Estimación de la diversidad isoenzimática en dos especies de *Bromus*[1]

D. A. Aiassa[*], *M. A. Di Renzo*[**], *M. A. Ibáñez*[**]

ABSTRACT

This paper analyzes intra- and interpopulation variability in five natural populations of *B. auleticus* and two populations of *B. catharticus*, to obtain data for formulating strategies to be used in future collecting field trips, and in the improvement of species germ plasm. Individual electrophoretic analyses were carried out using crude leaf extract taken from 20 to 25 plantlets with fourt or five fully expanded leaves. Esterase and peroxidase stains showed that *B. auleticus* has a phenotypic diversity 2.8 times greater than *B. catharticus*. Total diversity within and among population of *B. auleticus* was found to be 62% and 38% respectively, whereas in *B. catharticus* diversity was roughly equivalent. In the case of *B. auleticus*, no correlation was found between geographic distance and those measured by the Hedric index (r = -0.05). This allows us to infer that interpopulation variability does not follow a regular geographic pattern. These preliminary results suggest that further samples of *B. auleticus* should be taken over larger distances, exploring new areas, and that it is possible to predict advances in genetic improvement advances in these species by means of simple selection schemes.

Key words: *Bromus auleticus*, *Bromus catharticus*, esterases, peroxidases.

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo conocer la variabilidad isoenzimática intra- e interpoblacional en cinco poblaciones naturales de *Bromus auleticus* y dos poblaciones de *Bromus catharticus*, con la finalidad de obtener datos que orienten las estrategias futuras de recolección y el mejoramiento del germoplasma de esta especie. Los análisis electroforéticos individuales se realizaron con extracto crudo de hojas de 20 a 25 plántulas, en estado de cuatro o cinco hojas bien desplegadas. El revelado de esterasas y peroxidasas mostró que *B. auleticus* tiene una diversidad fenotípica 2.8 veces superior que *B. catharticus*. La distribución intra- e interpoblacional de la diversidad total en *B. auleticus* es de 62% y 38% respectivamente, mientras que en *B. catharticus* es aproximadamente equivalente. Por otra parte en *B. auleticus* no se encontró correlación entre las distancias geográficas y las calculadas con el índice de Hedrick (10) (r = -0.05), permitiendo inferir que la variabilidad interpoblacional no sigue un patrón geográfico regular. Estos resultados preliminares permiten sugerir que los muestreos en *B. auleticus* se deben realizar a distancias mayores explorando nuevas áreas y que, por otra parte, es posible predecir avances en el mejoramiento genético de esta especie mediante la adopción de esquemas de selección relativamente sencillos.

Palabras claves: *B. auleticus*, *B. catharticus*, esterasas, peroxidasas.

INTRODUCCIÓN

Uno de los recursos fundamentales de la producción pecuaria es la utilización de pasturas naturales que tienen la ventaja de encontrarse ya adaptadas (Pahlen 1975) frente a la introducción de especies foráneas. El género *Bromus* está representado en la Argentina por unas 15 especies indígenas y 12 exóticas. Algunas de las especies introducidas son importantes como malezas; las indígenas son, en general, buenas forrajeras destacándose *B. auleticus* (Trin ex Nees) por su resistencia a sequía, bajas temperaturas y fuertes vientos, por lo que se considera una especie apropiada para regiones semiáridas y *B. catharticus* (Vahl), por su productividad en suelos fértiles y húmedos, cultivada en países templados del mundo (Cabrera 1970).

En general son escasos los datos que se tienen acerca de la variabilidad genética en especies forrajeras nativas. Esta información es necesaria para escoger las técnicas de recolección y conservación del germoplasma, así como los métodos de mejoramiento más adecuados. Las isoenzimas permiten cuantificar fácilmente la diversidad genética de las poblaciones, ya que al estar codificadas por

[1] Recibido el 17 de febrero de 1994
Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Río Cuarto, y por el Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Córdoba (CONICOR), Arg

[*] Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto E.P. 9-5800, Río Cuarto, Arg.

