

## Aplicación de herramientas moleculares para el mejoramiento genético de pasturas

### Application of molecular tools for pasture breeding

Ayerin Carrodeguas-Gonzalez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5890-4174> y Andrés Zúñiga-Orozco<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8214-4435>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Horticolas Liliانا Dimitrova, Mayabeque, Cuba. <sup>2</sup>Carrera de Ingeniería Agronómica, Escuela de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Estatal a Distancia, Apdo. 474-2050. San Pedro, San José, Costa Rica. Correo electrónico: [ayerim2009@gmail.com](mailto:ayerim2009@gmail.com), [azunigao@uned.ac.cr](mailto:azunigao@uned.ac.cr).

#### Resumen

**Objetivo:** Fundamentar la importancia de la aplicación de herramientas moleculares en los programas de mejoramiento genético de pasturas.

**Materiales y Métodos:** Se consultaron y analizaron 59 artículos, que abordan los métodos basados en biología molecular (marcadores genéticos, tecnología CRISPR y citogenética molecular), disponibles en bases de datos (Google académico, Dialnet, Redalyc, SciELO, REDIB, DOAJ y Latindex), con el propósito de obtener información acerca de su aplicación en la mejora genética de pastos.

**Resultados:** Se recopiló información acerca de los principales marcadores moleculares (microsatélites, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente, polimorfismo de un solo nucleótido, polimorfismo de longitud de fragmento amplificado), utilizados para analizar la diversidad genética en pastos. Se investigó cuáles resultan más efectivos y versátiles. Se constató que el fenómeno de la apomixis se puede utilizar para mantener el vigor híbrido en líneas de pastos y que los marcadores moleculares contribuyen a identificar plantas apomícticas en edades tempranas. Se fundamentó que la tecnología CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas) se puede aplicar en especies de pasturas para mejorar atributos agronómicos.

**Conclusiones:** Los marcadores moleculares, especialmente SNPs, son ideales para estudios de diversidad genética en pastos y para la identificación de plantas apomícticas a edades tempranas. La tecnología de edición genómica CRISPR constituye una herramienta versátil y aplicable en pastos.

**Palabras clave:** marcadores moleculares, apomixis, CRISPR, diversidad genética, edición genómica

#### Abstract

**Objective:** To ratify the importance of the application of molecular tools in the pasture breeding programs.

**Materials and Methods:** Fifty-nine papers were consulted and reviewed, which approach the methods based on molecular (genetic markers, CRISPR technology and molecular cytogenetics), available in databases (Google Scholar, Dialnet, Redalyc, SciELO, REDIB, DOAJ and Latindex), in order to obtain information about their application in pasture breeding.

**Results:** Information was compiled about the main molecular markers (microsatellites, randomly amplified polymorphic DNA, single-nucleotide polymorphism, amplified fragment length polymorphism), utilized to analyze the genetic diversity in pastures. Which ones are more effective and versatile was researched. It was noted that the phenomenon of apomixis can be utilized to maintain the hybrid vigor in pasture lines and that molecular marks contributed to identify apomictic plants at early ages. It was validated that the CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) technology can be applied in pasture species to improve agronomic attributes.

**Conclusions:** Molecular markers, especially SNPs, are ideal for genetic diversity studies in pastures and for the identification of apomictic plants at early ages. The CRISPR technology of genomic edition constitutes a versatile tool applicable in pastures.

**Keywords:** molecular markers, apomixes, CRISPR, genetic diversity, genomic edition

#### Introducción

Las pasturas muestran caracteres modificables y heredables en el tiempo, además de una gran variación en hábitos de crecimiento y sistemas de reproducción. Son importantes como especies forrajeras, además de

ser rápidas colonizadoras de ambientes degradados, y tener alto potencial ornamental como cespitosas (Capstaff y Miller, 2018). En estas especies, pertenecientes a la familia Poaceae, se observa una amplia gama de comportamientos reproductivos

Recibido: 10 de mayo de 2021

Aceptado: 20 de julio de 2021

Como citar este artículo: Carrodeguas-Gonzalez, Ayerin & Zúñiga-Orozco, Andrés. Aplicación de herramientas moleculares para el mejoramiento genético de pasturas. *Pastos y Forrajes*. 44:eE21, 2021.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

(autopolinización, polinización cruzada, apomixis y propagación vegetativa) (Acuña *et al.*, 2019). La complejidad y variación en los sistemas reproductivos suele ir acompañada de alto grado de plasticidad, lo que indica niveles significativos de interacción genotipo-ambiente para los caracteres agronómicos (Peltier *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, el mejoramiento genético de pasturas se basa en técnicas convencionales, dependientes de la variabilidad que ocurre naturalmente en ecotipos adaptados, poblaciones naturalizadas y cultivares viejos. El mejoramiento genético convencional, basado en rasgos morfo fisiológicos, es laborioso y requiere experimentos repetidos en múltiples entornos (Collard y Mackill, 2008). Es por ello que las herramientas moleculares pueden acelerar y mejorar sustancialmente los programas de mejora.

Desde el descubrimiento del ADN como portador de la información genética de la célula, los científicos se han dedicado constantemente a desarrollar herramientas que permitan manipular y modificar el genoma. El desarrollo de diversas técnicas moleculares permitió un avance en el mejoramiento genético de los cultivos de interés agrícola y la introducción de nuevos enfoques, para acortar los ciclos reproductivos de las plantas. Se ha demostrado que las técnicas novedosas desarrolladas en los últimos 20 años, como la selección genómica y el fenotipado de alto rendimiento (HTP, por sus siglas en inglés) aceleran el fitomejoramiento (Ahmar *et al.*, 2020).

La ingeniería genética y los métodos moleculares también desempeñan una función importante para desarrollar cultivos con características deseables mediante la transformación genética, la mutagénesis, la fusión de protoplastos, el cultivo *in vitro*, el rescate de embriones, entre otros (Watson *et al.*, 2018). Estudios recientes proponen técnicas, como la secuenciación genómica a gran escala y marcadores moleculares de alto rendimiento, para mejorar la reproducción de cultivos de importancia comercial (Mujjassim *et al.*, 2019).

