

# Determinación de la Variación Isoenzimática en Progenies de *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees.<sup>1</sup>

N. Guzmán\*, M. Di Renzo\*, M. Poverene\*\*

## ABSTRACT

The knowledge of the reproductive biology of a species is important for genetic improvements. In lovegrasses, cultivars are apomictic and sexuality is not frequent. Having shown that 'Kromdraai' presents certain variability within cultivars, it is necessary to establish whether this is due to clone mixtures or the existence of sexual reproduction. The objective of this work is to determine the existence of isozymatic variation in progenies of the 'Kromdraai' cultivar. The existence of isozyme variation in 13 progenies were examined using electrophoretic techniques and the revelation of esterase and peroxidase enzymes. It observed that most of the progenies, about 20 plants, did not present variation in the electrophoretic patterns. In four progenies variations in the isoenzymatic patterns were observed. With these results, it is possible to infer that the 'Kromdraai' cultivar is composed of facultative apomictic genotypes.

Key words: Polymorphism, isozyme, apomixis, sexuality, lovegrasses, *Eragrostis curvula*.

## COMPENDIO

El conocimiento de la biología reproductiva de una especie es importante para su mejoramiento genético. En pasto llorón, la mayor parte de los cultivares son apomicticos y la sexualidad es poco frecuente. Habiéndose demostrado que el cultivar Kromdraai presenta cierta variabilidad intracultivar, se plantea la necesidad de conocer si la misma se debe a una mezcla de clones, o si existe reproducción sexual. El objetivo de este trabajo es determinar la existencia de variación isoenzimática en progenies correspondientes al cultivar Kromdraai. Se analizaron 13 progenies de Kromdraai utilizando técnicas de electroforesis y revelado de las enzimas: esterases y peroxidasas. Se observó que la gran mayoría de las progenies representadas por unas veinte plantas, no presentaron variación en los patrones electroforéticos. En cuatro progenies se produjeron variantes en los patrones isoenzimáticos. Con estos resultados, es posible inferir que el cultivar Kromdraai está compuesto por genótipos apomicticos facultativos.

Palabras claves: Polimorfismos isoenzimáticos, apomixis, sexualidad, pasto llorón (*Eragrostis curvula*).

## INTRODUCCION

**E**ragrostis curvula (Schrad.) Nees, llamado vulgarmente pasto llorón, es una gramínea perenne, de clima templado cálido, originaria de las regiones central y meridional de Africa. En Argentina, se cultiva en áreas subhúmedas y semiáridas, y cubre una superficie de 700 000 ha, principal-

mente en la región pampeana. Asimismo, se calcula en más de cinco millones de hectáreas la superficie del país apta para su cultivo (4). Sus principales cualidades son: rusticidad, longevidad y capacidad para consolidar suelos aerosionables; por lo que es un recurso forrajero de extraordinario valor.

Existen numerosas variedades botánicas de pasto llorón, y tipos intermedios entre ellas, de los que se han seleccionado los cultivares comerciales (6).

Como en muchas gramíneas forrajeras, la opomixis es el modo de reproducción predominante. La mayor parte de los cultivares son poliploides apomicticos, en los cuales la sexualidad es poco frecuente. Esta modalidad reproductiva provoca que la progenie de una planta sea de constitución genética idéntica; por eso, los distintos cultivares de esta gramínea son notablemente uniformes.

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 3 de enero de 1991.

\* Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, E.P. núm 9, 5800 Rfo Cuarto, Arg.

\*\* Departamento de Agronomía, UNS, 8000 Bahía Blanca, Arg.

El mecanismo apomítico es diplosoria seguida de pseudogamia (11).

El descubrimiento de sexualidad y apomixis facultativa (13, 14, 15) abrió una nueva perspectiva para el mejoramiento genético mediante la hibridación, que permite combinar cualidades de las distintas variedades botánicas (16). La sexualidad se detecta por la existencia de variabilidad en la descendencia, ya sea de caracteres morfológicos en pruebas de progenie, o por medio de análisis citológicos de desarrollo del saco embrionario. Brix (1) utilizó ambos métodos para analizar la variación presentada por el cultivar Kromdraai, la que se asoció con apomixis facultativa.