[**] Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto E.P. 9-5800, Río Cuarto, Arg

alelos codominantes -cuya expresión no se halla condicionada por el ambiente- configuran fenótipos isoenzimáticos distintos, producto de genótipos diferentes. Así mediante el registro de estos marcadores altamente heredables es posible contribuir con la caracterización del material coleccionado (IBPGR 1986). El objetivo de este trabajo es conocer la estructura genética y la distribución de la diversidad en *B. auleticus* utilizando como referentes algunas poblaciones de *B. catharticus*.

Brown *et al.* (1974) al trabajar con *B. mollis* utilizaron seis alozimas para estudiar la diferenciación microgeográfica, y Brown *et al.* (1976), en la misma especie, demostraron diferencias fisiológicas entre los genótipos Adh que presentaron adaptación diferencial al ambiente. Kahler *et al.* (1981) emplearon cuatro sistemas isoenzimáticos con el objeto de identificar *B. madritensis*, *B. rubens*, *B. tectorum*, *B. diandrus* y *B. sterilis* y evidenciaron la variabilidad poblacional de estas especies. Krzakowa y Kraupe (1981), con los mismos sistemas isoenzimáticos, cuantificaron la variabilidad intra- e interpoblacional en *B. tectorum*. En *B. catharticus*, Cladera (1979) y Cladera y Pahlen (1984) realizaron estudios genéticos y poblacionales con esterasas. Ellos encontraron que las mismas tienen una estructura monomérica y están controladas por un gen con dos alelos codominantes, y que, además, las frecuencias de los patrones isoenzimáticos difieren según la estación (primavera o verano) y el año en que se realiza la recolección, no hallándose diferencias entre las distintas localidades muestreadas. En la misma especie, Morant (1988) utilizó estos marcadores bioquímicos y la pubescencia en vaina para determinar el porcentaje de cruzamientos naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales estudiados consistieron en cinco poblaciones naturales de *B. auleticus* provistas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), cosechados en "bulk" en las localidades de Río Cuarto (RC), El Morro (EM), Jovita (JO), Huinca Renancó (HR) y General Cabrera (GC). Estas localidades se hallan ubicadas en la región central de Argentina, distribuidas en un área de unos 260 km de diámetro con centro en los 30° 30' de latitud sur y 64° 30' de longitud occidental. Además, se analizaron dos poblaciones de *B. catharticus* recolectadas en dos sitios de la localidad de Río Cuarto, Banda Norte (BN) y Universidad (UN), distantes a cinco kilómetros.

Las semillas se pusieron a germinar en cajas de Petri a temperatura del ambiente, y después de siete días las plántulas fueron trasplantadas a macetas individuales y mantenidas en invernáculo. Cuando las plántulas tuvieron cuatro o cinco hojas bien desplegadas, se obtuvo el extracto crudo de la primera o segunda hoja con 0.2 ml de buffer 0.2 M tris - cítrico pH 7 y 0.3 g de PVP. Se analizaron entre 25 a 30 individuos de cada población. La electroforesis se realizó en gel de almidón al 14%, utilizando como buffer del gel 9 mM tris - cítrico pH 7 y como buffer de electrodos 0.135 M tris - cítrico pH 7. El gel se sometió a una diferencia de potencial de 300 V durante cuatro horas.

Se revelaron peroxidasas (PRX) y esterasas (EST) siguiendo las técnicas de Vallejos (1983) con algunas modificaciones (Di Renzo *et al.* 1992). Para PRX se mezcló en el momento de usar 40 mg de 3 etil 9 metil carbazol con 4 ml de NN dimetilformamida, 100 ml de buffer 0.05 M acetato de sodio pH 5.2 ml de cloruro de calcio y 0.5 ml de agua oxigenada al 3%, y el revelado se realizó a temperatura ambiente. Para revelar EST se prepararon 20 mg de α-naftil acetato disuelto en 1 ml de acetona y 1 ml de agua destilada y 20 mg de Fast Blue RR disuelto en 100 ml de buffer 0.1 M de tris-ClH pH 6 que fueron mezclados en el momento de usar, y el revelado se realizó en estufa a 37° centígrados.

