

Diferenciación de Cultivares de Pasto Llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, mediante Electroforesis de Isoenzimas en Argentina¹

M.M. Poverene*, M.A. Di Renzo**, N.R. Curvetto*

ABSTRACT

Identification of lovegrass cultivars, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, based on morphological characters, can be suitably complemented by means of isozymic characterization. Esterase and peroxidase isozymes from foliar extracts were separated by starch gel electrophoresis and allowed differentiation of 19 out of 20 lovegrass cultivars and hybrids. All the strains but one showed an intracultivar uniformity of isozymic patterns, mainly due to their apomictic way of reproduction. Variability in one cultivar was ascribed to sexual reproduction. Some cultivars showed similar zymograms, possibly due to their genetic relationships. A good accordance between isozymic and morphological characters from these materials was found, representing different morphological types.

INTRODUCCION

El pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, una gramínea originaria de África meridional, es de gran valor como forrajera en regiones semiáridas. Constituye la pastura perenne más extensamente cultivada en la República Argentina, abarcando actualmente unas 700 000 hectáreas (7). Sus principales cualidades son su rusticidad, longevidad y capacidad fijadora de suelos erosionables. Existen numerosos cultivares que consisten en ecotipos seleccionados por su buena aptitud forrajera, dentro de un vasto complejo de formas poliploides, en su mayor parte, apomícticas. Recientemente, se han obtenido algunos cultivares por hibridación de plantas sexuales con apomícticas (18). La hibridación también tiene lugar naturalmente dentro del complejo *E. curvula*, dado que muchos ecotipos son apomícticos facultativos, con una baja frecuencia de reproducción sexual.

¹ Recibido para publicación el 7 de enero de 1988
Este trabajo fue parcialmente financiado por un subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

* Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, y Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS-CONICET), 8 000 Bahía Blanca, República Argentina.

** Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5 800 Río Cuarto, República Argentina.

COMPENDIO

La identificación de cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, por medio de caracteres morfológicos, puede ser adecuadamente complementada mediante la caracterización isoenzimática. Isoenzimas de estereras y peroxidases de extractos foliares fueron separadas por electroforesis en gel de almidón y permitieron diferenciar a 19 de 20 cultivares e híbridos de pasto llorón. Las líneas analizadas, a excepción de una, mostraron una gran uniformidad de sus patrones isozimicos, debido a que la reproducción en esta forrajera es principalmente apomíctica. La variabilidad en el cultivar restante fue atribuida a la reproducción sexual. Algunos cultivares mostraron zimogramas semejantes, posiblemente debido a su parentesco genético. Se encontró una buena concordancia entre las características isoenzimáticas y morfológicas de los materiales analizados, que representan a los distintos tipos morfológicos en que se clasifica al pasto llorón.

Debido a esta modalidad reproductiva, existen muchos tipos intermedios entre las distintas variedades botánicas de pasto llorón (10)

No existe una descripción precisa de cada cultivar, cuyas características morfológicas son, por otra parte, marcadamente influenciadas por las condiciones de crecimiento y la edad de la planta (10). Leigh (9) ha propuesto una clasificación de cultivares en tipos morfológicos, basada en características de la hoja e inflorescencia. Se reconocen los siguientes tipos: curvula, robusta azul, robusta verde, robusta intermedia, chloromelas y conferta. Sin embargo, los tipos morfológicos se superponen tanto que resulta imposible el reconocimiento formal de unidades taxonómicas (8).

El objetivo de este trabajo fue investigar una colección de cultivares de pasto llorón mediante electroforesis de isoenzimas, a fin de comprobar la utilidad de la caracterización isoenzimática como complemento del reconocimiento de características morfológicas para la identificación varietal.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 20 cultivares pertenecientes a distintas variedades de pasto llorón, algunos de los cuales son de origen híbrido. Estos materiales se mantienen en cultivo en el Departamento de Agronomía de la

Universidad Nacional del Sur, la cual se ubica en las afueras de la ciudad de Bahía Blanca (38°45'S, 62°11'W, República Argentina). Corresponde a esta región un clima templado subhúmedo, con una media de 500 mm de precipitación anual.