Smith (9) demostró variación isoenzimática en progenies de *Panicum maximum*, una gramínea apomítica facultativa. La electroforesis de isoenzimas es una técnica, rápida y sencilla, para la detección de variabilidad en progenies, las cuales pueden ser analizadas en un estadio precoz. En pasto llorón, esta técnica ha permitido caracterizar cultivares mediante patrones isoenzimáticos, y cuantificar la variabilidad existente dentro de ellos (5, 7, 8). Uno de los cultivares con mayor variación isoenzimática fue Kromdraai, pues no puede ser asignado a una variedad botánica en particular. El origen de la variabilidad podría ser la reproducción sexual, como lo señalado por Brix (1), o consistir en una mezcla de clones apomíticos. El análisis de plantas individuales permitiría caracterizar el modo de reproducción de este cultivar. En caso de tratarse de genotipos apomíticos, sus progenies presentarían el mismo patrón isoenzimático. Los genotipos con reproducción sexual mostrarían descendientes con patrones isoenzimáticos polimórficos.

El objetivo de este trabajo fue determinar la existencia de variación isoenzimática en progenies del cv. Kromdraai, para identificar genotipos con reproducción sexual o apomíticos facultativos. Estos genotipos podrían incluirse en esquemas de hibridación y, así, contribuir al mejoramiento del pasto llorón.

#### MATERIALES Y METODOS

El material utilizado consistió en 13 progenies del cultivar Kromdraai representadas cada una por 20 plantas. La semilla se obtuvo de la primera cosecha de la población original del cultivar Kromdraai. La siembra fue realizada en macetas mantenidas en invernáculo. El corte se realizó desde que la planta presentó de tres a cuatro hojas, hasta su completo desarrollo. Se cortó

una sección foliar de 10 cm de largo, y se maceró en un mortero con 150 µl de buffer utilizado para hacer el gel, más 20 mg de arena. El extracto obtenido se absorbió en trozos de papel Whatman núm. 3 (6 x 7 mm); que provenía de una toalla de papel con el fin de evitar el material particulado.

El gel se preparó, en una cámara de 12 cm x 18 cm x 0.6 cm, utilizando almidón hidrolizado sigma (lote 98 F 0.045) al 12%, más 220 ml de buffer adecuado, según el sistema gel-electrodo empleado.

Los extractos se sometieron a la electroforesis para separar las enzimas peroxidadas (PER) y esterasas (EST).

Se utilizaron los siguientes sistemas de buffer gel-electrodos (10): *sistema I* (buffer del gel: 15 mM tris-cítrico pH 7.8; buffer de electrodos 0.3 M borato de sodio pH 8.6); *sistema II* (buffer del gel: 65 mM histidina-cítrico pH 5.7; buffer de electrodos: 9 mM histidina-cítrico pH 5,7. Los extractos foliares de las isoenzimas de PER fueron separados por el sistema I, y las EST, con el sistema II.

En ambos sistemas los extractos absorbidos en papel Whatman se sembraron en ranuras practicadas a 4.5 m (Sistema I) y a 6.5 cm (Sistema II) del borde catódico del gel.

En todas las corridas electroforéticas se sembraron 18 muestras y un testigo. Se aplicó una corriente de 20 mA durante 3:50 h (Sistema I) y 16 mA en 3:30 h (Sistema II), manteniendo el gel refrigerado. La corrida se concluyó, cuando el frente avanzó 9 cm desde la línea de siembra.

El revelado de las isoenzimas se efectuó con técnicas estandarizadas: EST. (EC. 3.1.1.), (12): 100 ml de buffer 0.1 M tris-ClH pH 6.0, más 5 mg de Fast Garnet GBC, con el agregado de 25 mg de alfa naftil acetato, disuelto en 1 ml de agua destilada. El gel se incubó a 37°C en la oscuridad durante 3 h PER (EC.11.1.7.), (10): 10 ml de buffer 0.1 ml de acetato de sodio pH 4.5, más el agregado de 28 mg de 3-amino-9 etilcarbazol disueltos en 2 ml de dimetilformamida. El gel se reveló a temperatura ambiente agregándose en el momento peróxido de hidrógeno al 3 por ciento.