A partir de los antecedentes descritos, el objetivo de esta revisión es fundamentar la importancia de la aplicación de herramientas moleculares en los programas de mejoramiento genético de pasturas.

*Uso de métodos moleculares para evaluar la diversidad genética en pasturas.* La caracterización de la diversidad genética de una población es necesaria para un mejor uso de los recursos genéticos en los programas de mejoramiento y conservación de la biodiversidad. Por estas razones, el conocimiento de la diversidad genética del germoplasma disponible

es esencial en la selección de materiales para el cultivo o progenitores para el desarrollo de cultivares (Kuwi *et al.*, 2018). Para la evaluación de la diversidad genética se pueden utilizar diferentes herramientas, entre las que se destacan los marcadores moleculares. Estos se desarrollan mediante el análisis de fragmentos, matrices de hibridación o métodos basados en secuenciación del ADN (Loera-Sánchez *et al.*, 2019).

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN, que están asociados con una parte del genoma y que se pueden identificar mediante un ensayo simple (Nadeem *et al.*, 2018). Se basan en diferencias en la secuencia de ADN, por lo que no están sujetos a la influencia ambiental (Hamouda, 2019). Son abundantes en todo el genoma y los ensayos correspondientes se pueden realizar en cualquier momento durante el desarrollo de la planta (Nadeem *et al.*, 2018).

*Métodos basados en análisis de fragmentos.* Los métodos basados en ADN se clasifican en técnicas de análisis de fragmentos (marcadores), matrices de hibridación (detectan polimorfismos de ADN mediante hibridación de una muestra de ADN y un matriz marcada con sondas) y métodos basados en secuenciación que detectan polimorfismos de ADN por secuenciación (Loera-Sánchez *et al.*, 2019).

Entre las metodologías que se basan en análisis de fragmentos, que detectan los polimorfismos de ADN mediante la comparación del tamaño de las secuencias, se encuentran el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), el ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), sitios de unión intercebador (iPBS), polimorfismos amplificados relacionados con la secuencia (SRAP), repeticiones de secuencia intersimple (ISSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y repeticiones de secuencia simple o microsatélites (SSR).

Los marcadores moleculares pueden ser dominantes o codominantes, en dependencia de los alelos que puedan identificar. Los marcadores dominantes (AFLP, RAPD, iPBS, SRAP e ISSR) no son capaces de identificar los individuos heterocigotos, lo que constituye una limitación, pero tienen como ventaja que se pueden producir a bajo costo, sin que sea necesaria información sobre la secuencia de las especies objetivo. Esto los convierte en los sistemas de elección para muchas especies de pastizales que no han sido secuenciadas (Loera-Sánchez *et al.*, 2019).

Los sistemas de marcadores codominantes, como el SSR, permiten la estimación de la diversidad genética

y se basan en frecuencias alélicas. El desarrollo de estos marcadores requiere información de secuenciación *a priori*, lo que constituye una limitación en el caso de genomas que no han sido secuenciados. Sin embargo, una vez obtenidos, los conjuntos de cebadores SSR se pueden estandarizar fácilmente y utilizar por múltiples laboratorios (Loera-Sánchez *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2019). Por estas razones, se consideran marcadores ideales en estudios de diversidad genética, debido a la facilidad de su aplicación, alta reproducibilidad, análisis rápido, bajo costo y mayor diversidad alélica (Tibihika *et al.*, 2019).

Los marcadores moleculares se usan ampliamente en la identificación de cultivares y especies, en el establecimiento de relaciones evolutivas entre diferentes grupos de plantas, en la evaluación de la variabilidad genética entre poblaciones, mapeo genético y selección asistida. Por estas razones, se consideran herramientas básicas y útiles en programas de mejora genética (Carrodeguas-Gonzalez y Zuñiga-Orozco, 2020).

Con el propósito de evaluar la diversidad genética en gramíneas, varios autores han utilizado diferentes marcadores moleculares que se muestran en la figura 1.

En los últimos años, ha crecido el interés por la evaluación de la diversidad genética en poblaciones de pasturas mediante el uso de marcadores moleculares, ya que este tipo de estudio constituye el requisito previo para el éxito en cualquier

programa de selección (Carrodeguas-Gonzalez y Zuñiga-Orozco, 2020). Recientemente, Luo *et al.* (2020) mediante el uso de marcadores morfológicos (SNPs, SRAP e ISSR) analizaron la diversidad genética en 49 accesiones de *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze, un césped popular en jardines de regiones tropicales y subtropicales, con el objetivo de comparar la eficiencia de dichas técnicas. Estos autores demostraron que en la especie analizada los tres marcadores moleculares utilizados son muy efectivos para este tipo de estudio.

**Matrices de hibridación.** Las matrices de hibridación de ADN son técnicas de alto rendimiento, basadas en la hibridación de secuencias de ADN con una matriz de sondas marcadas, que están unidas a una superficie sólida. Después de eliminar el ADN no hibridado, las hibridaciones exitosas se visualizan mediante fluorescencia o quimioluminiscencia (Loera-Sánchez *et al.*, 2019). Los métodos basados en matrices de hibridación, como las matrices SNP y la tecnología matriz de diversidad (DArT), se han utilizado para medir la variación genética de pastizales (Blackmore *et al.*, 2015).