La semilla fue provista por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. En el Cuadro 1 se detalla la procedencia de la misma y el tipo morfológico a que corresponde cada material analizado. A excepción de los híbridos, los cultivares de pasto llorón se han obtenido por selección sobre ecotipos y colecciones de origen sudafricano, en los países mencionados en el Cuadro 1.

La obtención de los extractos se realizó macerando en mortero un trozo de lámina foliar de unos 10 cm de largo, proveniente de hojas jóvenes, completamente desarrolladas y recién cortadas. Las plantas analizadas crecían en macetas a la interperie y estaban en su segundo o tercer año de cultivo. El homogenado se obtuvo con 150 µl del mismo buffer utilizado para preparar el gel y se absorbió en trozos de papel Whatman No. 3, a través de una fina toalla de papel para evitar el material particulado.

La electroforesis se realizó en geles de almidón al 13% (Sigma, lot 25F-0364) de 12x15x0.6 cm, en dos sistemas alternativos de buffers: Sistema A buffer del gel: tris-citríco 0.019 M pH 7.8; buffer de electrodos: borato de sodio 0.4 M pH 8.3 (13). Sistema B buffer del gel: una mezcla de tris-citríco 0.05 M pH 8.3 y

borato de sodio 0.19 M pH 8.3 (9:1 v/v), buffer de electrodos: borato de sodio 0.19 M pH 8.3. Para el sistema B se utilizó tris-citríco 0.05 M como buffer extractante en la obtención de las muestras. Este sistema es una modificación del propuesto por Ashton y Braden (2).

En ambos casos, los extractos absorbidos en trozos de papel se insertaron en ranuras practicadas a 5 cm del borde catódico del gel. Se aplicó una corriente de 20 mA durante 3.5 h, manteniendo el gel a 4°C en cámara fría.

El revelado de isoenzimas se realizó en los medios de incubación que se detallan a continuación:

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 1% en acetona al 50%. El gel se incubó a 37°C en oscuridad durante unas dos horas.

Peroxidasas: 100 ml de buffer acetato de sodio 0.2 M pH 5.0 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 ambiente.

Fosfatasa ácida: 50 ml de buffer acetato de sodio 0.2 M pH 5.0 y 2 ml de Cl₂Mg 0.1 M, conteniendo 17 mg de Fast Garnet GBC (Orto-Aminoazotolueno).

Cuadro 1. Origen y tipo morfológico de los materiales analizados. Los números de accesión corresponden a la colección de los autores.

Accesión No.	Nombre del cultivar	Procedencia	Caracteres morfológicos del tipo
054	Morpa	USA	curvula
053	Ermelo	Sudáfrica	curvula
059	Don Arturo	Argentina	curvula
063	Canadian	Sudáfrica	curvula
052	Tanganyika	USA	curvula
055	Don Walter	Argentina	conferta
062	Villa Mercedes	Argentina	conferta
089	Híbrido H1	Sudáfrica	curvula/conferta
081	Híbrido H2	Argentina	curvula/conferta
083	Don Mario	Argentina	curvula/conferta
070	Krondraai	Sudáfrica	curvula y robusta
058	Don Eduardo	Argentina	robusta verde
057	Don Pablo	Argentina	robusta azul
072	Don Carlos	Argentina	robusta azul
047	Robusta 4047	Sudáfrica	robusta intermedia
043	Enano Azul	Argentina	chloromelas
042	Frankenwald	Sudáfrica	chloromelas
056	Don Juan	Argentina	chloromelas
065	Rannoch	Sudáfrica	chloromelas
067	<i>E. lehmanniana</i> , tipo común	USA	

con el agregado de 20 mg de alfa-naftil fosfato ácido disueltos en 2 ml de buffer de acetato en el momento del revelado. Se incubó en oscuridad a temperatura ambiente.