Dado que se desconoce la forma de herencia de estas enzimas en *B. auleticus*, en este trabajo se utilizaron las frecuencias de los patrones isoenzimáticos. Para determinar la diversidad fenotípica intra- e interpoblacional, se usó el índice de Shannon (Ibáñez *et al.* 1993; Jain *et al.* 1975; Lewontin 1972):

$$H = - \sum_{i=1}^{M} p_i \log p_i$$

Donde:

p_i son las frecuencias de los patrones isoenzimáticos; n el número de patrones diferentes.

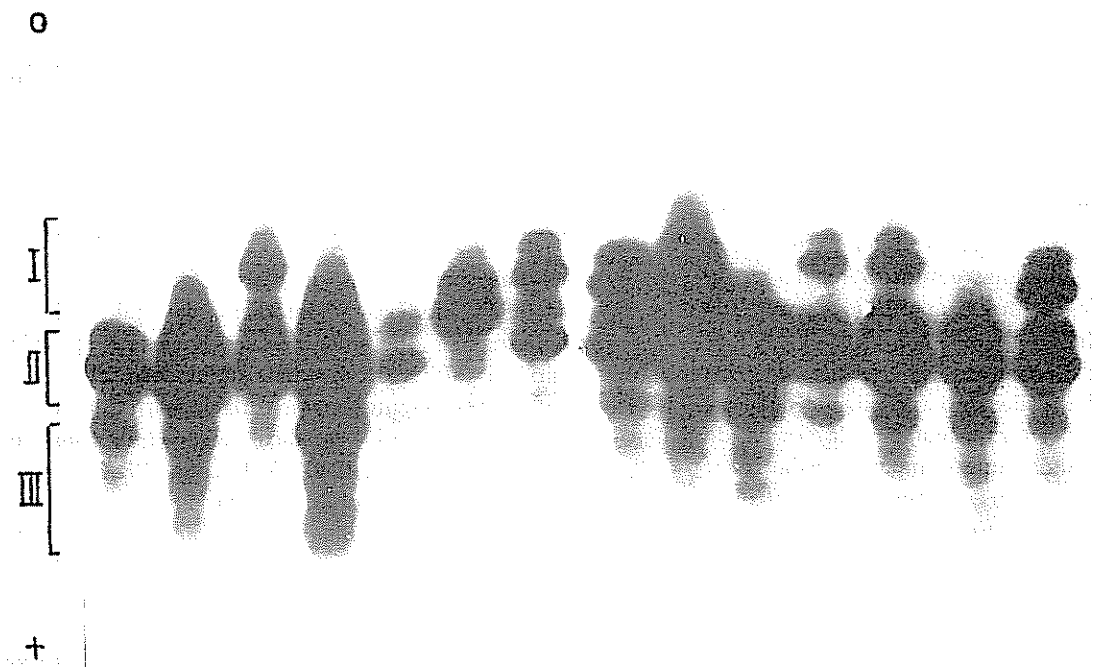

Fig. 1. Zimogramas de esterasas anódicas foliares de *B. auleticus*.