La tecnología basada en matrices de diversidad (DArT) utiliza representaciones genómicas de las poblaciones objeto de análisis. Dichas representaciones se generan mediante cortes de ADN de múltiples plantas con enzimas de restricción. Luego se enriquecen ciertos fragmentos con el uso de cebadores selectivos y, finalmente, los fragmentos se clonan en una biblioteca de plásmidos. A diferencia de

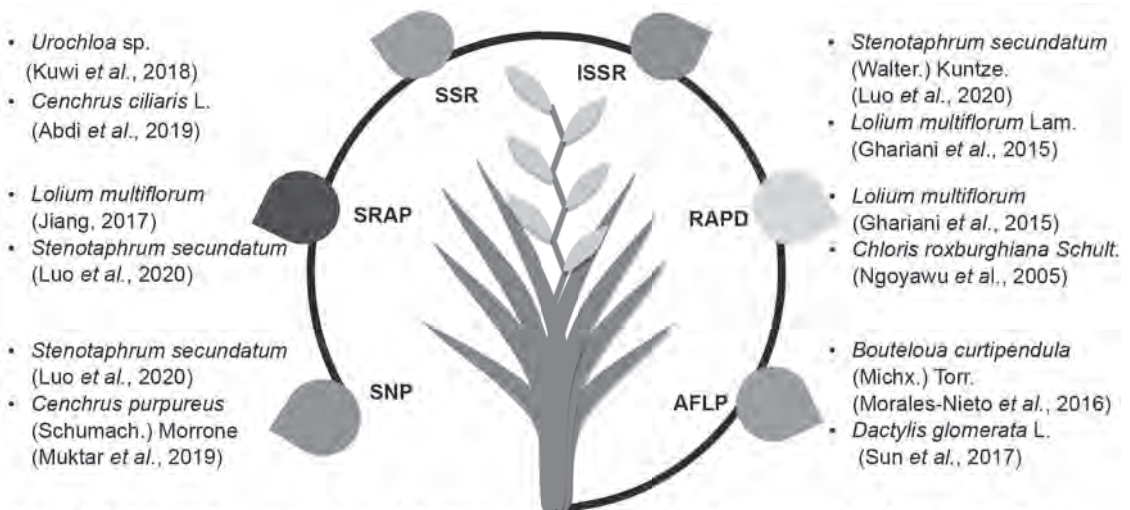


Figura 1. Estudios relevantes de diversidad genética a partir del uso de marcadores moleculares en diferentes gramíneas.

Fuente: Elaboración propia

las matrices SNP, esta tecnología de matrices no requiere información de secuenciación *a priori*, lo que reduce en gran medida sus costos de desarrollo (Loera-Sánchez *et al.*, 2019).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son mutaciones codominantes heredadas, que ocurren en el nivel de base única en regiones del genoma, codificantes o no codificantes. Los SNP se identifican comparando las secuencias de múltiples plantas de una población y se pueden utilizar para estudiar la diversidad genética (Nybom *et al.*, 2014). En los próximos años, con la reducción del costo de la secuenciación, se espera que estos marcadores sean los más utilizados e idóneos para evaluar variabilidad en pasturas.

*Métodos basados en secuenciación.* La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) agrupa un conjunto de tecnologías, diseñadas para secuenciar gran cantidad de segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a menor costo por base. Inicialmente se utilizó para detectar variantes de nucleótido único, y se ha desarrollado para otro tipo de variantes, como inserciones, deleciones y grandes reordenamientos (Raza y Shahi, 2020).

NGS brinda la oportunidad de explorar la diversidad genética en pasturas y sus parientes silvestres, a una escala mucho mayor de lo que era posible con tecnologías anteriores. El análisis del acervo genético primario y de los parientes silvestres más distantes tiene el potencial de identificar genes y alelos que se pueden usar para mejorar el rendimiento en los pastos.

*Marcadores moleculares para la identificación de plantas apomícticas.* Durante la reproducción sexual de las angiospermas, el polen es indispensable para la fertilización y para asegurar la formación de semillas sexuales. Sin embargo, en muchas plantas conocidas como apomícticas, la formación de la semilla ocurre sin necesidad de la doble fertilización característica de las angiospermas.

La apomixis es una forma de reproducción asexual mediante semillas, que origina plantas genéticamente idénticas a la planta madre, o sea, constituye un método de clonación natural. Estas semillas se forman a partir de tejidos maternos del óvulo, y evitan los procesos de meiosis y fertilización. Este fenómeno está relacionado estrechamente con el nivel de ploidía, de forma que los genotipos diploides presentan, generalmente, reproducción sexual, mientras que los poliploides son apomícticos (Soliman *et al.*, 2019). La apomixis puede ser gametofítica o espo-

rofítica. En la esporofítica (embrionía adventicia), el embrión se desarrolla directamente en el óvulo a partir de una célula somática (generalmente de la nucela o tegumento), fuera del saco embrionario sexual. Este tipo de apomixis se ha descrito en los géneros *Poa*, *Oryza* y *Paspalum* (Fiaz *et al.*, 2021). En la gametofítica, el saco embrionario se obtiene vía aposporia o diplosporia. El embrión se forma luego por embriogénesis, independientemente de la fertilización (partenogénesis), y el endospermo se desarrolla de forma autónoma o después de la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia) (Henderson *et al.*, 2017).

La apomixis está presente en más de 400 especies vegetales, que representan, aproximadamente, 40 familias. Se ha informado la aparición de embriones adventicios en 148 géneros, aposporia en 110 y diplosporia en 68 géneros (Hojsgaard *et al.*, 2014).

La diplosporia consiste en la mitosis que experimentan las células madre de las megásporas para formar un saco embrionario, no reducido (no ocurre meiosis, por lo que no se reduce el número cromosómico). Las células de iniciación apomíctica se originan a partir de la célula madre de las megásporas y, finalmente, se convierten en embriones. Este tipo de apomixis se ha observado en la familia Poaceae, en los géneros *Paspalum*, *Tripacum*, *Eragrostis* y *Elymus* (Quero-Carrillo *et al.*, 2010).

Durante la aposporia, las células somáticas que se encuentran cerca de las células madre de la megáspora son las que forman un saco embrionario no reducido. Estas células se someten a tres rondas de mitosis, y finalmente se convierten en embriones (Schmidt, 2020). Se han registrado en la familia Poaceae, en los géneros *Megathyrsus*, *Paspalum*, *Brachiaria*, *Bouteloua*, *Cenchrus* y *Pennisetum* (Quero-Carrillo *et al.*, 2010).

La figura 2 muestra los tipos de apomixis.

En la agricultura, la apomixis constituye una ventaja para mantener genotipos superiores de diferentes cultivos. La perspectiva de clonar genotipos híbridos con características de interés agronómico puede representar una ayuda importante para los productores agrícolas de los países en desarrollo. Esto les permitiría sostener rendimientos altos, al usar parte de las semillas cosechadas sin pérdidas en la producción, debido a la segregación de caracteres y la depresión por endogamia.