RESULTADOS

Se obtuvo una buena resolución de bandas de peroxidasas con ambos sistemas electroforéticos, así como diferentes patrones de bandeo; de allí que ambos se tuvieron en cuenta para la caracterización de cultivares (Fig. 1A y 1B). Las ésterasas se revelaron con mayor nitidez mediante el sistema A (Fig. 1C), en tanto que las fosfatasa no mostraron una variación isoenzimática comparable a la de ésterasas y peroxidasas, resultando de escasa utilidad para la caracterización de cultivares.

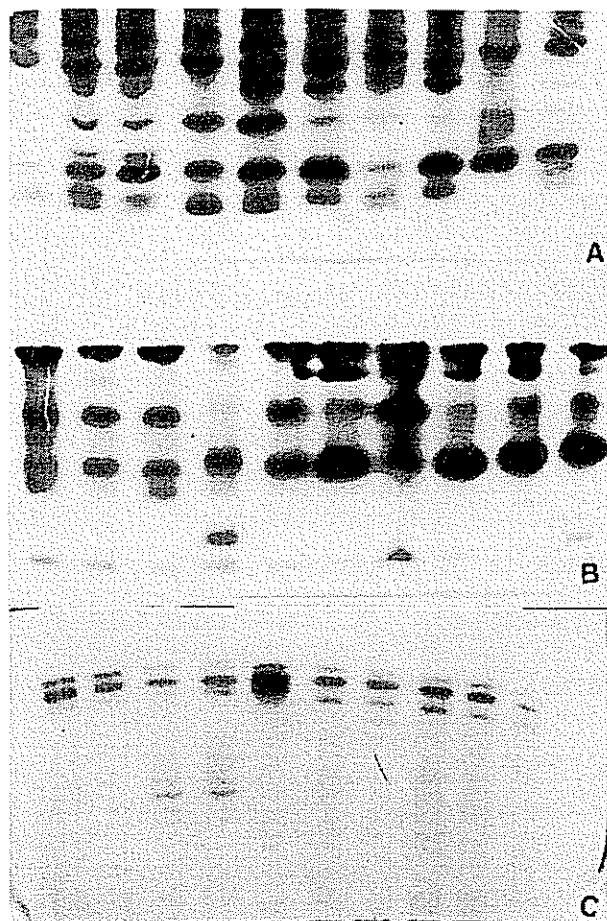


Fig. 1. Patrones de isoenzimas de extractos foliares de pasto llorón. A: Peroxidasas obtenidas con el sistema A de buffers. De iz. a der.: cvs. Don Eduardo, Don Pablo, Robusta 4047, Don Carlos, Enano azul, Frankenwald, Don Juan, Rannoch, *E. lehmanniana* tipo común, Kromdraai. B: Peroxidasas obtenidas con el sistema B de buffers. De izq. a der.: cvs. Morpa, Ermelo, Don Arturo, Canadian, Tanganyika, Don Walter, Villa Mercedes, híbridos H1 y H2, Don Mari. C: Esterasas. De izq. a der.: Morpa, Ermelo, Don Arturo, Canadian, Tanganyika, Don Walter, Villa Mercedes, Don Mario, H1, H2.

De las 20 líneas analizadas se obtuvieron 14 zimogramas diferentes de ésterasas y otros tantos de peroxidasas por medio del sistema A de buffers (Figs. 2 y 3). Con el sistema B se obtuvieron 16 zimogramas diferentes de peroxidasas (Fig. 4). La combinación de estos sistemas permitió caracterizar, mediante una única combinación de zimogramas, a 19 de los 20 materiales analizados, lo cual representa un éxito del 95% (Cuadro 2).

