

Polimorfismos Isoenzimáticos en Cuatro Cultivares de Pasto Llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees¹

M.A. Di Renzo*, M.M. Poverene**, I.N. Tiranti*, M.I. Medina*

ABSTRACT

Eragrostis curvula s. lat. is an apomictic complex with some forms with sexual or facultative apomictic reproduction. Sexuality has usually been detected using progeny tests and cytological observations. This work examined isozymic analysis as a better way of revealing variability originated from sexual reproduction or clone mixtures. Four probably facultative apomictic cultivars were used to run isozyme analyses of esterases and peroxidases. Cultivars Villa Mercedes and Don Mario were monomorphic with indices of average polymorphism and pooled average equal zero ($P_j\bar{x} = \bar{P} = 0$). Cultivar Don Walter gave $P_j\bar{x} = \bar{P} = 0.24$, with two isozyme phenotypes for both enzymes. Cultivar Kromdraai gave $P_j\bar{x} = 0.34$ and $\bar{P} = 0.68$, with seven patterns for esterases and six for peroxidases. Chromosome counts showed different cytotypes with $2n = 40, 60, 70$ and 80 in Kromdraai, while the other strains had $2n = 40$. These results indicated that the method used for the detection of isozyme polymorphism is useful to describe and quantify cultivar variability resulting from sexual reproduction or clonal blending.

COMPENDIO

El complejo apomictico *Eragrostis curvula* posee algunas formas sexuales y apomicticas facultativas que han posibilitado el mejoramiento genético en esta gramínea. La detección de cultivares con sexualidad, normalmente, se realiza por pruebas de progenie y/o análisis citológicos. El objetivo de este trabajo fue utilizar el análisis de polimorfismos isoenzimáticos para detectar y evaluar la existencia de variabilidad, generalmente producida por sexualidad, a fin de verificar si este método ofrecía ventajas sobre los antes mencionados. Se analizaron esterases y peroxidases en cuatro cultivares con antecedentes de sexualidad. Los cultivares Villa Mercedes y Don Mario resultaron monomórficos, por lo que los índices de polimorfismos, promedio y promedio ponderado, fueron cero ($P_j\bar{x} = \bar{P} = 0$). En el cultivar Don Walter, $P_j\bar{x} = \bar{P} = 0.24$, con dos fenotipos isoenzimáticos para cada una de las enzimas analizadas. En el cultivar Kromdraai, $P_j\bar{x} = 0.34$ y $\bar{P} = 0.68$, con siete y seis patrones para esterases y peroxidases respectivamente. Recuentos cromosómicos demostraron que 'Kromdraai' comprende citotipos con $2n = 40, 60, 70$ y 80 , en tanto que los restantes cultivares tuvieron $2n = 40$ cromosomas. Los resultados mostraron que el método utilizado es adecuado para detectar y cuantificar la variabilidad existente en cultivares que, por tener reproducción sexual o por ser una mezcla de clones, presentan polimorfismos isoenzimáticos.

INTRODUCCION

E*ragrostis curvula* s. lat. (Poaceae) comprende varias formas botánicas de interés como forrajeras, conocidas vulgarmente como "pasto llorón". Considerado otrora como apomictico obligado, este complejo ha demostrado poseer formas sexuales (8, 10) y apomicticas facultativas (11) que han posibilitado el desarrollo de nuevas técnicas para el mejoramiento genético de esta gramínea por medio de hibridación (9, 12, 13). No obstante, la mayor parte de las líneas de valor forrajero consiste en genotipos poliploides altamente apomicticos, donde la sexualidad es poco frecuente. La identificación de plantas sexuales en ecotipos naturales y entre los descendientes de

hibridaciones entre plantas sexuales y apomicticas se hace por pruebas de progenie y por análisis citológicos del desarrollo del saco embrionario (12, 15). En las progenies se mide la variabilidad para numerosos caracteres, generalmente cuantitativos, en 10 a 20 plantas durante la primera estación de crecimiento y, en ocasiones, también se toman datos durante el segundo año. La exactitud de estas pruebas para determinar el tipo de reproducción en un apomictico facultativo, puede ser cuestionada, ya que su valor puede variar con el grado de sexualidad de los progenitores (13). Las pruebas citológicas han demostrado ser un buen complemento para la estimación de sexualidad (1, 10, 11, 15) aunque el análisis del saco embrionario es un procedimiento tedioso y laborioso y tiene un valor cuestionable (7). Brix (1) utilizó ambos métodos en la evaluación de progenies individuales de *E. curvula* cv. Kromdraai, y encontró diversos grados de variabilidad fenotípica y tres tipos de saco embrionario en distintas proporciones, y concluyó que la selección dentro de este cultivar debería conducir a la producción de nuevos biotipos valiosos como plantas forrajeras.