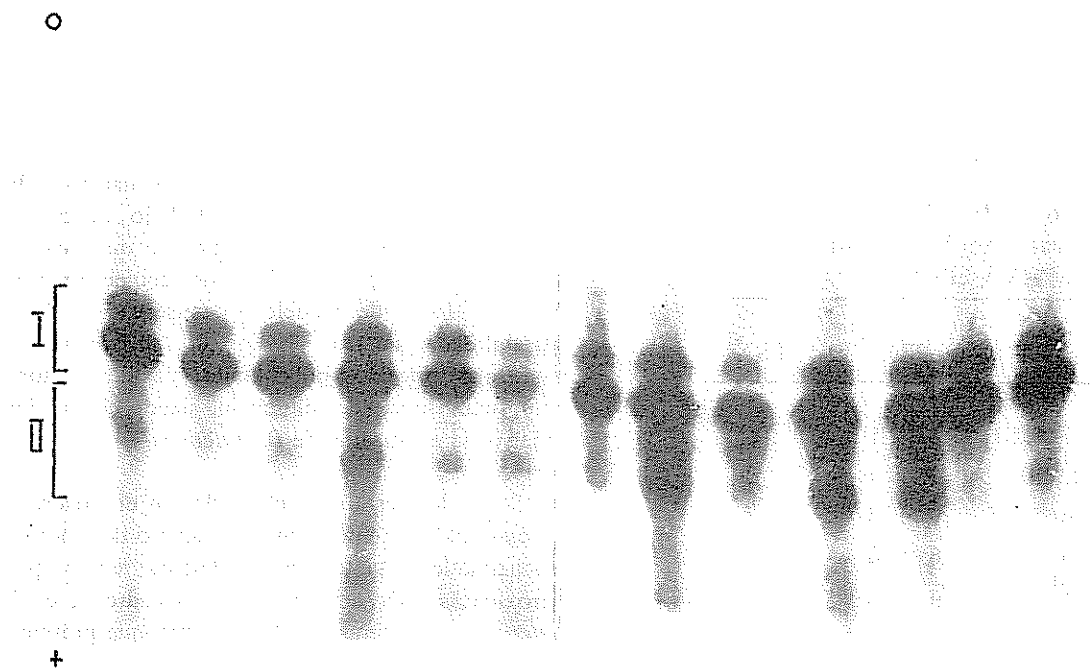

Fig. 2. Zimogramas de esterasas anódicas foliares de *B. catharticus*.

Con el índice de Hedrick (1971) (I_H), modificado para frecuencias fenotípicas, se construyó una matriz de las distancias geográficas.

RESULTADOS

Las zonas en que se dividen los patrones isoenzimáticos (Figs. 1 y 2) son grupos de bandas suficientemente separados y, en algunos casos, con características propias tales como diferencias en la coloración. Este agrupamiento permitió suponer que cada zona se halla regida por "loci" génicos distintos. Sin embargo, a partir de los polimorfismos observados, no fue posible deducir, con un grado de certeza aceptable, la forma de herencia de las bandas que componen cada zona. Considerando que los diferentes patrones isoenzimáticos de cada zona son el producto de genótipos distintos, la frecuencia de aparición de estos patrones se utilizó como dato básico para cuantificar la variabilidad genética de las poblaciones.

En las esterasas se observó actividad sólo en la región anódica donde las isoenzimas, en *B. auleticus*, se agruparon en tres zonas: EST I, II y III (Fig. 1) y se presentaron 19, 10 y 5 fenótipos isoenzimáticos diferentes para cada zona respectivamente. En *B. catharticus* se notaron dos zonas de actividad: EST I y II (Fig 2) con dos y tres patrones distintos cada una (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de fenótipos izoenzimáticos encontrados en las distintas zonas de EST, aPRX y cPRX.

B. auleticus	EST			aPRX			cPRX	
Poblaciones	I	II	III	I	II	III	I	II
R C	13	10	5	13	3	6	7	3
E M	6	3	5	9	1	3	5	1
J O	5	3	1	6	1	3	4	5
H R	5	3	3	4	3	2	2	5
G C	3	1	2	4	1	2	2	3
Total	19	10	5	21	3	6	9	11

Continua Cuadro 1.