El análisis de 20 a 30 plantas de cada cultivar no reveló una variación intracultivar de los patrones isoenzimáticos, con excepción del cv. Kromdraai, con el cual se obtuvieron seis zimogramas diferentes de peroxidasas y siete de ésterasas, con frecuencias variables. En las figuras sólo se muestra uno de los patrones característicos de este cultivar. También se encontró una variante isoenzimática en el cv. Don Walter, pero,

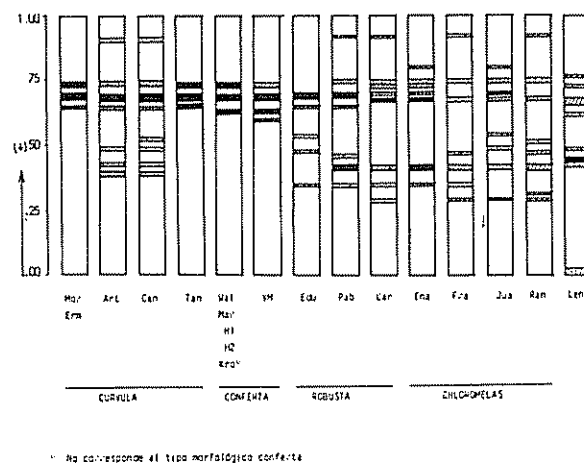


Fig. 2. Zimogramas de isoenzimas ésterasas de extractos foliares de pasto llorón. Abajo figuran los tipos morfológicos correspondientes a cada cultivar (Por abreviaturas ver Cuadro 2). Intensidad relativa de las bandas: Fuerte (color entero); Intermedia (rayado); Débil (punteado).

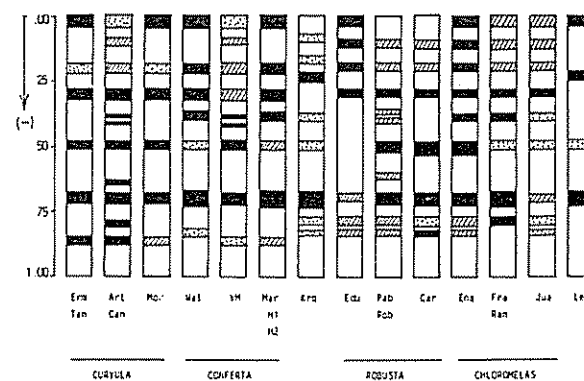


Fig. 3. Zimogramas de isoenzimas peroxidasas de extractos foliares de pasto llorón obtenidos con el sistema A de buffers (Ver el texto). Intensidad de las bandas como en la Figura 2.

se trataba de una planta algo atípica por sus caracteres morfológicos y no se la consideró como representativa de ese cultivar.

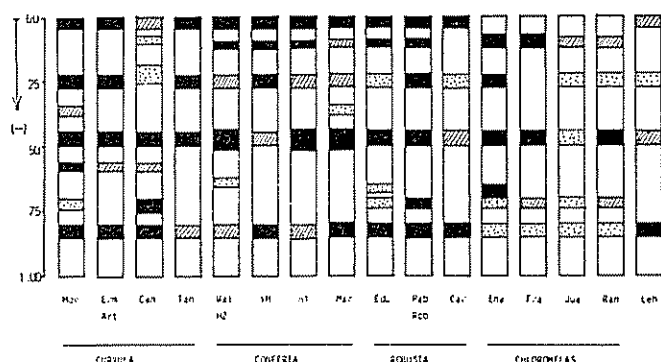


Fig. 4. Zimogramas de isoenzimas peroxidasas de extractos foliares de pasto llorón obtenidos con el sistema B de buffers (Ver el texto) Intensidad de las bandas como en la Figura 2

Cuadro 2. Caracterización isoenzimática de cultivares de pasto llorón mediante electroforesis en gel de almidón de extractos foliares.

