festuca arundinacea* y *L. multiflorum* (Takamizo *et al.*, 1991). Los híbridos obtenidos con protoplastos de *L. multiflorum* irradiados con rayos-X a distintas dosis y usados como donadores en protoplastos recipientes de *F. arundinacea* inactivados metabólicamente, permitieron analizar el efecto de distintas combinaciones particulares de genomas enteros o parciales (Spangenberg *et al.*, 1994).

Ha sido posible obtener híbridos somáticos de dos especies incompatibles de *Lotus*: *L. corniculatus* y *L. conimbricensis*. Debido a variaciones cromosómicas observadas en un donante (*L. conimbricensis*), los híbridos obtenidos tuvieron problemas de fertilidad (Wright *et al.*, 1987).

Embriogénesis somática

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios, se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, no poseen conexión vascular con el resto de los tejidos y son capaces de crecer y formar plantas enteras.

La embriogénesis somática se usa para multiplicación de materiales y aspectos relacionados a mejoramiento. El impacto mayor es que ha hecho posible desarrollar semillas artificiales, las cuales son embriones somáticos encapsulados en una cubierta protectora y con sustancias nutritivas que le permiten una viabilidad en el tiempo.

Una de los materiales forrajeros con mayor desarrollo de esta tecnología es *Medicago*. Nagarajan *et al.* (1986) describen la obtención de embriones somáticos en 10 líneas de *M. media* y *M. sativa*, observando diferencias en la capacidad de embriogénesis. Las plantas de alfalfa obtenidas de semilla artificial han demostrado tener similares propiedades agronómicas y ser fértiles (Fujii *et al.*, 1987). En otras leguminosas ha sido posible desarrollar embriogénesis somática como lo es en *Trifolium pratense* (Phillips y Collins, 1980).

El costo de producción unitario de semilla artificial es superior a una semilla común (Redenbaugh *et al.*, 1987) pero se trabaja en forma intensa en la automatización del proceso con lo que en el futuro próximo se abarataría en forma significativa su producción.

En gramíneas forrajeras se han desarrollado métodos para obtener embriogénesis somática como en *Festuca* (Zaghmout y Torello, 1989) y *Paspalum* (Akashi y Adachi, 1992).

BIOLOGIA MOLECULAR DE FORRAJERAS

ORGANIZACION DEL GENOMA VEGETAL

En los vegetales podemos encontrar ADN en varios compartimentos celulares: núcleo, mitocondrias y cloroplastos. Esto significa que hay genes en distintos espacios y que los mismos interactúan para mantener funciones de las células y tejidos. El ADN se encuentra organizado y empaquetado con la ayuda de proteínas. A este conjunto se le denomina cromatina, la cual se integra para formar los cromosomas. Un gen de un organismo eucariota como una planta tiene mayormente tres grandes regiones: Promotor, Codificante y Terminación.

Cada gen debe leerse en un preciso instante (desarrollo, floración) y en un determinado lugar (parénquima, endosperma, etc.). El Promotor es la región del ADN en donde la RNA-polimerasa interacciona para comenzar la transcripción y está así involucrado en el encendido o lectura del gen en un momento determinado. El Promotor se identifica por una secuencia consenso denominada TATAbox. Más alejadas a esta secuencia aparecen otras, determinantes específicas del momento y la cantidad de copias en que un gen es transcrito.

La región Codificante es la región donde está «codificada» la información específica de cada proteína. Una región de Terminación le indica a la enzima que transcribe el código que ha finalizado la lectura.

Estos elementos, junto con otros mecanismos como la estabilidad citoplasmática del mRNA y la maduración proteica post-traducción, constituyen las estrategias de contralor y regulación de los genes. Un complejo sistema de regulación se ejerce para que cada proteína sea sintetizada en un determinado momento y en una determinada cantidad.

INGENIERIA GENETICA

Características

La ingeniería genética o tecnología de ADN recombinante, es la formación de nuevas combinaciones de material heredable por la inserción de moléculas de ácidos nucleicos, producidos fuera de la célula y colocadas en cualquier virus, plásmido bacteriano o cualquier otro sistema vector de tal forma que permita su incorporación en un organismo huésped en el que no ocurren naturalmente pero que están capacitados para continuar su propagación.

Transformar una célula vegetal consiste en introducir en el genoma de una planta un fragmento de ADN exógeno. Generalmente estos fragmentos contienen genes diseñados de forma tal que el vegetal los reconoce como propios y los incorpora a su información genética. La potencialidad de este proceso radica en que cualquier gen, proveniente de cualquier organismo (animal, vegetal o microorganismo), puede ser introducido en una planta y así expresar una nueva característica, la cual concede una ventaja productiva sobre el material original.