¹ Recibido para publicación el 4 de enero 1989.
Trabajo financiado por el Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR), República Argentina

* Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5800 Río Cuarto, República Argentina.

** Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, República Argentina.

La electroforesis de isoenzimas ofrece una interesante alternativa para la búsqueda de variabilidad en progenies de *E. curvula*. La observación del fenotipo isoenzimático revela la variación existente sin necesidad de analizar caracteres morfológicos de tipo cuantitativo. La expresión de las isoenzimas presenta una adecuada variabilidad en plantas de *E. curvula* de uno a dos meses (4). Durante un trabajo previo de caracterización electroforética con fines de identificación varietal, Poverene *et al.* (6) encontraron polimorfismos isozímicos en plantas del cv. Kromdraai. Este hallazgo contrastó con la uniformidad observada en los restantes cultivos de *E. curvula* y se presumió que podía ser debida a la existencia de reproducción sexual en ese cultivar. Las frecuencias de los distintos fenotipos isoenzimáticos proporcionarían entonces una medida de la variabilidad existente en la población en estudio.

El objetivo de este trabajo fue determinar y evaluar a través del análisis de polimorfismos isoenzimáticos, la posible variabilidad producida por sexualidad en cuatro cultivares de *E. curvula*, a fin de verificar si este método ofrece ventajas en el control de progenies.

MATERIALES Y METODOS

Características de los cultivares

Se analizaron los cultivares de *E. curvula* 'Don Walter', 'Villa Mercedes', 'Kromdraai' y 'Don Mario', con antecedentes de sexualidad. Los dos primeros corresponden a la variedad Conferta, dentro de la cual se han hallado plantas sexuales diploides y tetraploides (8, 10); el tercer cultivar parece ser apomítico facultativo (1), y el cuarto se obtuvo por hibridación entre plantas sexuales de la variedad Conferta y el cultivar apomítico 'Tanganyika' (Covas, 1986, comunicación personal).

Procedimiento de electroforesis

Extractos crudos de hoja joven completamente expandida se sometieron a electroforesis en geles de almidón al 12%, utilizándose los siguientes sistemas de "buffers": Sistema I, para el revelado de esterasas: "buffer" del gel tris-cítrico 15 mM pH 7.8, "buffer" de electrodos borato de sodio 0.3 M pH 8.6. Estas isoenzimas son de migración exclusivamente anódica en estas condiciones. Sistema II, para el revelado de peroxidases: "buffer" del gel histidina-cítrico 9 mM pH 5.7, "buffer" de electrodos histidina-cítrico 65 mM pH 5.7. Estas isoenzimas son de migración exclusivamente catódica.

En ambos casos, un trozo de lámina de 10 cm de largo fue macerada en mortero con 150 μ l de "buffer" del gel y se absorbió en pequeños rectángulos de papel Whatman no. 3, los cuales fueron insertados en ranuras practicadas en el gel. Se aplicó una corriente constante de 20 mA, manteniendo el gel a 4° centígrados.

El revelado de isoenzimas se realizó de la siguiente forma:

- Esterasas: 100 ml de "buffer" tris-HCl 0.1 M pH 6.0 conteniendo 5 mg de Fast Garnet GBC (orto-aminoazotolueno) con el agregado de 2 ml de alfa-naftil acetato al 0.1% en acetona al 50 por ciento. El gel se incubó en oscuridad a 37°C durante unas dos horas.
- Peroxidases: 100 ml de "buffer" acetato de sodio 0.1 M conteniendo 50 mg de 3-amino 9-etil carbazol disueltos en 5 ml de dimetilformamida. En el momento del revelado se agregó 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 10% y se incubó a temperatura del ambiente.