Entre otras ventajas, la expresión de la apomixis reduce al mínimo el aislamiento físico requerido para preservar líneas genéticas homogotas. Los nuevos híbridos interespecíficos e intergenéricos



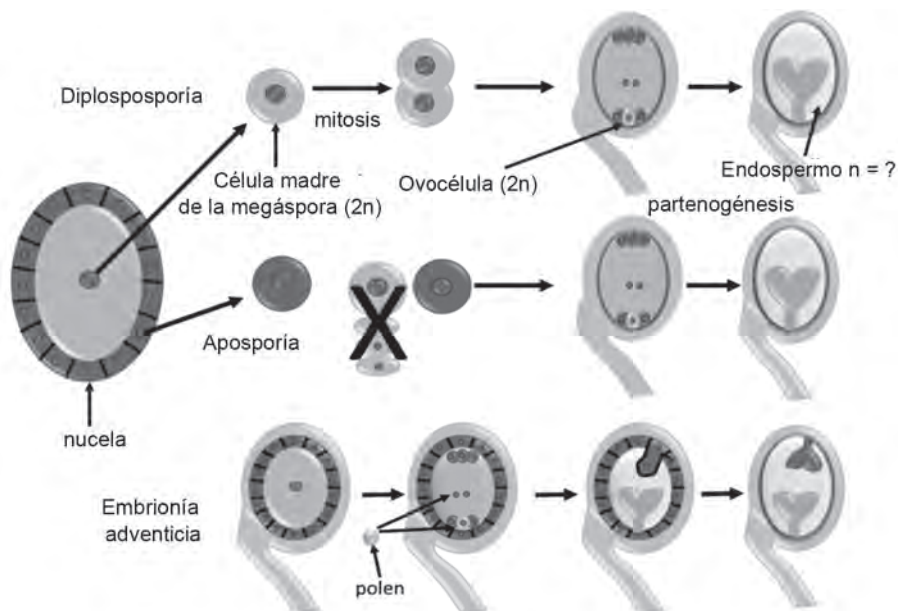


Figura 2. Tipos de apomixis en angiospermas. Primero se observa diplosporia, presente en poáceas, donde las células madre de las megásporas experimentan mitosis para formar un saco embrionario no reducido. En la aposporia, también presente en poáceas, el saco se forma a partir de células de la nucela. Por último, se observa embriónia adventicia.

Fuente: Elaboración propia

se pueden obtener y propagar fácilmente, lo que permite el desarrollo de genotipos mejor adaptados a los distintos ambientes.

En un inicio, en los programas de mejora genética en pasturas, la generación de híbridos entre especies apomícticas y no apomícticas se obstaculizó por las diferencias de ploidía. Este fenómeno constituyó un problema para los mejoradores hasta que el avance de la tecnología permitió la creación de biotipos poliploidizados, de interés para su cruce con los apomícticos.

La generación de híbridos en especies apomícticas incluye los procedimientos siguientes, según describe Quero-Carrillo *et al.* (2010):

- Los individuos sexuales diploides de la especie de interés agronómico se poliploidizan en laboratorio mediante cualquier agente inhibidor de la formación del uso acromático durante la mitosis, lo que induce la sexualidad poliploide.
- Los poliploides apomícticos se utilizan como polinizadores y la fertilización no representa un problema, cuando se usan individuos con el mismo nivel de ploidía con respecto a la planta hembra.
- La segregación de individuos apomícticos y sexuales mantiene la proporción mendeliana 1:1 en la

descendencia. Los individuos sexuales, genéticamente recombinados, se pueden integrar al grupo de progenitores futuros.

- Los híbridos apomícticos se evalúan para los atributos de interés, dado que el vigor híbrido queda integrado en el genoma.

A partir de este esquema, la identificación precoz del modo reproductivo en poblaciones híbridas ayudaría a identificar genotipos apomícticos con atributos de interés para que se conviertan en nuevos cultivares, capaces de mantener los caracteres deseados.

Tradicionalmente, en pasturas se utilizan descriptores morfológicos, así como el análisis de sacos embrionarios al microscopio para diferenciar genotipos sexuales de apomícticos (Savidan, 2000). A partir de 1990, con el desarrollo de técnicas biotecnológicas se comienzan a utilizar marcadores moleculares, con la ventaja de que brindan resultados en poco tiempo; además de que se puede utilizar cualquier tejido vegetal de plantas, sin importar el estado de crecimiento (Poblete-Vargas *et al.*, 2018). Se han realizado diversos estudios en busca de marcadores moleculares asociados a la apomixis en pastos. La tabla 1 muestra los más relevantes.

Tabla 1. Marcadores moleculares utilizados para la identificación de plantas apomícticas o sexuales en poáceas.

Especies	Tipo de apomixis	Marcador molecular	Referencias
<i>Brachiaria</i> sp.	aposporía	CAPS	Poblete-Vargas <i>et al.</i> (2018)
		RAPD	Zorzatto <i>et al.</i> (2010)
<i>Megathyrus maximus</i> (Jacq.) B. K. Simon & S. W. L. Jacobs	aposporía	RAPD	Bluma-Marques <i>et al.</i> (2014)
<i>Eragrostis curvula</i> (Schrader) Nees.	diplosporía	SSR, AFLP y GBS-SNP	Zappacosta <i>et al.</i> (2019)
<i>Hieriacium</i>	aposporía	AFLP	Catanach <i>et al.</i> (2006)
<i>Poa pratensis</i> L.	aposporía	AFLP, SAMPL y SCARs	Porceddu <i>et al.</i> (2002)
<i>Taraxacum officinale</i> Wigg.	diplosporía	SSR, AFLP	Mayesky <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypericum perforatum</i> L.	aposporía	RAPD, AFLP y SSR	Barcaccia <i>et al.</i> (2006)

En la actualidad, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son los marcadores moleculares que más se utilizan en estudios genéticos, y como apoyo a ellos surge en los últimos años el genotipado por secuenciación (GBS) (Zappacosta *et al.*, 2019). Los primeros mapas de ligamiento fueron desarrollados por Worthington *et al.* (2016) para una especie de pasto apomíctica poliploide (*Brachiaria decumbens* Stapf.) mediante la utilización de marcadores SNP, generados por GBS. Este mapa de ligamiento se ha utilizado para identificar marcadores vinculados a la región genómica específica de aposporia (ASGR).