La transformación de células vegetales puede ser realizada de dos formas distintas. Una consiste en la utilización de vectores naturales (*Agrobacterium*) y otra consiste en forzar la penetración hacia el núcleo de la célula de un ácido nucleico por medios físicos o químicos.

Las aplicaciones de la ingeniería genética incluyen varias opciones para su uso en especies forrajeras.

Tolerancia a virus

Existen dos estrategias moleculares para la aplicación de la tecnología de ingeniería genética en el área de producción de resistencia a virus:

1. Expresión previa a la infección en el citosol vegetal de proteínas de cápsides virales, generando protección cruzada al virus específico y otros relacionados.

2. Control por «micRNA» (mRNA-interferencia a complementario RNA), se basa en la generación de copias antisentido (en sentido inverso) de determinados mRNA. El efecto que se produce es un apareamiento de dos RNA con la consecuencia de que al ser una estructura de cadena doble no puede ser reconocida por los ribosomas y así ensamblarse para generar la proteína correspondiente. Se bloquea la síntesis de compuestos necesarios para que el virus pueda replicarse.

Hill *et al.*, (1991) observaron en plantas transgénicas de alfalfa transformadas con la cápside del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), que la resistencia variaba de acuerdo a los niveles de expresión de la proteína de cápside. Los resultados demostraron que la expresión del transgene confería resistencia a los materiales transformados.

Resistencia a herbicidas

El uso de herbicidas para evitar la competencia de malezas se ha convertido en una parte integral de la agricultura moderna. La oferta de herbicidas disponible se ha incrementado y están disponibles compuestos nuevos y más seguros. Estos herbicidas generalmente afectan metabolismos específicos que están presentes sólo en las plantas, como por ejemplo, fotosíntesis o vías metabólicas de producción de algunos aminoácidos. Para el uso de herbicidas no selectivos o totales que afectan a todo tipo de vegetal, la ingeniería genética ofrece una herramienta única para generar tolerancia o resistencia a estas moléculas.

Existen dos diferentes estrategias para construir cultivos resistentes a herbicidas: modificación de la molécula blanco del herbicida y detoxificación/degradación del herbicida (Botterman y Leemans, 1988).

En la primer estrategia se han desarrollado dos diferentes posibilidades:

* Utilizar una forma mutante de la enzima blanco, la cual es todavía activa pero menos sensible al herbicida.

* Generar una sobreproducción de la enzima blanco.

La segunda estrategia usa vías de degradación o detoxificación del herbicida que existen en plantas tolerantes o microorganismos. Varias enzimas detoxificantes han sido identificadas y usadas para producir líneas tolerantes. Los microorganismos del suelo que están involucrados en biodegradación de herbicidas son una fuente de genes de resistencia a estos compuestos (Botterman y Leemans, 1988). Un ejemplo de este tipo lo constituye el gen *bar* que confiere resistencia a fosfotricina (PPT).

Este compuesto es un inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa (GS) y es usado como un potente herbicida no selectivo. La GS tiene un papel central en la asimilación de amonio producido por reducción de nitratos, por fotorespiración o por fijación de nitrógeno en las raíces. La inhibición de GS por PPT causa una rápida acumulación de amonio la cual lleva a la muerte de la célula vegetal. La enzima fosfotricina acetyl transferasa (PAT) ha sido clonada desde microorganismos y cuando se expresa en plantas transgénicas confiere resistencia al herbicida.

En *Lotus corniculatus* cv. San Gabriel, con la inclusión de este gen se lograron plantas resistentes al herbicida no selectivo PPT (Pagliano, 1989). Cuando se aplicó el compuesto comercial Basta (Hoechst) en dosis de 6 litros/hectárea, las plantas controles no transformadas se colapsaban totalmente en 24 horas mientras que las plantas transgénicas no fueron afectadas, con lo que se abre una posibilidad de control químico para malezas difíciles.

Tolerancia a insectos

Se han diseñado dos modelos biológicos para lograr introducir tolerancia a insectos usando ingeniería genética. Un modelo se desarrolló a partir del modo de acción parásita que tiene la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) sobre varias especies de insectos.

Esta bacteria produce unas proteínas activas que se almacenan como parásporas cristalinas. Al ser ingeridas por un insecto susceptible, las proteínas actúan como toxi-

nas en sitios específicos del tracto digestivo provocando su muerte. La estrategia molecular fue la de clonar estas toxinas específicas e insertarlas en los genomas vegetales. De esta forma, plantas que expresen estas proteínas se convierten en tolerantes a insectos. Cuando una larva muerde una hoja, la toxina está presente y provoca su muerte.