Los diferentes fenotipos isoenzimáticos hallados se identificaron con letras sucesivas (Fig. 1). Los criterios utilizados en la determinación de cada fenotipo fueron la posición, el ancho y la intensidad relativa de las bandas. Los polimorfismos fenotípicos se estimaron mediante las siguientes fórmulas de Kahler *et al.*, (3):

$$P_j = \sum_{i=1}^n p_i (1 - p_i) = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

En donde P_j estima el polimorfismo fenotípico para cada enzima y cultivar, p_i es la frecuencia del i -ésimo fenotipo y n es el número de fenotipos observados por enzima y cultivar.

$$\bar{P} = \frac{\sum_{j=1}^k (1/N_j) p_j}{\sum_{j=1}^k (1/N_j)}$$

En donde \bar{P} estima el promedio ponderado de los polimorfismos fenotípicos calculado sobre todas las enzimas analizadas; N_j es el número total de fenotipos diferentes observados por enzima sobre todos los cultivares estudiados, desde la j -ésima hasta la k -ésima enzima.

Debido a que se observó cierta variación morfológica entre las plantas, especialmente en el cv. Kromdraai, se efectuaron recuentos de cromosomas en los cuatro cultivares. Para ello se trataron previamente puntas de raíces con 1-bromonaftaleno durante una noche a 4°C; a continuación se fijaron en etanol y ácido acético glacial (3:1 v/v) durante 24 horas y se colorearon por Feulgen, reforzando la coloración con hematoxilina acética (5).