Los criterios los fenotipos isoenzimáticos fueron la presencia o ausencia de bandas, la distancia migracional, y la coloración fijada en tres intensidades: fuerte, intermedia, y débil.

RESULTADOS

Con la aplicación de los sistemas electroforéticos I y II, se obtuvo una buena resolución de bandas de peroxidadas, así como, distintos patrones de bandeado (Fig. 1 y 2). Las esterases presentaron mayor nitidez mediante el sistema I.

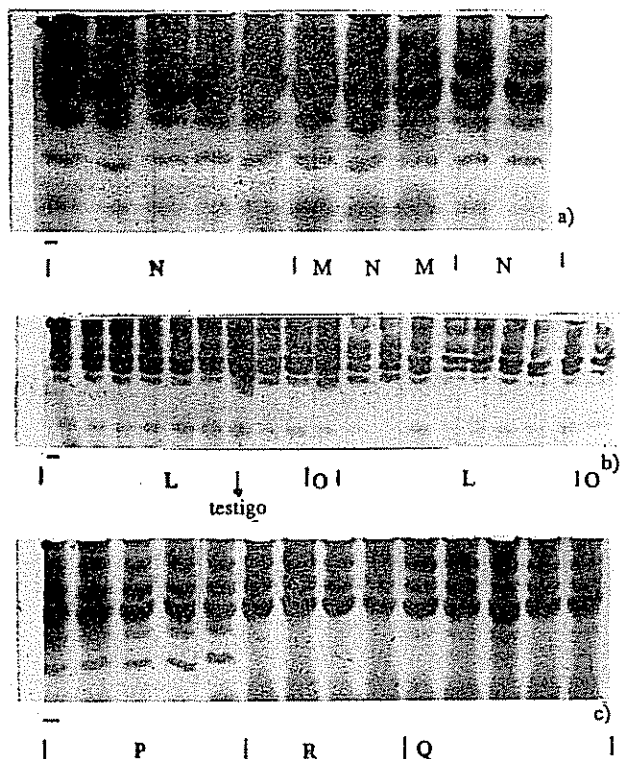


Fig. 1. Patrones de isoenzimas de peroxidadas, obtenidas con el Sistema I: a) progenie 1 mostrando dos fenotipos distintos; b) progenie 10 con dos fenotipos diferentes, la muestra 7 pertenece al testigo; c) progenie 7 con tres fenotipos distintos.

Con la utilización de un testigo, se manifestaron diferencias en la intensidad de coloración entre las distintas corridas. Estas diferencias se observaron de manera más acentuada en la zona "B" de esterases, mientras que la zona "A" presentó una coloración más estable (Fig. 3).

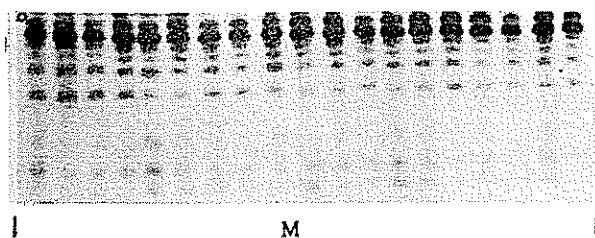


Fig. 2. Patrones de isoenzimas de peroxidadas, obtenidas con el Sistema II; las muestras pertenecen a la progenie 2