Se ha descrito el uso del gen *cryA(b)* de toxina Bt en trébol blanco (White *et al.*, (1993), citado por Spangenberg *com. pers.*). Los bioensayos permitieron observar una reducción de 80% en el ataque de larvas de *Orocrambus*.

El segundo modelo que se desarrolló fue el de expresar proteínas que realizaran interferencias con metabolismos o productos normales de los insectos. Los tejidos agredidos por los insectos reaccionan, por ejemplo con la síntesis de proteínas inhibitoras de proteasas. Estas proteínas están dirigidas específicamente al insecto e interfieren con su proceso digestivo.

Se han demostrado así estrategias de control de insectos. Por ejemplo, un inhibidor de la tripsina clonado de la leguminosa *Vigna unguiculata* pudo generar resistencia a insectos en tabaco. Actualmente, se busca expresar en trébol blanco un inhibidor de la tripsina clonado de soja que ha demostrado una actividad letal en larvas de *Costelytra zelandica*, una peste mayor en Nueva Zelandia (White *et al.*, 1993).

También las quitinasas son otras proteínas usadas para generar resistencia. Estas enzimas hidrolizan la quitina de los insectos provocando su muerte. Se ha evaluado el impacto de este sistema en abejas, a los efectos de asegurar que no se afecte a insectos benéficos. La ingestión de néctar de plantas transgénicas y la inyección directa de quitinasa purificada en el hemocele, no afectó el comportamiento social ni las capacidades de aprendizaje de abejas.

Aumento de la calidad forrajera

Se han generado dos líneas de trabajo para aumentar la calidad de especies forrajeras. La primera es la manipulación genética de las vías de síntesis de lignina. En

rumiantes esta molécula se relaciona directamente con la digestibilidad de un forraje ya que constituye un factor que limita la disponibilidad ruminal de los carbohidratos celulósicos de las paredes celulares. La lignina es un complejo heterogéneo que se forma en la vía metabólica de los fenilpropanoides. Se ha encontrado que enzimas específicas como la O-metiltransferasa (OMT) y la cianamil alcohol deshidrogenasa (CAD) pueden ser bloqueadas usando estrategias de ARN antisentido, logrando bajar la cantidad total de lignina en plantas (Spangenberg *com. pers.*).

Otra línea de trabajo se basa en la introducción de proteínas de alto valor nutricional. La expresión en plantas de proteínas con alto contenido de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y resistentes a la degradación ruminal, es una estrategia que se ensaya para aumentar la producción de lana por animal (Ealing *et al.*, 1993). Las plantas en las cuales se dispone de estas líneas transformadas incluyen trébol blanco, trébol subterráneo y alfalfa. Los genes disponibles son la ovalbúmina, albúmina SF8 de girasol y la proteína de reserva 2S de la Castaña de Pará.

MARCADORES MOLECULARES

La detección y el uso de los polimorfismos a nivel del ADN existente en los organismos es una herramienta de apoyo a los programas de mejoramiento.

El aislamiento y la digestión con enzimas del ADN total o genómico de una planta u otro organismo, seguido con una hibridación específica con sondas marcadas con radioactividad, permite identificar fragmentos de ADN de distinto tamaño. Esta forma de polimorfismo se denomina Polimorfismo del Largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism), y ha sido ampliamente usado en genética.

La Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR, Polymerase Chain Reaction) ha permitido nuevas estrategias de análisis molecular de los polimorfismos del ADN existentes entre especies, variedades y organismos en particular. Una aplicación importante es la generación de marcadores moleculares por el método denominado Amplificación al Azar de ADN

Polimorficos (RAPDs, Random Amplified Polymorphic DNAs). Por esta técnica es posible identificar segmentos de ADN polimórficos que pueden ser usados como marcadores que segregan en herencia mendeliana. Combinando RAPDs con NILs (near-isogenic lines) se generan estrategias que permiten identificar marcadores moleculares ligados a genes de interés y la posibilidad de realizar mapas genéticos (Waugh y Powell, 1992).

Estas técnicas se desarrollan en especies forrajeras como alfalfa, festuca, raigrás e híbridos *Festuca x Lolium* (Spangenberg *com. pers.*).