B. catharticus	EST		aPRX	cPRX		
Poblaciones	I	II		I	II	III
B N	1	2	1	2	3	2
U N	2	1	1	1	2	1
Total	2	3	2	2	4	2

Las peroxidasas marcaron actividad en las regiones anódicas y catódicas del gel. En *B. auleticus* se diferenciaron tres zonas de actividad anódica (aPRX I, II y III) hallándose 21, 3 y 6 patrones diferentes para cada zona (Cuadro 1). Aunque la región catódica señaló tres zonas de actividad (cPRX I, II y III), la zona cPRX III no se tuvo en cuenta porque, si bien mostró diferencias entre las plantas analizadas, no se logró una definición de bandas. cPRX I y II revelaron 9 y 11 patrones diferentes.

En *B. catharticus*, las peroxidasas manifestaron la actividad de dos zonas anódicas: aPRX I, que no exhibió variantes en sus patrones isoenzimáticos, y aPRX II que evidenció dos variantes. Las isoenzimas que migran hacia el cátodo se agruparon en tres zonas: cPRX I, II y III mostrando cada una: dos, cuatro y dos fenótipos diferentes.

DISCUSIÓN

No se pueden considerar como exhaustivas las inferencias obtenidas en este trabajo aunque sí orientan respecto de las estrategias que han de adoptarse en los futuros viajes de recolección y en las actividades de manejo y conservación de la variabilidad genética. En *B. catharticus* se analizaron sólo dos poblaciones, ya que se tomó como una especie de referencia, siendo el principal objetivo la evaluación de *B. auleticus*.

Según los resultados obtenidos en el Cuadro 1, *B. auleticus* presentó el mayor número de fenótipos isoenzimáticos tanto para esterasas como para peroxidasas. De acuerdo con el Cuadro 2, en *B. auleticus*, las esteras son las enzimas que presentan mayor índice de diversidad (Ho = 1.07). En general, todos los sistemas analizados se hallan cerca

del promedio (Ho = 0.96), lo que indica una alta repetibilidad de los resultados. En cambio en *B. catharticus* existe una mayor dispersión de los resultados; esta mayor heterogeneidad, así como el menor número de fenótipos observados (Cuadro 1), puede deberse en parte al menor número de poblaciones analizadas, pero también a la menor variabilidad de esta especie. Las peroxidasas anódicas con Ho = 0 indican que si bien esta zona enzimática presenta dos patrones (Cuadro 1), cada uno de ellos se encuentra sólo en una de las poblaciones. Es decir que observando los patrones de esta enzima es posible identificar cada población analizada lo cual implica un proceso de diferenciación entre las mismas.

Cuadro 2. Valores de H para cada población y sistema isoenzimático en *B. auleticus* y *B. catharticus*.

B. auleticus

Poblaciones	EST	aPRX	cPRX	Ho
R C	1.61	1.25	0.86	1.29
E M	1.27	0.77	0.70	0.94
J O	0.63	0.83	1.32	0.88
H R	1.18	0.87	1.10	1.04
G C	0.67	0.65	0.66	0.66
Ho	1.07	0.87	0.93	0.96
Hs	1.70	1.44	1.46	1.55
Ho/Hs	0.63	0.60	0.64	0.62
Hs-Ho)/Hs	0.37	0.40	0.36	0.38

B. catharticus

Poblaciones	EST	aPRX	cPRX	Ho
B N	0.32	0.00	0.69	0.45
U N	0.34	0.00	0.22	0.23
Ho	0.33	0.00	0.46	0.34
Hs	0.79	0.69	0.61	0.69
Ho/Hs	0.42	0.74	0.75	0.49
(Hs-Ho)/Hs	0.58	0.26	0.25	0.51

La partición de la variabilidad realizada para cada sistema enzimático en *B. auleticus* (Cuadro 2) presenta resultados muy semejantes al obtenido del análisis conjunto; cada uno de estos sistemas tienen una variabilidad intra- e interpoblacional próxima al 62% y 38%, respectivamente. Nuevamente en *B. catharticus*, los resultados se hallan más dispersos con respecto a los valores promedios.