Cultivares	Fenotipos isoenzimáticos			Grupos
	Esterasas	Peroxidasas*		
		Sistema A	Sistema B	
Morpa (Mor)	1	1	1	A
Ermelo (Erm)	1	3	2	B
Don Arturo (Art)	2	2	2	C
Canadian (Can)	3	2	3	D
Tanganyika (Tan)	4	3	4	E
Don Walter (Wal)	5	4	5	F
Villa Mercedes (VM)	6	5	6	G
Híbrido H1	5	6	7	H
Híbrido H2	5	6	5	I
Don Mario (Mar)	5	6	8	J
Kromdraai (Kro)	5	7	-	K
Don Eduardo (Edu)	7	8	9	L
Don Pablo (Pab)	8	9	10	M
Robusta 4047 (Rob)	8	9	10	M
Don Carlos (Car)	9	10	11	N
Enano Azul (Ena)	10	11	12	O
Frankenwald (Fra)	11	12	13	P
Don Juan (Jua)	12	13	14	Q
Rannoch (Ran)	13	12	15	R
<i>E. lehmanniana</i> , tipo común (Leh)	14	14	16	S

*: Ver descripción de los sistemas electroforéticos en Materiales y Métodos.

DISCUSION

El problema de la identificación varietal de pasto llorón ha sido planteado desde hace largo tiempo (9, 10) pero, hasta el momento, no se había intentado una caracterización isoenzimática de cultivares. Trabajando con plántulas de uno o dos meses de edad se encontró una adecuada variabilidad de esterases, peroxidasas y fosfatasas en nueve de los cultivares aquí analizados, obtenidos a partir de los mismos lotes de semilla (11). Estos sistemas isoenzimáticos han demostrado ser los más polimórficos en estudios de variabilidad intervarietal en numerosas especies (3). No obstante, la resolución aquí alcanzada con plantas adultas fue mayor que la obtenida a partir de plántulas, mostrando también la existencia de cambios en los patrones isozimicos durante el desarrollo, hecho que recalca la necesidad de establecer cuidadosamente las condiciones de cultivo y de las técnicas electroforéticas, cuando el propósito es la caracterización varietal a partir de extractos foliares. Variaciones similares se han observado en avena (1).

En algunos cultivares pertenecientes al mismo tipo morfológico, e.g., cvs Morpa, Ermelo, Don Arturo y Canadian, pertenecientes al tipo curvula, se encontraron patrones isoenzimáticos muy similares. La forma de selección practicada en esta forrajera justifica tales coincidencias ya que, al menos, Morpa y Ermelo han sido seleccionados a partir del mismo ecotipo. También, en otras especies, se han encontrado patrones electroforéticos muy semejantes en cultivares con estrecho parentesco genético (6, 20). Las características morfológicas y agronómicas de aquellos cultivares son asimismo muy semejantes: es imposible diferenciar entre Ermelo, Morpa y Don Arturo, en tanto que Canadian es semejante a Tanganyika. Estos dos últimos pueden diferenciarse de los anteriores por características del cuello de la caña y de las ramas basales de la panoja (7); sin embargo, durante el estadio vegetativo es posible que la única forma de identificación resida en la caracterización isoenzimática.

Dentro del tipo robusta, los extractos foliares correspondientes a los cvs Don Pablo y Robusta 4047 produjeron idénticos patrones isozimicos, demostrando que se trata de líneas con el mismo o muy similar genotipo, a pesar de la diferente denominación. Es imposible establecer con certeza el origen de estos cultivares, pero, hasta donde se conoce, el primero fue seleccionado en Argentina por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en tanto que el segundo es una línea introducida de los Estados Unidos de América. Ambos son morfológicamente muy similares al cv. Renner, de gran difu-

sión en E.U.A. Una situación similar se observa entre los cvs: Don Walter, Don Mario y los materiales híbridos experimentales que hemos denominado H1 y H2. Estos híbridos, al igual que Don Mario, se han obtenido artificialmente por cruzamiento entre plantas sexuales del tipo conferta con el cv. apomíctico Tanganyika. En cruzamientos de este tipo, la descendencia híbrida es apomíctica y muy uniforme, por lo cual puede ser de inmediato multiplicada como un nuevo cultivar (16, 18). El cv. Don Walter es una selección de tipo conferta obtenida en el INTA (7). El zimograma esterástico de estos cuatro materiales es idéntico y los zimogramas de peroxidases son muy semejantes.