BIBLIOGRAFIA

- AKASHI, R.; ADACHI, T.** 1992. Plant regeneration from suspension cultured-derived protoplasts of apomitic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). *Plant Science* 82: 219-225.
- ARMSTEAD, I.; WEBB, J.** 1987. Effect of age and type of tissue on genetic transformation of *Lotus corniculatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9: 95-101.
- BOTTERMAN, J.; LEEMANS, J. ENGINEERING,** 1988. Herbicide resistance in plants. *TIG* 4: 219-222.
- BOVO, O. A.; MROGINSKI, L.A.; QUARIN C.** 1988. *Paspalum* spp. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 6. Crops II. Y.P.S. Bajaj (ed) Springer-Verlag Berlin. 8 pp.
- EALING, P.; HANCOCK, K.; WHITE, D.; HIGGINS, T.** 1993. Sulphur-rich protein modification for optimised expression in transgenic white clover. In: XVII International Grassland Congress (IGC 93). Mid Congress, Palm. North, NZ.
- FRAME, B.; KANG-FU, YU; CHRISTIE, B.R.; PAULS, K.P.** 1991. *In vitro* selection for resistance to verticillium wilt in alfalfa (*Medicago sativa* L.) using a fungal culture filtrate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 325-340.
- FUJII, J.A.A.; SLADE, D.T.; REDENBAUGH, K.; WALKER, K.A.** 1987. Artificial seeds for plant propagation. *Tibtech*. Vol. 5: 335-339.
- HILL, K.; JARVIS, H.; HALK, E.; KRAHN, K.; LIAO, L.; MATHEWSON, R.; MERLO, D.; NELSON, S.; RASHKA, K.; LOESCH-FRIES, S.** 1991. The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *Biotechnology* 9: 373-375.
- NAGARAJAN, P.; MC. KENZIE, J.S.; WALTON, P.D.** 1986. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. *Plant Cell Reports* 5: 77-80.
- NIIZEKI, M.; ISHIKAWA, R.; SAITO, K.** 1990. Variation in a single protoplast- and seed-derived population of *Lotus corniculatus* L. *TAG* 80: 732-736.
- PAGLIANO, D.** 1989. Genetic engineering of *Lotus corniculatus* L. plants resistant to the herbicide phosphinotricin. MSc. Tesis. Vrije Universiteit Brussel. 1989. 43 pp.
- PETIT, A.; STOUGAARD J.; KÜHLE, A.; MARCKER, K.; TEMPÉ, J.** Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* (1987) 207: 245-250.
- PHILLIPS, G. C.; COLLINS, G.B.** 1979. Virus symptom-free plants of red clover using meristem culture. *Crop Sci.* 19: 59-64.
- PHILLIPS, G. C.; COLLINS, G.B.** 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover. *Crop Sci.* 20: 323-326.
- PHILLIPS, G. C.; GROSSER, J. W.; BERGER, S.; TAYLOR, N. L.; COLLINS, G.B.** 1992. Interspecific hybridization between red clover and *Trifolium alpestre* using *in vitro* embryo rescue. *Crop Sci.* 32: 1113-1115.
- REDENBAUGH, K.; VISS, P.; SLADE, D.; FUJII, J.A.** 1987. Scale-up artificial seeds.
- SCHWEIGER, H.G.; DIRK, J.; KOOP, H.U.; KRANZ E.; NEUHAUS, G.; SPANGENBERG, G.; WOLFF, D.** 1987. Individual selection, culture and manipulation of higher plant cells. *TAG* 73:769-783.
- SPANGENBERG, G.; KOOP, H.U.** 1993. Low density cultures: microdoples and single cell nurse cultures. In: *Manual of Tissue Culture: Fundamentals and Application*. K. Lindsey (ed.). 24 pp.

- SPANGENBERG, G.; NEUHAUS, G.; POTRYKUS, I.** 1990. Micromanipulation of Higher Plant Cells. In: Plant Cell Line Selection, Procedures and Applications. P. J. Dix (ed.) VCH. pp. 87-109.
- SPANGENBERG, G.; WANG, Z. Y.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I.** 1994. Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Science*, 97: 83-94.
- TAKAMIZO, T.; SPANGENBERG, G.** 1993. Somatic hybridization in *Festuca* and *Lolium*. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Y.P.S. Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin. 25 pp.
- TOMES, D.T.** 1979. A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus* genotypes. *Can. J. Bot.* 57: 137-140.
- WANG, Z.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G.** (1993). Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Science* 94: 179-193.
- WAUGH, R.; POWELL W.** 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Tibtech*. Vol. 10: 186-191.
- WEBB, J. K.** 1988. Recent developments in the regeneration of agronomically important crops from protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12: 127-131.
- WRIGHT, R., SOMERS, D. ; MCGRAW R.** 1987. Somatic hybridization between birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and *L. conimbricensis* Willd. *TAG*. 75: 151-156.
- ZAGHMOUNT, O.; TORELLO, W.** 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of red fescue. *Crop Sci.* 29:815-817.