De acuerdo con los resultados del Cuadro 2, *B. auleticus* tiene un índice de diversidad total (Hs) de 1.55 mientras que *B. catharticus* de 0.69, el que además es inferior a la mayoría de los índices de diversidad de las poblaciones individuales (Ho) de *B. auleticus*, a excepción de GC con el que no difiere significativamente. La diversidad en promedio dentro de las poblaciones de cada especie también es 2.8 veces mayor en *B. auleticus* (Ho = 0.96) que en *B. catharticus* (Ho = 0.34). Ninguna población de *B. catharticus* supera en diversidad a cualquiera de las poblaciones de *B. auleticus*.

Con los datos presentados, es posible inferir que *B. auleticus* es una especie con una variabilidad genética claramente superior a la de *B. catharticus*, diferencia que resulta coherente con las observaciones realizadas en el campo sobre caracteres morfológicos y cuantitativos. Es conocido que existe una asociación positiva entre la cantidad de fecundación cruzada y la variación genética (Hamrick 1979). *B. auleticus*, especie considerada por algunos mejoradores como eminentemente alógama, posee un porcentaje de fecundación cruzada mayor que *B. catharticus*. Esta última, con un porcentaje de alogamia de sólo 1.8% (Morant 1988), tiene un período de floración prolongado comportándose en su mayor parte como cleistógama y si florece como chasmógama lo hace sólo a principios de período.

Por otra parte se ha demostrado que las especies predominantemente alógamas mantienen altos niveles de variación intrapoblacional (Cabrera 1970; Gottlieb 1977) y, como ya se indicó, la diversidad total en *B. auleticus* se distribuyó en un 62% y un 38 % adentro y entre las poblaciones, respectivamente; en *B. catharticus* la distribución intra- e interpoblacional es aproximadamente equivalente.

Esta menor diferenciación interpoblacional en *B. auleticus* se manifiesta en la imposibilidad de caracterizar algún sitio de recolección. Si bien existe

un cierto rango de diversidad entre las poblaciones, ninguna presenta un fenótipo único que la identifique; por el contrario, la mayoría de los patrones isoenzimáticos, aunque con frecuencias diferentes, se encuentran en más de una población. La falta de diferenciación interpoblacional permite suponer que la especie percibe un ambiente de grano fino (Levins y MacArthur 1966), es decir como si la región fuera homogénea.

Además en *B. auleticus*, la ausencia de correlación entre las distancias geográficas y las distancias calculadas con el índice de Hedrick (1971) (Cuadro 3) permitió inferir que la variabilidad entre las poblaciones no sigue un patrón geográfico regular. Esta falta de interdependencia causal entre ambas distancias (r = -0.05) puede deberse en parte a la escasa diferenciación interpoblacional (38%), y también a que los sitios cercanos, localizados unos contiguos de otros, no siguen un gradiente determinado.

Cuadro 3. Matriz de similitud según el índice de Hedrick (I_H) (superior) y distancias geográficas (inferior)

	RC	CM	JO	HR	GC
RC	0	.834	.693	.440	.676
CM	110	0	.687	.350	.666
JO	175	205	0	.341	.557
HR	210	200	60	0	.516
GC	60	195	210	255	0

Coeficiente de correlación entre ambas matrices r = -0.05

Ya que el material analizado es muy homogéneo, es factible deducir que no resulta conveniente aumentar la densidad de muestreo en *B. auleticus* sino que, por el contrario, se recomienda realizar muestreos más espaciados, por lo menos a intervalos mayores que la distancia en promedio que separa cada población (168 km) y ampliar el área o explorar nuevas áreas en busca de variabilidad.