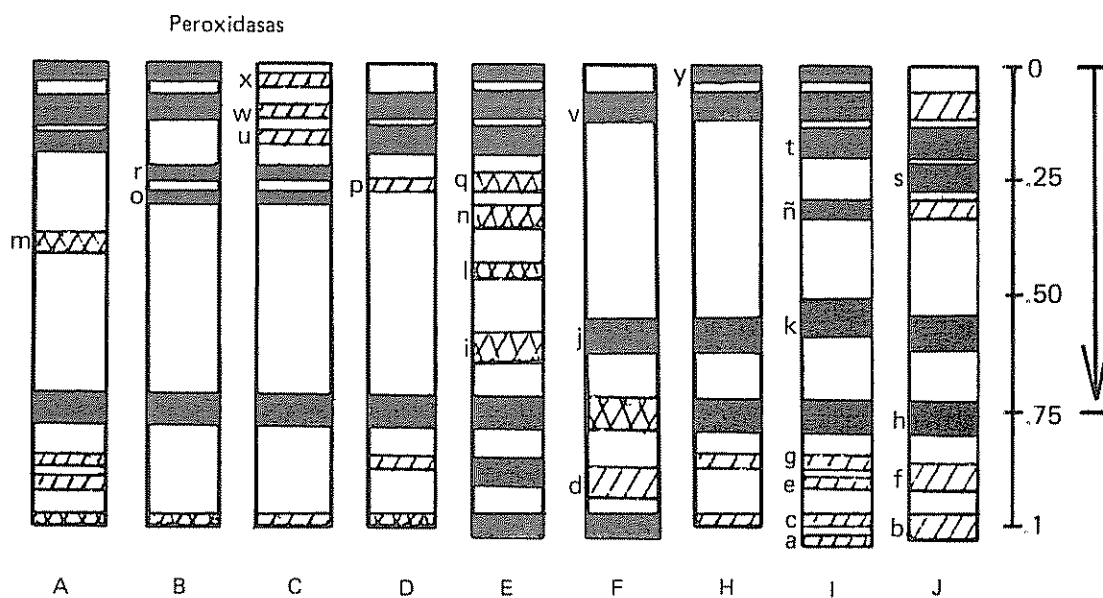
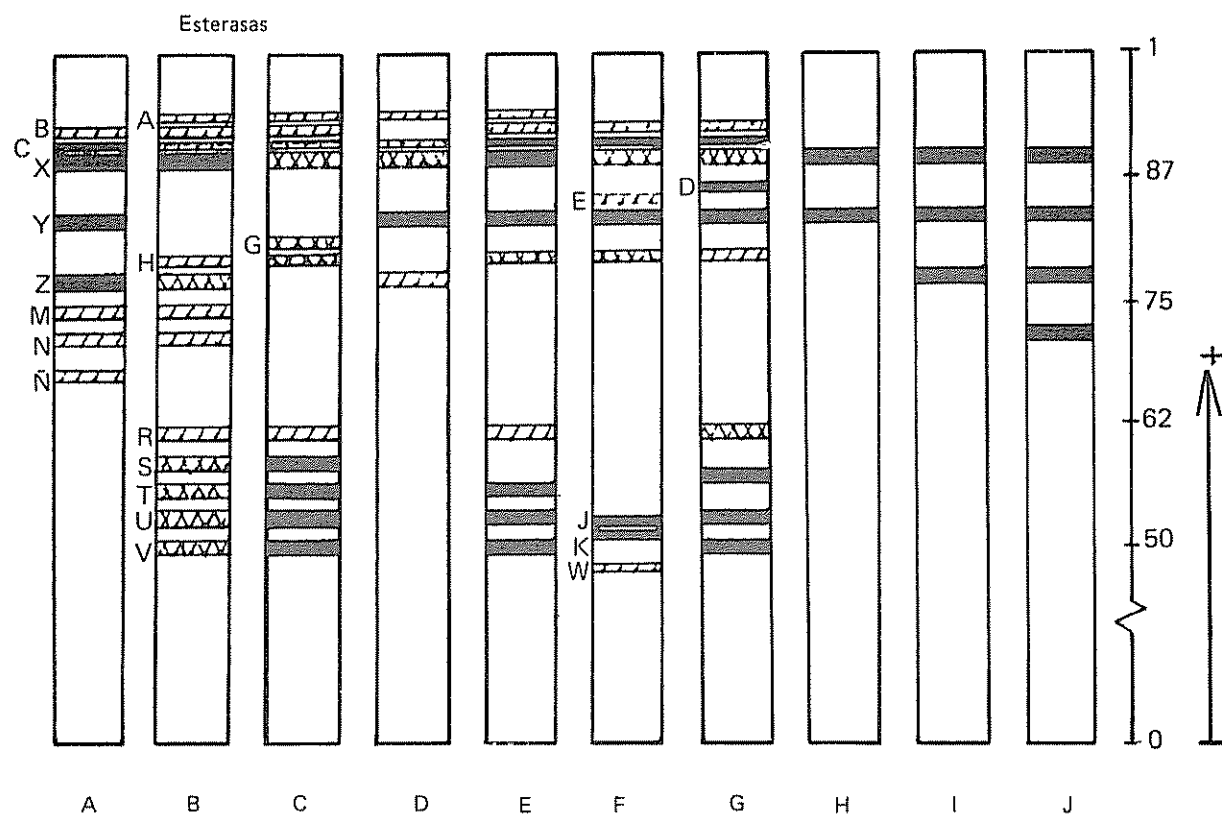


Fig 1. Representación esquemática de los fenotipos isoenzimáticos. Intensidad de coloreado de las bandas: Baja, Intermedia, Alta

RESULTADOS

Se analizaron 97 plantas, encontrándose 19 fenotipos isoenzimáticos diferentes, 10 correspondientes a esterasas y nueve a peroxidasas. El número de bandas varió considerablemente, desde dos a 13 por zimograma (Figs. 1 a 3) *Eragrostis curvula* cv. Villa Mercedes y cv. Don Mario presentaron un patrón único para esterasas y peroxidasas. El cv. Don Walter presentó dos patrones de cada enzima y el cv. Kromdraai mostró siete y seis patrones respectivamente, cada uno con diversas frecuencias (Cuadros 1 y 2). En los cultivares polimórficos se observó una marcada asociación entre los zimogramas de esterasas y los de peroxidasas; por ejemplo, todas las plantas que mostraron el patrón A de esterasas mostraron asimismo el patrón A de peroxidasas, tal como se demuestra en los Cuadros 2a y 2b.