En un estudio realizado por Zappacosta *et al.* (2019) se construyó el primer mapa de ligamiento saturado de *Eragrostis curvula*, donde se utilizaron marcadores moleculares tradicionales (AFLP y SSR) y de alto rendimiento (GBS-SNP). Estos autores identificaron el *locus* que controla la diplosporía y regiones reguladoras putativas que afectan la expresividad de dicho rasgo. Los análisis de *locus* de rasgo cuantitativo (QTL, por sus siglas en inglés), que tienen que ver con la expresividad de diplosporía en los híbridos F1, entre una variedad sexual y otra apomíctica, revelaron la presencia de dos QTL principales, ubicados a 3,27 y 15 cM del locus de diplosporía.

El análisis molecular de poblaciones híbridas F1, provenientes de individuos homocigotos, para la apomixis permite la construcción de mapas genéticos y la localización de marcadores moleculares asociados con la apomixis. Estas poblaciones están compuestas por individuos genéticamente cercanos, pero que tienen diferentes modos de reproducción, lo que permite hacer estudios de expresión para la identificación de genes candidatos que pudieran regular la apomixis.

Se han realizado muchos esfuerzos para transferir la apomixis a otros cultivos vía transformación genética, pero no se han alcanzado buenos resultados. Para aplicar la transgénesis es importante conocer las vías moleculares y los genes implicados en la apomixis. Con este objetivo, se desarrollaron varios estudios basados en hibridaciones interespecíficas entre plantas sexuales y apomícticas: el análisis del proceso en apomícticas naturales y la identificación de mutantes de especies sexuales que imitan la apomixis (Garbus *et al.*, 2017; Selva *et al.*, 2017).

El proceso de desarrollo de semillas apomícticas es complejo y comprende tres componentes: apomeiosis (que conduce a la formación de óvulos no reducidos), partenogénesis (desarrollo de embriones sin fertilización) y desarrollo funcional del endospermo (Kaushal *et al.*, 2019). Los componentes de apomeiosis y partenogénesis de la apomixis en otras gramíneas se heredan, generalmente, como un solo *locus* dominante, conocido como región genómica específica de aposporia (ASGR), identificada en *Pennisetum* (Ozias-Akins y Van Dijk, 2007). La ASGR contiene segmentos ricos y pobres en genes, donde varios genes pueden desempeñar una función determinada en el desarrollo apomíctico, así como muchas clases de elementos transponibles (Fiaz *et al.*, 2021).

Conne *et al.* (2015) encontraron en *Cenchrus* y *Pennisetum* un gen candidato para la partenogénesis: ASGR-BABY BOOM (ASGR-BBML). En estudios posteriores, este gen se combinó con otros, y se produjo una metodología para la obtención de semillas en arroz por vía asexual (Khanday *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

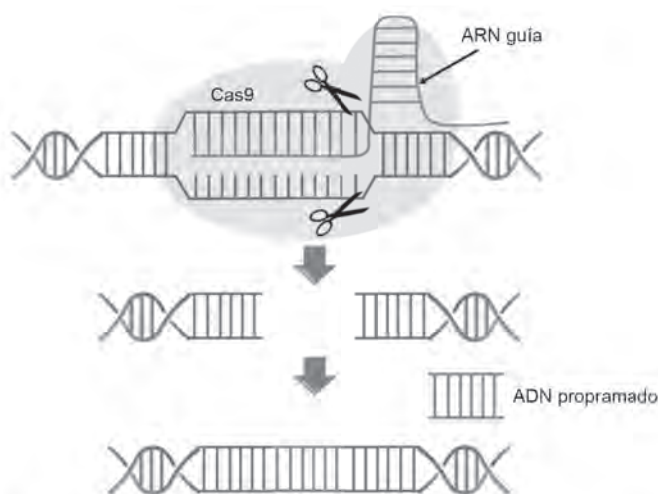


Figura 3. Tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9. La polimerasa junto al ARN guía abre la molécula de ADN en un punto específico o target, el cual se vuelve a cerrar por recombinación homóloga/no homóloga.

Fuente: Elaboración propia

*Aplicaciones de CRISPR en la mejora genética de pasturas.* Durante el año 1987, investigadores de la Universidad de Osaka, en Japón, descubrieron en el genoma de *Echerichia coli* cinco repeticiones de 29 nucleótidos, espaciados por 32 nucleótidos. Posteriormente, se identificaron en otras bacterias, como *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Mycobacterium tuberculosis*. El término CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas, por sus siglas en inglés) se designó para hacer referencia a estas secuencias repetidas. Se identificaron, además, genes asociados a CRISPR, denominados *Cas*, los que codifican para endonucleasas de restricción, conocidas como caspasas (Concepción-Hernández, 2018).

Se han identificado tres sistemas principales CRISPR, que tienen en común la presencia del componente CRISPR, un ARN guía y el componente *Cas*, que difiere para el tipo de sistema. En CRISPR I se activa Cas3, en el segundo sistema Cas9 y en CRISPR III Cas6 (Liu *et al.*, 2020).

El segundo sistema, CRISPR-Cas9, tiene dos componentes: el primero es una enzima (Cas9), que funciona como unas tijeras que cortan el ADN (las bacterias la utilizan para desarmar el genoma de virus invasores). El otro componente (CRISPR) es un ARN, que guía a las tijeras hacia una secuencia de nucleótidos específica, conocida como objetivo

o diana. Una vez encontrado el objetivo o *target*, la Cas9 abre la cadena de ADN, y posibilita la modificación de la secuencia de nucleótidos (Zúñiga-Orozco, 2018). La figura 3 muestra el modo de acción del complejo CRISPR-Cas9.