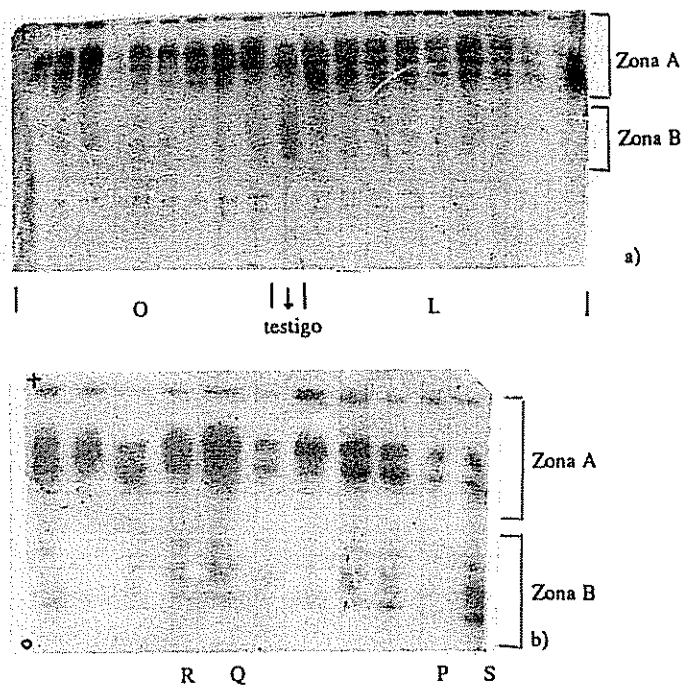


Fig. 3 Patrones de isoenzimas de esterases: a) las nueve primeras muestras corresponden a la progenie 10, la muestra diez corresponde al testigo y las restantes a la 9; b) muestras correspondientes a la progenie 2

De las plantas analizadas, se consiguieron 12 fenotipos isoenzimáticos diferentes en esterases, y 15 distintos en peroxidadas (Cuadro 1). A los fenotipos isoenzimáticos resultantes, se les asignó una letra mayúscula y a las bandas una letra minúscula.

Cuadro 1. Fenotipos isoenzimáticos en progenies de pasto llorón.

Progenies	Núm. de plantas	Fenotipos de EST	Núm. de plantas		Fenotipos de PER	
			Sistema I	Sistema I	Sistema I	Sistema II
1	20	N	20	MN	M	
2	20	P Q R S	20	N	M	
3	20	M	20	M	M	
4	20	W	20	M	M	
5	20	U	20	L	N	
6	20	I	20	L	Q	
7	20	O	20	P Q R	P	
8	20	U	20	T	M	
9	20	L	20	U	O	
10	20	O	20	L O	N	
11	20	O	20	P	L	
12	20	Z	20	S	L	
13	20	P	20	T	L	
Testigo	1	X	1	Z	M	

Las esterasas presentaron actividad en la región anódica. El número de las bandas varió de 4 a 11 por zimograma. Se distinguieron dos zonas: una "B" lenta, y otra "A" rápida (Figs. 3a y 3b). En la zona "A", se visualizó la mayor diferencia entre los distintos patrones

debido a la existencia, o no, de determinadas bandas, y la variación del número (de 2 a 6 bandas). La zona "B" resultó ser más constante en el número y en la posición de las bandas, excepto en seis zimogramas (patrones L, O, Z, T, W de la Fig. 4).