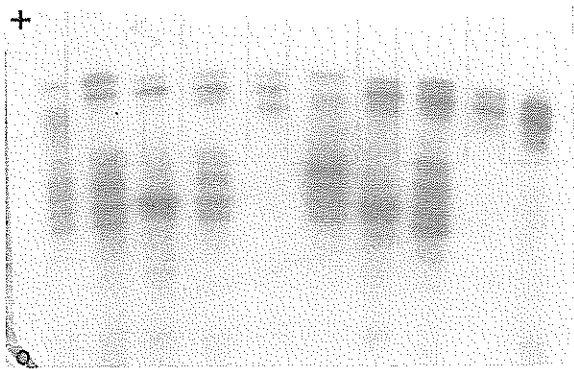


Fig 2 Zimogramas de esterasas foliares de pasto llorón, separadas en gel de almidón

En el Cuadro 3 aparecen las medidas del polimorfismo fenotípico (P_j) por enzima y cultivar, el promedio ($P_j\bar{x}$) y el promedio ponderado (\bar{P}) del polimorfismo fenotípico por cultivar. Los recuentos cromosómicos mostraron $2n = 40$ cromosomas en las células del meristema radicular de *E. curvula* cv. Villa Mercedes, cv. Don Walter y cv. Don Mario, en tanto que en *E. curvula* cv. Kromdraai se encontraron plantas con $2n = 40, 60, 70$ y 80 cromosomas (Fig. 4)

Cuadro 2a. Frecuencias fenotípicas observadas para esterasas en cultivares de *Eragrostis curvula*.

Cultivares de <i>E. curvula</i>	Plantas (núm.)	Fenotipos isoenzimáticos									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
'Don Walter'	23	-	-	-	-	-	-	-	0.13	0.87	-
'Don Mario'	25	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
'V. Mercedes'	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
'Kromdraai'	26	0.38	0.04	0.11	0.08	0.27	0.08	0.04	-	-	-

Cuadro 1. Fenotipos isoenzimáticos hallados en cultivares de *Eragrostis curvula*

Cultivares de <i>E. curvula</i>	Isoenzimas	
	Esterasas (núm.)	Peroxidasas (núm.)
'Don Walter'	2	2
'Don Mario'	1	1
'Villa Mercedes'	1	1
'Kromdraai'	7	6
Total	10	9

DISCUSION

Se encontraron variantes isoenzimáticas en dos de los cuatro cultivares analizados. *Eragrostis curvula* cv. Villa Mercedes y cv. Don Mario resultaron ser poblaciones uniformes ($P_j\bar{x} = \bar{P} = 0$). Esta ausencia de variabilidad no implica necesariamente ausencia de sexualidad, sino más bien una relación con la forma de mejoramiento y selección de las especies de reproducción asexual. Los ecótipos naturales de *E. curvula* se seleccionan por su vigor y uniformidad, de modo que normalmente son poliploides y altamente apomicticos (14). Aun cuando *E. curvula* cv. Villa Mercedes es de tipo 'Conferta', posiblemente la sexualidad en el ecótipo original es poco frecuente. *E. curvula* cv.

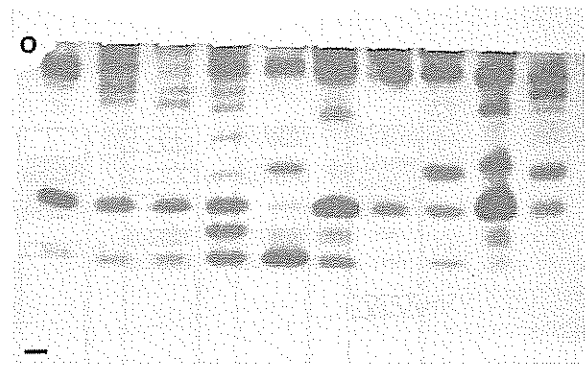


Fig 3. Zimogramas de peroxidasas foliares de pasto llorón, separadas en gel de almidón

Cuadro 2b. Frecuencias fenotípicas observadas para peroxidasas en cultivares de *Eragrostis curvula*

Cultivares de <i>E. curvula</i>	Plantas (núm.)	Fenótipos isoenzimáticos									
		A	B	C	D	E	F	H	I	J	
'Don Walter'	22	-	-	-	-	-	-	0.14	0.86	-	-
'Don Mario'	14	-	-	-	-	-	-	-	I	-	
'V. Mercedes'	20	-	-	-	-	-	-	-	-	I	
'Kromdraai'	30	0.50	0.03	0.10	0.07	0.33	0.07	-	-	-	