El sistema CRISPR / Cas9 de tipo II realiza cortes de doble hebra (DSB), justo antes de un motivo adyacente protoespaciador (PAM) de tres nucleótidos de longitud (NGG). Los DSB se pueden reparar mediante la vía de unión terminal no homóloga propensa a errores (NHEJ, por sus siglas en inglés) o por la vía de reparación de recombinación homóloga (HDR, por sus siglas en inglés), las que pueden generar mutantes (Svitashev *et al.*, 2016). Debido a que CRISPR/Cas9 funciona en trans, se puede crear una mutación en un locus distante del sitio de inserción del transgén. Mediante el mejoramiento tradicional, el transgén se puede eliminar sin afectar la mutación (Xu *et al.*, 2016). Estos mutantes son muy diferentes de las plantas transgénicas tradicionales, y pueden requerir menos o ninguna supervisión regulatoria (Liu *et al.*, 2018).

En muchas especies de pastos, los estudios genéticos se dificultan debido a la alta autoincompatibilidad y a la condición poliploide, como por ejemplo *Megathyrus virgatum* L. (Martínez-Reyna y Vogel, 2002). Para superar estas limitaciones, Liu *et al.* (2018) exploraron la viabilidad de utilizar CRISPR/Cas9 para la mutagénesis dirigida en un cultivar tetraploide de

*M. virgatum*. Para ello establecieron un ensayo transitorio mediante el uso de protoplastos de mesófilo, con el objetivo de validar la actividad CRISPR/Cas9. Estos autores demostraron además, que esta metodología es eficaz para crear mutaciones dirigidas de modo simultáneo.

CRISPR/Cas9 se ha utilizado ampliamente para la mutagénesis específica en un gran número de especies de plantas herbáceas de importancia agronómica, que incluyen arroz, sorgo, maíz y trigo (Svitashev *et al.*, 2016). Para los pastos, Capstaff y Miller (2018) hacen referencia a genes candidatos relacionados con procesos fisiológicos importantes para la planta. Este es el caso de los genes asociados a la familia del superóxido dismutasa férrica, responsables de la acumulación de biomasa, así como de los genes que se identifican en el enanismo, que se pueden utilizar para reducir el tamaño en especies de porte alto.

En especies forrajeras que no son gramíneas, como *Medicago sativa* L., se identificaron genes candidatos para mejorar caracteres de interés económico. A partir de ellos se podría utilizar el programa Biomercator para analizar genes ortólogos en poáceas bien estudiadas, como el arroz, y aumentar así la posibilidad de encontrar estos genes en gramíneas que se usan como pasturas. En *M. sativa* se encontraron genes como CONSTANS-LIKE, asociados a la floración y a la altura del tallo floral, lo que puede ser importante para especies de porte alto. Li *et al.* (2017) hacen referencia a genes como *Arabidopsis Enhanced Drought Tolerance1*, *HSP23* y a genes de la familia MsHSP, que mejoran la acumulación de biomasa, el contenido de sacarosa y de clorofila bajo estrés hídrico. De manera similar, se ha registrado que los genes MsERF9 y MsERF11 confieren tolerancia a la salinidad (Chen *et al.*, 2012).

### Conclusiones

Los marcadores moleculares permiten estudios de diversidad genética en pasturas. Con el avance de la tecnología, los marcadores más utilizados serán los SNP.

La apomixis es una forma de reproducción en muchas especies de pastos y constituye una herramienta necesaria para mantener y reproducir híbridos con características de interés agronómico. Por medio de marcadores moleculares es posible reconocer a edades tempranas las plantas apomícticas.

Con tecnologías de edición genómica, como CRISPR, se abre la posibilidad de mejorar caracteres en pasturas. Los caracteres candidatos son los relacionados con: mayor tolerancia a estrés biótico

y abiótico (especialmente sequía), aceleración de la tasa de rebrote, mayor cantidad y rapidez de acumulación de biomasa y contenido de proteína para forrajes.

### Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Estatal a Distancia (UNED) de Costa Rica por facilitar el acceso a las bases de datos consultadas.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

### Contribución de los autores

- Ayerin Carrodeguas-González. Realizó la búsqueda de literatura, la redacción y la creación del documento.
- Andres Zúñiga-Orozco. Realizó la búsqueda de literatura, la redacción y la creación del documento.

### Referencias bibliográficas

- Abdi, S.; Dwivedi, A.; Kumar, S. & Bhat, V. Development of EST-SSR markers in *Cenchrus ciliaris* and their applicability in studying the genetic diversity and cross-species transferability. *J. Genet.* 98:101. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31767818>, 2021.
- Acuña, C. A.; Martínez, E. J.; Zilli, A. L.; Brugnoli, Elsa A.; Espinoza, F.; Marcón, Florencia *et al.* Reproductive systems in *Paspalum*: Relevance for germplasm collection and conservation, breeding techniques, and adoption of released cultivars. *Front Plant Sci.* 10:1377, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01377>.
- Ahmar, S.; Gill, R. A.; Jung, K.-H.; Faheem, A.; Qasim, M. U.; Mubeen, M. *et al.* Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants. Recent advances and future outlook. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (7):2590, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>.
- Barcaccia, G.; Arzenton, F.; Sharbel, T.; Varotto, S.; Parrini, P. & Lucchin, M. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomict *Hypericum perforatum* L. *Heredity.* 96 (4):322-334, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800808>.
- Blackmore, T.; Thomas, I.; McMahon, R.; Powell, W. & Hegarty, M. Genetic-geographic correlation revealed across a broad European ecotypic sample of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using array-based SNP genotyping. *Theor. Appl. Genet.* 128:1917-1932, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2556-3>.
- Bluma-Marques, A. C.; Chiari, L.; Agnes, D. C.; Jank, L. & Pagliarini, M. S. Molecular markers linked to apomixis in *Panicum maximum* Jacq.