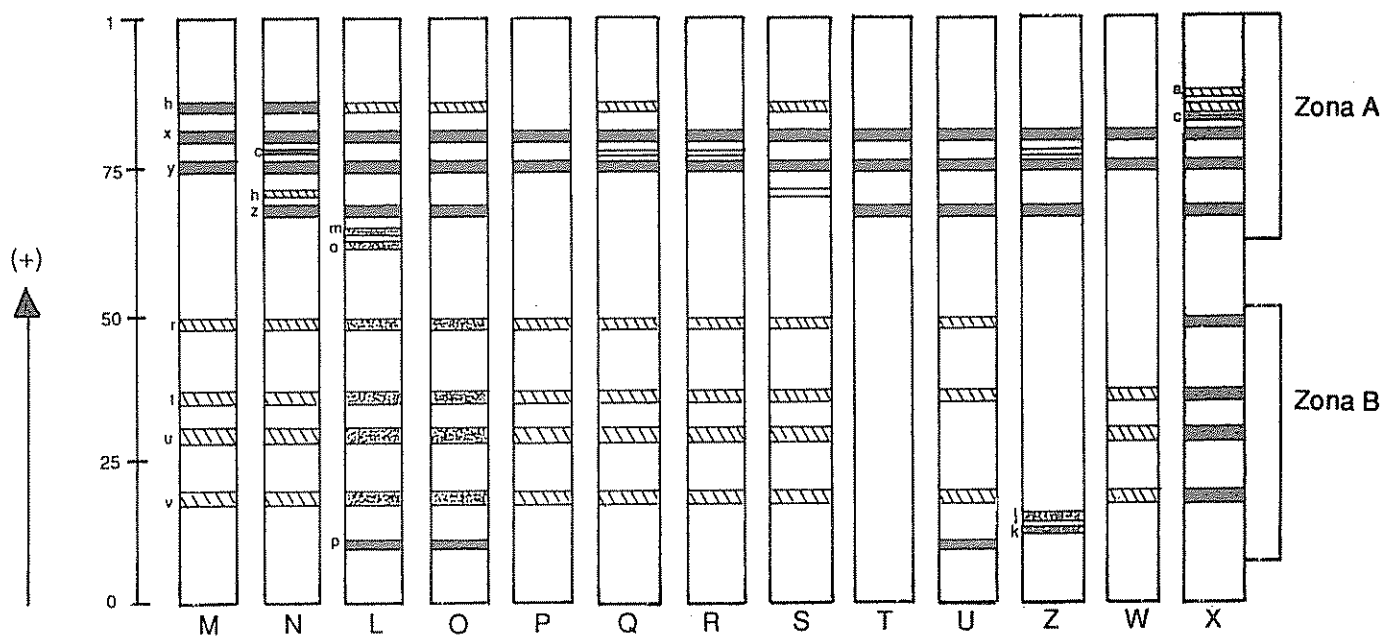


Fig. 4 Patrones isoenzimáticos de esterasas. Intensidad del coloreado de las bandas: fuerte, intermedio y débil.

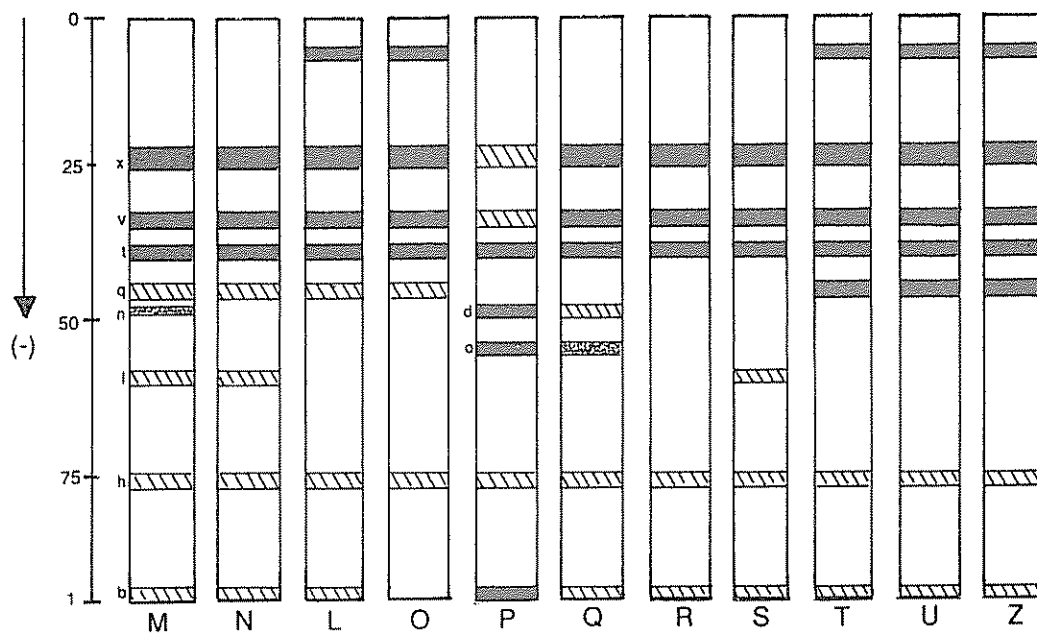


Fig. 5 Patrones isoenzimáticos de peroxidasas con el Sistema I. Intensidad del coloreado de las bandas: fuerte, intermedio y débil.