Don Walter, del mismo tipo, presentó un $P_j\bar{x}=P=0.24$, pero sólo dos fenótipos isoenzimáticos diferentes (Cuadros 2a y 2b), estando uno de ellos representado por tres individuos de un total de 23 analizados

Cuadro 3. Medidas del polimorfismo fenotípico (P_j) por enzima y cultivar, del promedio ($P_j\bar{x}$) y promedio (\bar{P}) del polimorfismo fenotípico por cultivar de *Eragrostis curvula*

Cultivares de <i>E. curvula</i>	Isoenzimas (P_j)		$P_j\bar{x}$	\bar{P}
	Esterasas	Peroxidasas		
'Don Walter'	0.23	0.24	0.24	0.24
'Don Mario'	0	0	0	0
'V. Mercedes'	0	0	0	0
'Kromdraai'	0.75	0.62	0.34	0.68

Por otra parte, la hibridación de plantas sexuales con apomicticas tetraploides, origen de *E. curvula* cv. Don Mario, produce normalmente 40% de descendientes apomicticos, 10 a 20% de intermedios (apomicticos facultativos) y 40 a 50% de descendientes sexuales. Los apomicticos más uniformes son evaluados como potenciales nuevos cultivares (12). Es posible que este cultivar sea en efecto altamente apomictico

A diferencia de los anteriores, *E. curvula* cv. Kromdraai presenta una proporción apreciable de variabilidad isoenzimática. Las diferencias entre el polimorfismo promedio, $P_j\bar{x}=0.34$ y el promedio ponderado, $\bar{P}=0.68$ se debe a las diferencias entre las frecuencias observadas entre los distintos zimótipos. Dos de ellos, A y E, son predominantes, mientras que el resto se presenta en frecuencias relativamente bajas. Si la variabilidad isozimica efectivamente refleja la existencia de reproducción sexual, las diferencias entre frecuencias pueden interpretarse del modo siguiente: un ocasional saco embrionario sexual origina una planta con fenotipo recombinante, la cual a su vez se reproduce predominantemente en forma apomictica, por lo cual la frecuencia de ese fenotipo isoenzimático aumenta rápidamente en la población. Los zimótipos más fre-

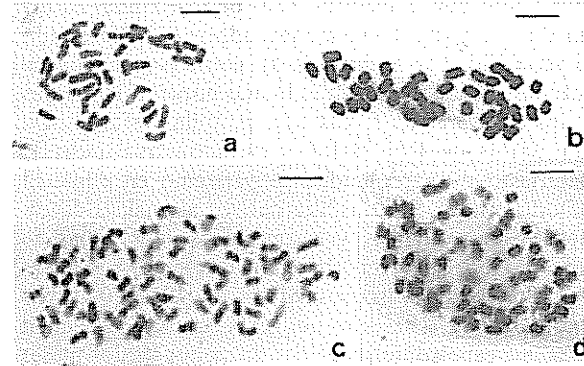


Fig. 4. Cromosomas en puntas de raíz de pasto llorón: a-cv Don Walter, $2n = 40$ b-d: cv Kromdraai, $2n = 40$, 70 y 60 respectivamente. Barra = 5 μ m

cuentes tendrían así su origen en un episodio de sexualidad más antiguo que los zimótipos menos frecuentes. De esta manera, la población de *E. curvula* cv. Kromdraai resultaría en un conjunto de clones que se reproducen normalmente en forma apomictica y ocasionalmente en forma sexual. Esta hipótesis explicaría también la alta asociación observada entre los zimogramas de esterazas y peroxidasas

La mayor variabilidad de *E. curvula* cv. Kromdraai con respecto de los otros cultivares podría deberse al hecho de no haberse destacado por sus aptitudes agronómicas y, por lo tanto, no ha sido sometido a fuertes presiones de selección artificial. Las variantes morfológicas entre plantas de este cultivar constituyen una prueba en este sentido (4).