- Afr. J. Biotechnol.* 13 (22):2198-2202, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2014.13703>.
- Capstaff, N. M. & Miller, A. J. Improving the yield and nutritional quality of forage crops. *Front Plant Sci.* 9:535, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00535>.
- Carrodegua-Gonzalez, Ayerin & Zuñiga-Orozco, A. Bases para la mejora genética en *Gerbera hybrida*. *Repert. Cient.* 23 (2):51-62, 2020. DOI: <https://doi.org/10.22458/rc.v23i2.3000>.
- Catanach, A. S.; Erasmuson, Sylvia K.; Podivinsky, Ellen; Jordan, B. R. & Bicknell, R. Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. *PNAS.* 103 (49):18650-18655, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0605588103>.
- Chen, T.; Yang, Q.; Gruber, Margaret; Kang, J.; Sun, Y.; Ding, W. *et al.* Expression of an alfalfa (*Medicago sativa* L.) ethylene response factor gene MsERF8 in tobacco plants enhances resistance to salinity. *Mol. Biol. Rep.* 39 (5):6067-6075, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1421-y>.
- Collard, B. C. Y. & Mackill, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. T. Roy. Soc. A.* 363 (1491):557-572, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>.
- Concepción-Hernández, Mairénys. CRISPR/Cas: aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas. *Biotechnol. Veg.* 18 (3):135-149. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/585/html>, 2018.
- Conne, J. A.; Mookkan, M.; Huo, H.; Chae, K. & Ozias-Akins, Peggy. A parthenogenesis gene of apomictic origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *PNAS.* 112 (36):11205-11210, 2015. DOI: <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1505856112>.
- Fiaz, S.; Wang, X.; Younas, A.; Alharthi, B.; Riaz, A. & Ali, H. Apomixis and strategies to induce apomixis to preserve hybrid vigor for multiple generations. *GM Crops Food.* 12 (1):57-70, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1808423>.
- Garbus, Ingrid; Romero, J. R.; Selva, J. P.; Pasten, María C.; Chinestra, Carolina; Carballo, J. *et al.* De novo transcriptome sequencing and assembly from apomictic and sexual *Eragrostis curvula* genotypes. *PLoS One.* 12:e0185595, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185595>.
- Ghariani, S.; Elazreg, H.; Chtourou-Ghorbel, N.; Chakroun, M. & Trifi-Farah, N. Genetic diversity analysis in Tunisian perennial ryegrass germplasm as estimated by RAPD, ISSR, and morpho-agronomical markers. *Genet. Mol. Res.* 14 (4):18523-18533, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4238/2015.December.23.40>.
- Hamouda, M. Molecular analysis of genetic diversity in population of *Silybum marianum* (L.) Gaertn in Egypt. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 17 (1):12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0011-6>.
- Henderson, S. T.; Johnson, Susan D.; Eichmann, J. & Koltunow, Anna M. G. Genetic analyses of the inheritance and expressivity of autonomous endosperm formation in *Hieracium* with different modes of embryo sac and seed formation. *Ann. Bot.* 119 (6):1001-1010, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcw262>.
- Hojsgaard, D.; Klatt, Simone; Baier, R.; Carman, J. G. & Hörandl, Elvira. Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. *Crit Rev Plant Sci.* 33 (5):414-427, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898488>.
- Jiang, L. F. Diversity of *Lolium multiflorum* L based on SRAP markers worldwide. *Prataculture Anim. Husbandry.* 2017. DOI: <https://doi.org/10.3969/j.issn.2096-3971.2017.03.002>.
- Kaushal, P.; Dwivedi, K. K.; Radhakrishna, A.; Srivastava, M. K.; Kumar, V.; Roy, A. K. *et al.* Partitioning apomixis components to understand and utilize gametophytic apomixis. *Front Plant Sci.* 10:256, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00256>.
- Khanday, I.; Skinner, D.; Yang, B.; Mercier, R. & Sundaresan, V. A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature.* 565:91-95, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0785-8>.
- Kuwi, S. O.; Kyalo, M.; Mutai, C. K.; Mwilawa, A.; Hanson, J. & Djikeng, A. *et al.* Genetic diversity and population structure of *Urochloa* grass accessions from Tanzania using simple sequence repeat (SSR) markers. *Braz. J. Bot.* 41:699-709, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-018-0482-8>.
- Li, Z.; Long, R.; Zhang, T.; Wang, Z.; Zhang, F.; Yang, Q. *et al.* Molecular cloning and functional analysis of the drought tolerance gene MsHSP70 from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Plant Res.* 130 (2):387-396, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0905-9>.
- Liu, Y.; Merrick, P.; Zhang, Z.; Ji, C.; Yang, B. & Fei, S.-Z. Targeted mutagenesis in tetraploid switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 16 (2):381-393, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12778>.
- Liu, Z.; Dong, H.; Cui, Y.; Cong, Lina & Zhang, D. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microb. Cell Fact.* 19 (1):172, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z>.
- Loera-Sánchez, M.; Studer, B. & Kölliker, R. DNA-Based assessment of genetic diversity in grassland plant species: challenges, approaches, and applications. *Agronomy.* 9:881, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9120881>.
- Luo, Y.; Zhang, X.; Xu, J.; Zheng, Y.; Pu, S.; Duan, Z. *et al.* Phenotypic and molecular marker analysis uncovers