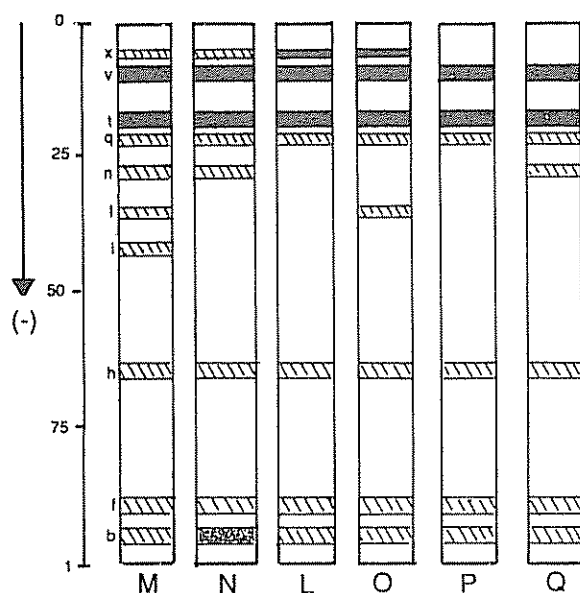


Fig. 6 Patrones isoenzimáticos de peroxidasas con el sistema II. Intensidad del coloreado de las bandas: fuerte, intermedio, débil.

Las peroxidasas presentaron actividad en la región catódica. Se obtuvieron 10 patrones isoenzimáticos con el sistema I (Fig. 5) y con el II (Fig. 6), y el número de bandas varió de 5 a 8 por zimograma respectivamente.

De las 13 progenies analizadas, la gran mayoría presentó fenotipos isoenzimáticos de peroxidasas y esterases, como se observa en la Fig. 3a. Una proporción menor de las progenies analizadas mostró patrones con variación (Cuadro 1). La progenie 2 presentó cuatro zimogramas diferentes en esterases (Fig. 3b); la progenie 7, tres patrones distintos en peroxidasas (Fig. 1c); y las progenies 1 y 10, dos zimogramas diferentes, cada una en peroxidasas (Fig. 1a y 1b).

## DISCUSION

Las pruebas de progenies realizadas para determinar variabilidad mediante caracteres isoenzimáticos permitieron observar, usando un testigo y la repetición de las muestras, la invariabilidad de los distintos patrones durante la experiencia. Esto muestra la escasa influencia del ambiente sobre las isoenzimas (2), de manera diferente ocurre con las características morfológicas, pues Smith (9) observó que los caracteres isoenzimáti-

cos establecen más diferencias entre las progenies que los morfológicos, por lo que son muy buenos marcadores.

El análisis de las plantas, dentro de cada una de las progenies del cultivar Kromdraai, muestra una apreciable variabilidad en la expresión de las isoenzimas: peroxidasas y esterases. Esta variabilidad isoenzimática corrobora la variación existente en Kromdraai, evaluada por medio de caracteres morfológicos y citológicos (1), que indican diverso grado de variabilidad fenotípica y tres tipos de saco embionario en distintas proporciones.

Las plantas de las progenies, generalmente, resultan uniformes, pero en ocasiones aparecen variantes. Esta aparición, en forma ocasional, concuerda con lo señalado por Smith (9) en las pruebas de progenies realizadas en *Panicum maximum* Jacq.

La variación, que se observa dentro de las progenies, pondría de manifiesto la existencia de sexualidad (9). De acuerdo con el polimorfismo isoenzimático hallado en el análisis de las 13 progenies, la mayor parte del cv. Kromdraai estaría compuesto por genotipos apomíticos, y una menor proporción de genotipos con reproducción sexual. Si el número de las plantas analizadas hubiera sido mayor, es posible que hubiesen aparecido más fenotipos isoenzimáticos distintos dentro de las progenies, ya que la sexualidad ocurre en forma esporádica.

Este resultado permitió identificar y seleccionar plantas madres, que producen progenies variables y, además fuera de tipo de esas progenies. Aunque 'Kromdraai' no es un cultivar muy difundido, se ha observado algunas plantas de muy buena productividad y calidad entre las progenies segregantes. Estas plantas seleccionadas podrán ser utilizadas en futuros programas de mejoramiento genético o para continuar con estudios básicos.