Otra posibilidad es la identificación varietal de pasto llorón a partir de semilla, la cual, sin embargo, ofrece tantas dificultades como la diferenciación de plantas en cultivo. El cariopse carece de caracteres morfológicos suficientes para diferenciar entre cultivares pertenecientes a un mismo tipo morfológico y es muy pequeño, de 0.7 a 1.2 mm de longitud. Ante la imposibilidad de analizarlos en forma individual, dado su tamaño, se estudiaron los perfiles isoenzimáticos de muestras de semillas molidas (5). Este análisis no permitió distinguir entre Tanganyika y Canadian; Morpa, Ermelo y Don Arturo; y Renner y Robusta 4047 aunque sí se pudieron diferenciar estos dos últimos de Don Pablo. Estos resultados apoyan la hipótesis de estrecha semejanza genética entre estos cultivares.

La reproducción principalmente apomíctica que tiene lugar en el pasto llorón es probablemente la causa de la ausencia de variación isoenzimática entre plantas de un cultivar. Es razonable que las líneas de mayor valor forrajero hayan sido seleccionadas a partir de ecotipos altamente apomícticos ya que éstos poseen una gran uniformidad (19). No obstante, estudios citológicos y de progenie han demostrado que numerosos cultivares son apomícticos facultativos (16). Este es el caso del cv. Kromdraai (4), cuyos polimorfismos isozimicos serán objeto de una publicación posterior y que sirven aquí para señalar la utilidad de las isoenzimas para evaluar la variabilidad genética y el grado de reproducción sexual en esta forrajera, la cual ha sido considerada por mucho tiempo como de reproducción apomíctica obligada (17). En el caso del cv. Kromdraai y eventualmente de otros cultivares apomícticos facultativos, la caracterización isoenzimática con fines de identificación

varietal está expuesta a las mismas críticas que en el caso de especies alógamas (3); de allí su limitada utilidad. En el Cuadro 2 se incluyó al cv. Kromdraai porque es posible diferenciarlo de los demás cultivares por su patrón peroxidásico pero solamente representa uno de los posibles fenotipos isoenzimáticos hallados en este cultivar.

Debido al tipo de reproducción del pasto llorón y a que los cultivares analizados son poliploides (12), no se ha intentado hasta el momento estudiar la forma de control génico y la herencia de estos sistemas isozimicos. En Argentina, *E. curvula* es una especie introducida pues no se dispone de ecotipos diploides que se reproduzcan sexualmente (14, 17), constituyendo los materiales más adecuados para realizar estudios de herencia. Sin embargo, en los perfiles de peroxidases, algunas bandas parecen manifestar efectos de dosis, especialmente en los materiales tetraploides de tipo curvula y conferta (Fig. 1A y 1B). A pesar de la complejidad de los patrones isoenzimáticos encontrados, existen semejanzas entre aquéllos correspondientes a un mismo tipo morfológico (Figs. 2 a 4). Los patrones isozimicos más disímiles fueron obtenidos con los extractos del ecotipo de *E. lehmanniana* Nees, especie considerada también como parte del complejo *E. curvula* (15, 16). Estas observaciones evidencian una correspondencia entre características isoenzimáticas y morfológicas en pasto llorón.

Los resultados aquí presentados permiten concluir que la caracterización isoenzimática ofrece interesantes posibilidades como complemento de los caracteres morfológicos para la diferenciación de cultivares de pasto llorón. Al ser éstos genotípicamente muy uniformes, debido a la apomixis, el análisis de pocas plantas es suficiente para caracterizar a cada uno. Sin embargo, en aquéllos en los cuales es frecuente la reproducción sexual, el método resultará de menor utilidad, aunque permitiría evaluar el grado de variabilidad genética sin necesidad de efectuar pruebas de progenie, lo cual constituye una importante ventaja en planes de mejoramiento genético y en el análisis de híbridos.

Aunque por el momento no ha sido posible realizar estudios de herencia de las isoenzimas, la disponibilidad de ecotipos diploides sexuales y el análisis de sistemas isoenzimáticos con mayor especificidad de sustrato, harían factibles tales estudios.