Una hipótesis alternativa para explicar la variabilidad isoenzimática y la variación morfológica de *E. curvula* cv. Kromdraai, consiste en considerarlo como una mezcla artificial de clones, como resultado de una mezcla de semillas de distintos genótipos en la población original. El hecho de encontrar diversos números cromosómicos en este cultivar apoya tal consideración, si bien ocasionales cruzamientos, seguidos de reproducción asexual, también justificarían la variación en el número de cromosomas (2). Por otra parte, el origen de los cultivares de *E. curvula* es generalmente incierto y no existen registros apropiados de las in-

roducciones de esta forrajera. La variabilidad de *E. curvula* cv. Kromdraai podría ser atribuida con certeza a ocasionales episodios de sexualidad o bien a la existencia de diferentes clones dentro de la población por medio del análisis de descendencias de plantas individuales, representantes de cada zimótipo, lo cual se está llevando a cabo actualmente.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este ensayo se puede concluir que la electroforesis de isoenzimas ha demostrado ser una técnica adecuada para la detección de variabilidad en *E. curvula*, así como para su cuantificación. El análisis de un reducido número de plantas de los cultivares de *E. curvula* cv. Villa Mercedes, cv. Don Mario, cv. Don Walter y cv. Kromdraai puso de manifiesto diversos grados de variación en ellos. El método provee criterios alternativos al análisis de caracteres morfológicos y agronómicos en pruebas de progenie, por cuanto permite analizar simultáneamente varios sistemas isoenzimáticos en 10 a 20 o más plantas, según el tamaño del gel. Las pruebas pueden llevarse a cabo sobre progenies de menos de dos meses de edad, acortando significativamente el proceso de control. Asimismo ofrece ventajas sobre las pruebas citológicas, debido a la sencillez y rapidez de las técnicas electroforéticas. No obstante, el análisis isoenzimático puede también complementarse con recuentos cromosómicos o mediante el registro de algunos caracteres morfológicos de tipo cualitativo.

LITERATURA CITADA

1. BRIX, K. 1974. Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Z. Pflanzenzuchtg. 71: 25-32.
2. HARLAN, J.; DE WEI, J. M. J. 1975. On O. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. The Botanical Review 41:361-390.
3. KAHLER, A. L.; ALLARD, R. W.; KRZAKOWA, M.; WEHRHAHN, C.; NEVO, E. 1980. Associations between isozyme phenotypes and environment in the slender wild oat (*Avena barbata*) in Israel. Theoretical and Applied Genetics 56:31-47.
4. MEDINA, M. I.; DI RENZO, M. A.; TIRANTI, I. N. 1985. Identificación de cultivares de "pasto llorón", *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, por medio de esterases, fosfatasa y peroxidasa. Revista de Investigaciones Agropecuarias (Arg.) 20:1-9.
5. NUÑEZ, O. 1968. An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. Cytologia 21: 115-119.
6. POVERENE, M. M.; DI RENZO, M. A.; CURVETTO, N. R. 1988. Diferenciación de cultivares de "pasto llorón", *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, mediante electroforesis de isoenzimas en Argentina. Turrialba 38:173-178.
7. SMITH, R. L. 1972. Sexual reproduction in *Panicum maximum* Jacq. Crop Science 12:624-627.
8. VOIGT, P. W. 1971. Discovery of sexuality in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Crop Science 11:424-425.
9. VOIGT, P. W. 1984. Breeding apomictic lovegrasses: Forage potential of Boer x Weeping hybrids. Crop Science 24:115-118.
10. VOIGT, P. W.; BASHAW, E. 1972. Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. Crop Science 12:843-847.
11. VOIGT, P. W.; BASHAW, E. 1976. Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. Crop Science 16:803-806.
12. VOIGT, P. W.; BURSON, B. L. 1983. Breeding of apomictic *Eragrostis curvula*. In International Grassland Congress, 14th. Ed. by J. A. Smith, V. W. Hays. Westview Press. Proc. USA. pp. 160-163.
13. VOIGT, P. W.; BURSON, B. L.; ENGELKE, M. 1977. Breeding apomictic grasses. In Southern Pasture and Forage Crop Improvement Conference, 34th. Proc. pp. 104-112.
14. VORSTER, I. B.; LIEBENBERG, H. 1977. Cytogenetic studies in the *Eragrostis curvula* complex. Bothalia (S. Afr.) 12:215-221.
15. VORSTER, I. B.; LIEBENBERG, H. 1984. Classification of embryo sacs in the *Eragrostis curvula* complex. Bothalia (S. Afr.) 15:167-174.