## CONCLUSIONES

- El cultivar Kromdraai posee cierto grado de sexualidad, por lo que es en efecto, un apomítico facultativo, aunque su reproducción es más frecuente agámica.
- El análisis de isoenzimas por electroforesis constituye una técnica adecuada para detectar y cuantificar

el grado de sexualidad en este cultivar, y, por consiguiente, en otros de comportamiento similar.

- Las ventajas que presenta el análisis isoenzimático son: a) posibilidad de analizar progenies en un estadio precoz, así como, en avanzados; b) permite analizar gran número de descendientes en corto tiempo; c) alta repetibilidad de los resultados, debido a la escasa influencia ambiental sobre el zimotipo; d) complementa, adecuadamente, el registro de observaciones morfológicas en pruebas de progenic.

#### LITERATURA CITADA

1. BRIX, K. 1974. Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees. Z. Pflanzenzuchtg 71:25-32.
2. BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. 1983. Detection and measurement of natural selection. In Isozymes in plants genetics and breeding I.D. Tanksley, T.J. Orton (Eds.). Amsterdam, Elsevier Science. p. 219-240.
3. COVAS, G. 1974. Las variedades de pasto llorón (*Eragrostis curvula*) cultivadas en la provincia de La Pampa, R.A. In Simposio sobre Pasto Llorón (2, Buenos Aires, Arg.). Santa Roca, La Pampa, Arg., Colegio Ingenieros Agrónomos. Jornada Técnica.
4. COVAS, G.; CARNIE, A. 1985. El pasto llorón (*Eragrostis curvula*): Manual con información básica y normas para su cultivo y utilización. Buenos Aires, Arg., Ed. Hemisferio Sur.
5. DI RENZO, M.A.; POVEERENE, M.M.; MEDINA, M.I. 1987. Variabilidad isoenzimática en granos de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees: Su aplicación en la identificación de cultivares. Revista de Investigaciones Agropecuarias. (En prensa)
6. LEIGH, J.H.; DAVIDSON, R.L. 1968. *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees and some other African lovegrasses. Plant Introduction Review CSIRO 5:21-44.
7. MEDINA, M.I.; DI RENZO, M.A.; TIRANTI, I.N. 1985. Identificación de cultivares de pasto llorón *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees, por medio de esterases, fosfatasas y paroxidasas. Revista de Investigaciones Agropecuarias 20:1-9.
8. POVERENE, M.M.; DI RENZO, M.A.; CURVETTO, N.R. 1988. Diferenciación de cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees, mediante electroforesis de isoenzimas. Turrialba 38:173-178.
9. SMITH, R.L. 1972. Sexual reproduction in *Panicum maximum* Jacq. Crop Science 12:624-627.
10. SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.; DARROW, D.; GASTONY, G. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers gel and electrode buffers staining schedules. American Fern Journal 73:9-27.
11. STREEMAN, L.J. 1963. Reproduction of lovegrass: The genus *Eragrostis* *E. chromelas* Steud., (Schr.) Nees, *E. lehmannii* Nees and *E. superba* Peyr. Wrightia 3:41-51.
12. VALLEJOS, E. 1983. Enzyme activity staining. In Isozymes in plant genetics and breeding. I.S.D. Tanksley, T.J. Orton (Eds.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers. p. 469-516.
13. VOIGT, P.W. 1971. Discovered of sexuality in *E. curvula*. Crop Science 11: 424-425.
14. VOIGT, P.W.; BASHAW, E. 1972. Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. Crop Science 12:843-847.
15. VOIGT, P.W.; BASHAW, E. 1976. Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. Crop Science 16:803-806.
16. VOIGT, P.W.; BURSON, B.L. 1983. Breeding of apomitic *Eragrostis curvula*. In International Grassland Congress (14.). Proceedings. J.A. Smith, V.W. Hays (Eds.). EE.UU., Westview Press. p. 160-163.