LITERATURA CITADA

- 1 ALMGARD, G.; CLAPHAM, D. 1975. Isozyme variation distinguishing 18 *Avena* cultivars grown in Sweden. Swedish Journal of Agricultural Research 5:61-67.
- 2 ASHTON, G.; BRADEN, E. 1961. Serum beta-globulin polymorphism in mice. Australian Journal of Biological Science 14:248-259.
- 3 BAILEY, D.C. 1983. Isozymic variation and plant breeders' right. In Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. Ed. by S.D. Tanksley; T.J. Orton. Amsterdam Elsevier Science Publishers B.V. p. 425-440.
- 4 BRIX, K. 1974. Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schröd.) Nees. Zeitschrift fuer Pflanzenzuchtung 71:25-32.
- 5 DI RENZO, M.; POVERENE, M.; MEDINA, M. 1986. Variabilidad isoenzimática en granos de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schröd.) Nees: Su aplicación en la identificación de cultivares. Revista de Investigaciones Agropecuarias.
- 6 FEDAK, G. 1974. Allozymes as aids to Canadian barley cultivar identification. Euphytica 23:166-173.
- 7 COVAS, G.; CAIRNIE, A.G. 1985. El pasto llorón (*Eragrostis curvula*). Manual con información básica y normas para su cultivo y utilización. Buenos Aires Hemisferio Sur.
- 8 JACOBS, S.W. 1982. Classification in the *Eragrostis curvula* complex in Australia. Australian Plant Introduction Review 15:5-14.
- 9 LEIGH, J.H. 1961. Leaf anatomy in certain strains of *Eragrostis* Beauv. Journal of South African Botany 27:41-46.
- 10 LEIGH, J.H.; DAVIDSON, R.L. 1968. *Eragrostis curvula* (Schröd.) Nees and some other African love-grasses. Plant Introduction Review CSIRO 5:21-44.
- 11 MEDINA, M.I.; DI RENZO, M.A.; TIRANI, I.N. 1985. Identificación de cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schröd.) Nees, por medio de esterasas, fosfatasa y peroxidasa. Revista de Investigaciones Agropecuarias 20:1-9.
- 12 POVERENE, M.; CURVETIO, N.; RODRIGUEZ, R. 1985. Estudios citogenéticos en pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schröd.) Nees sens. lat. I. Recuentos cromosómicos. Revista de la Universidad Nacional de Río Cuarto 5:67-72.
- 13 SOLTIS, D.E.; HAUFLE, C.; DARROW, D.; GASTONY, G. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. American Fern Journal 73:9-27.
- 14 SIALKER, H.I.; WRIGHT, L.N. 1975. Reproduction of *Eragrostis curvula* (Schröd.) Nees. Journal of Arizona Academy of Sciences 10:106-110.
- 15 SIREETMAN, L.J. 1963. Reproduction of the love-grass, the genus *Eragrostis*. *E. chloromelas* Steud., *E. curvula* (Schröd.) Nees, *E. lehmanniana* Nees and *E. superba* Peyr. Wriethia 3:41-51.
- 16 VOIGI, P.W. 1987. *Eragrostis curvula* sus características y potencial para el mejoramiento a través de la hibridación. In Pasto llorón: su biología y manejo. Ed. por O. Fernández, R. Brevedan, A. Gargano.
- 17 VOIGI, P.W.; BASHAW, E. 1972. Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. Crop Science 12:843-847.
- 18 VOIGI, P.W.; BURSON, B.L. 1983. Breeding of apomictic *Eragrostis curvula*. In Proceedings of XIV International Grassland Congress. Ed. by J.A. Smith; V.W. Hays. U.S.A. Westview Press. p. 160-163.
- 19 VORSTER, I.B.; LIEBENBERG, H. 1977. Cytogenetics studies in the *Eragrostis curvula* complex. Bothalia 12:215-221.
- 20 WERNER, D.; SINK JUNIOR, K. 1977. Identification of poinsettia cultivars by electrophoretic analysis of proteins and peroxidases. Journal of Heredity 68:35-40.