Si se presupone que así como la alta variabilidad manifestada a través de estos caracteres bioquímicos -que representan una muestra aleatoria del genomio- también existe una importante variabilidad en los genes de herencia cuantitativa y que rigen caracteres de importancia agronómica, entonces es posible predecir avances en el mejoramiento genético de *B. auleticus* mediante la adopción de esquemas de mejoramiento relativamente sencillos. Es decir que, por lo menos, en las primeras etapas de la selección con este grado de variabilidad, podría esperarse una buena respuesta a la selección en corto tiempo y con relativamente poco esfuerzo.

LITERATURA CITADA

BROWN, A H D ; MARSHALL, D R ; ALBRECHT, L 1974. The maintenance of alcohol dehydrogenase polymorphisms in *Bromus mollis* L. Australian Journal of Biological Sciences 27:545-559

BROWN, A H D ; MARSHALL, D R ; MUNDAY, D 1976 Adaptedness of variants at an alcohol dehydrogenase locus in *Bromus mollis* L. (soft bromegrass). Australian Journal of Biological Sciences 29:389-396

BROWN. A H D. 1979 Enzyme polymorphism in plant population Theoretical Population Biology 15:1-42.

CABRERA, A 1970 Flora de la Provincia de Buenos Aires II Colección Científica del INTA.

CLADERA, J. 1979 Polimorfismo isoenzimático y variación para la longitud de las anteras en la cebadilla (*B unioloides* H.B.K.) Tesis Mag. Sc. Arg., INTA - Universidad Nacional de La Plata.

CLADERA, J.; PAHLEN A. 1984. Genetic and population study of esterases on *B catharticus* Vahl Boletín Genético Instituto Fitotécnico Castelar no. 12. p. 25-30

DI RENZO, M A.; POVERENE, M M.; MEDINA, M I 1992. Identification of lovegrass *Eragrostis curvula* cultivars by electrophoresis of seed isozymes. Seed Science and Technology (U.K.) 20(1):101-1109l

GOTTLIEB, L D 1977. Electroforetic evidence and plant sistematic. Annual of the Missouri Botanical Garden 65:164-180

HAMRICK, J L 1979 Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Annual Review of Ecology and Systematics 10:173-200.

HEDRICK, P W. 1971 A new approach to mea-suring genetic similarity Evolution 25:276-280.

IBAÑEZ, M A ; DI RENZO, M A ; POVERENE, M M 1993 Isozyme diversity among and within peach groups: Freestone, clingstone and nectarines Scientia Horticulturae 53:281-288

IBPGR (INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES) 1986. Annual Report 1986 Rome.

JAIN, S.K.; QUALSET, C.O.; BHATT, G.M.; WU, K.K. 1975. Geografical patterns of phenotypic diversity in a world collection. Crop Science 15:700-704.

KAHLER, A.L.; KRZAKOWA, M.; ALLARD, R.W. 1981. Isozyme phenotypes in five species of *Bromus* sect. Botanische Jahrbücher 102:401-409.

KRZAKOWA, M.; KRAUPE, A. 1981. Isozyme investigation of natural populations of the cheatgrass (*Bromus tectorum* L.). Botanische Jahrbücher 102:393-399.

LEVINS, R.; MACARTHUR, R. 1966. The maintenance of genetic polymorphism in spatially heterogeneous environment: Variation on a theme by Howard Levene. American Naturalist 100:585-589.

LEWONTIN, R. 1972. The apportionment of human diversity. Evolutionary Biology 6:381-392.

MORANT, A. 1988. Determinación del porcentaje de fecundación cruzada en cebadilla criolla (*B. catharticus* Vahl). Tesis Mag. Sc. Arg., INTA - Universidad Nacional de Rosario.

PAHLEN, A. 1975. Evaluación y conservación de germoplasma desde el punto de vista poblacional. Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Agronomía y Zootecnia. Miscelánea no. 54. p. 51-56.

VALLEJOS, E. 1983. Enzyme activity staining. **In** Isozymes in Plant Genetic and Breeding. A. S.D. Tanksley, T.J. Orton (Eds.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers. p. 469-516.