- the genetic diversity of the grass *Stenotaphrum secundatum*. *BMC Genetics*. 21 (1):86, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00892-w>.
- Majeský, L.; Vašut, R. J.; Kitner, M. & Trávníček, B. The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. *PLoS One*. 7 (8):e41868, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041868>.
- Martínez-Reyna, J. M. & Vogel, K. P. Incompatibility systems in switchgrass. *Crop Sci*. 42:1800-1805, 2002. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1800>.
- Morales-Nieto, C. R.; Avendaño-Arrazate, C.; Melgoza-Castillo, Alicia; Gil-Vega, Katia del C.; Quero-Carrillo, A.; Jurado-Guerra, P. *et al.* Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) en Chihuahua, México. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 7 (4):455-469. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242016000400455&lng=es&tln=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242016000400455&lng=es&tln=es), 2016.
- Mujjassim, N. E.; Mallik, M.; Rathod, N. K. K. & Nitesh, S. D. Cisgenesis and intragenesis a new tool for conventional plant breeding: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem*. 8:2485-2489, 2019.
- Muktar, M. S.; Teshome, A.; Hanson, J.; Habte, E.; Domelevo, J. B. & Lee, K. W. *et al.* Genotyping by sequencing provides new insights into the diversity of Napier grass (*Cenchrus purpureus*) and reveals variation in genome-wide LD patterns between collections. *Sci. Rep.* 9:6936, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43406-0>.
- Nadeem, M. A.; Amjad, M.; Qasim, M.; Doğan, Y.; Comertpay, G. & Yildiz, M. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 32 (2):261-285, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>.
- Ngoyawu, M.; Hanson, J.; Ekaya, W. N.; Kinyamario, J. I.; Mweki, P.; Lall, G. *et al.* Genetic variation between ecotypic populations of *Chloris roxburghiana* grass detected through RAPD analysis. *Afr. J. Range Forage Sci.* 22 (2):107-115, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2989/10220110509485868>.
- Nybom, H.; Weising, K. & Rotter, B. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investig. Genet.* 5 (1):2223-2241, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/2041-2223-5-1>.
- Ozias-Akins, Peggy & Van Dijk, P. J. Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu. Rev. Genet.* 41:509-537, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090511>.
- Peltier, E.; Sharma, V.; Martí-Raga, Maria; Ronconroni, M.; Bernard, Margaux; Jiranek, V. *et al.* Dissection of the molecular bases of genotype x environment interactions: a study of phenotypic plasticity of *Saccharomyces cerevisiae* in grape juices. *BMC Genomics*. 19 (1):772, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5145-4>.
- Poblete-Vargas, J.; Valadez-Moctezuma, Ernestina; García-de-los-Santos, G.; Martínez-Flores, C. & Peralta-Martínez, A. Differentiation of apomictic and sexual genotypes of *Brachiaria* spp., using molecular markers. *Ecosistemas y recur. agropecuarios*. 5 (13):71-80, 2018. DOI: <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1180>.
- Porceddu, A.; Albertini, E.; Barcaccia, G.; Falistocco, Egizia & Falcinelli, M. Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor. Appl. Genet.* 104 (2-3):273-280, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220100659>.
- Quero-Carrillo, A. R.; Enríquez Quiroz, J. F.; Morales-Nieto, C. R. & Miranda-Jiménez, Leonor. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales: Revisión. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 1 (1):25-42. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242010000100003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242010000100003&lng=es&nrm=iso), 2010.
- Raza, A. & Shahi, M. S. Next-generation sequencing technologies and plant molecular virology: a practical perspective. In: L. P. Awasthi, ed. *Applied plant virology*. Cambridge, USA: Academic Press. p. 131-140, 2020.
- Romero, María; Mujica, A.; Pineda, E.; Camapaza, Y. & Zavalla, N. Genetic identity based on simple sequence repeat (SSR) markers for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Cienc. Inv. Agr.* 46 (2):166-178, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v45i2.2144>.
- Savidan, Y. *Apomixis: genetics and breeding*. J. Janick, ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc. Plant breeding reviews. Vol. 18, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470650158.ch2>.
- Schmidt, A. Controlling apomixis: shared features and distinct characteristics of gene regulation. *Genes, Basel*. 11 (3):329, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11030329>.
- Selva, J. P.; Siena, L.; Rodrigo, J. M.; Garbus, I.; Zappacosta, D. & Romero, J. R. *et al.* Temporal and spatial expression of genes involved in DNA methylation during reproductive development of sexual and apomictic *Eragrostis curvula*. *Sci. Rep.* 7:15092, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14898-5>.
- Soliman, M.; Espinoza, F.; Ortiz, J. P. A. & Delgado, Luciana. Heterochronic reproductive developmental processes between diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum rufum*. *Ann. Bot.* 123 (5):901-915, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcy228>.
- Sun, M.; Zhang, C.; Zhang, X. Q.; Fan, Y.; Fu, K.; Wu, W. *et al.* AFLP assessment of genetic variability and relationships in an Asian wild germplasm collection

- of *Dactylis glomerata* L. *C. R. Biol.* 340 (3):145-155, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.12.003>.
- Svitashev, S.; Schwartz, Christine; Lenderts, B.; Young, J. K. & Mark-Cigan, A. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleo-protein complexes. *Nat Commun.* 7:13274, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms13274>.
- Svitashev, S.; Young, J. K.; Schwartz, Christine; Gao, H.; Falco, S. C. & Cigan, A. M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* 169:931-945, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00793>.
- Tibihika, P. D.; Curto, M.; Dornstaeder-Schrammel, E.; Winter, S.; Alemayehu, E.; Weidbacher, H. *et al.* Application of microsatellite genotyping by sequencing (SSR-GBS) to measure genetic diversity of the East African *Oreochromis niloticus*. *Conserv. Genet.* 20:357-372, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1136-x>.
- Wang, C.; Liu, Q.; Shen, Y.; Hua, Y.; Wang, J. & Lin, J. *et al.* Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nat. Biotechnol.* 37:283-286, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0003-0>.
- Watson, A.; Ghosh, S.; Williams, M. J.; Cuddy, W. S.; Simmonds, J. & Rey, M. D. *et al.* Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nat. Plants.* 4:23-29, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0083-8>.
- Worthington, Margaret; Heffelfinger, C.; Bernal, Diana; Quintero, Constanza; Zapata, Yeny P.; Perez, J. G. *et al.* A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics.* 203 (3):1117-1132, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.116.190314>.
- Xu, K.; Wang, Y.; Shi, Lili; Sun, F.; Liu, S. & Xi, Y. PvTB1, a Teosinte Branched1 gene homolog, negatively regulates tillering in switchgrass. *J. Plant Growth Regul.* 35 (1):44-53, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9505-x>.
- Zappacosta, D.; Gallardo, Jimena; Carballo, J.; Meier, M.; Rodrigo, J. M.; Gallo, C. A. *et al.* A high-density linkage map of the forage grass *Eragrostis curvula* and localization of the diplospory locus. *Front Plant Sci.* 10:918, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00918>.
- Zorzatto, C.; Chiari, L.; Bitencourt, G. de A.; Valle, C. B. do; Leguizamón, G. O. de C.; Schuster, I. *et al.* Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Plant Breeding.* 129:734-736, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2010.01763.x>.
- Zúñiga-Orozco, A. Tecnología CRISPR-Cas9: una herramienta aplicable en la agricultura de Costa Rica. *Repert. Cient.* 20 (2):131-138, 2018. DOI: <https://doi.org/10.22458/rc.v20i2.2396>.