

CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE POBLACIONES ESPAÑOLAS DE RAIGRÁS ANUAL (*LOLIUM RIGIDUM* GAUD.)

OLIVEIRA, J. A. Y LÓPEZ, J. E.

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo
Apartado 10, 15080 A Coruña, España.

RESUMEN

Se caracterizaron en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña) entre 1996 y 1997 diez poblaciones españolas de raigrás anual (*Lolium rigidum* Gaud.) mediante análisis isoenzimático en 5 loci. Las poblaciones mostraron una gran variabilidad en los sistemas estudiados sin mostrar aparentemente una estructuración geográfica. Las estadísticas de genética de poblaciones fueron más altas que las citadas para otras especies alógamas y para poblaciones europeas de la misma especie (número medio de alelos=3,7 y heterocigosidad media esperada = 0,493). La diversidad genética se explicó sobre todo por el componente intrapoblacional. La diferenciación interpoblacional sólo explicó un 12% de la diversidad total. Se discute el uso de estos recursos genéticos.

PALABRAS CLAVE: recursos fitogenéticos, genética de poblaciones, isoenzimas, gramíneas forrajeras.

INTRODUCCIÓN

Lolium rigidum es una gramínea forrajera espontánea, que se comporta como mala hierba en cultivos cerealistas para grano. Sin embargo en zonas de clima mediterráneo se cultiva para pastoreo invernal, principalmente en el Sur de Australia e Italia. Esta especie es alógama autoincompatible (Fearon *et al.* 1983).

Se trata de una especie muy polimorfa, en la cual Terrel (1968) reconoce al menos dos subespecies: *Lolium rigidum subsp. rigidum*, muy extendido por la cuenca mediterránea y *Lolium rigidum subsp. rottbolloides*, limitado a las zonas costeras del Mediterráneo oriental. Actualmente su cultivo va en aumento, ya que la buena calidad del forraje, excelente adaptación al secano y resiembra automática hacen menos costoso su manejo, además la cubierta vegetal establecida actúa como barrera protectora del suelo contra la erosión. Interrumpiendo el pastoreo a partir del inicio del espigado (mediados de abril) la pradera se resemina para el año siguiente. Un ligero laboreo o el pisoteo posterior de los animales es suficiente para asegurar la siembra del próximo año. Se suele sembrar con leguminosas anuales del género *Medicago* (Delgado, 1996). En nuestro país su uso no ha llegado a generalizarse por considerarla en principio una planta que puede infectar los campos y tierras de labor. Podría ser empleada como un cultivo anual igual que el *Lolium multiflorum*, sembrada a finales de verano. Realiza la misma función práctica que el raigrás “westerwold” con la ventaja sobre aquel de soportar mejor el pastoreo, la sequía y ser menos exigente en

fertilidad, y la desventaja de ser menos productivo (Muslera y Ratera, 1984). La escasa disponibilidad de gramíneas para pastoreo en zona mediterránea en el mercado internacional de semillas, reclama programas de evaluación de germoplasma local, con el fin de crear nuevas variedades adaptadas a las condiciones climáticas semiáridas mediterráneas (Porqueddu *et al.*, 1990; Franca *et al.*, 1996). Algunos posibles usos no forrajeros de esta especie son la estabilización de taludes en autopistas, vías férreas, cauces hidráulicos, la cubrición de vertederos y bocas de mina, la revegetación de espacios naturales deteriorados etc., por su gran capacidad de autoresiembrar, y supervivencia en condiciones de estrés (baja fertilidad, sequía etc.) (Johnson *et al.* 1992). Por otra parte la utilización de cubiertas de malas hierbas segadas químicamente con herbicidas para evitar la erosión está dando muy buenos resultados en otros cultivos como el olivar (Muñoz *et al.*, 1998) donde *L. rigidum* es una mala hierba habitual. En este sentido los inconvenientes de manejar toda la flora se reducen considerablemente si se emplean tan sólo una o dos especies, para lo cual es necesario conocer su ciclo vital, necesidades y parámetros demográficos (Saavedra *et al.*, 1998).

Este estudio pretende caracterizar genéticamente una muestra de diez poblaciones de *Lolium rigidum* españolas mediante técnicas de electroforesis.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado comprende diez poblaciones naturales de raigrás anual que se recolectaron o se recibieron en forma de semilla de colaboradores. La distribución de poblaciones se puede ver en la figura 1.

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de almidón según Hayward y McAdam (1977), Ostergaard *et al.* (1985), Pollans y Allard (1985) y Greneche *et al.* (1991), estudiando unas 100 plantas por población. Como tampón de migración se utilizó histidina/citrato, procediéndose a revelar posteriormente un loci de cada sistema enzimático: ácido fosfatasa (ACP, E.C. 3.1.3.2), isocitrato deshidrogenasa (IDH, E.C. 1.1.1.42), fosfogluco-isomerasa (PGI, E.C. 5.3.1.9.), fosfogluco-mutasa (PGM, E.C. 2.7.5.1.) y shikimato deshidrogenasa (SKD, E.C. 1.1.1.25). La nomenclatura alélica y los procedimientos isoenzimáticos fueron los de Hayward *et al.* (1995).

Las frecuencias alélicas se determinaron por conteo directo. Las estadísticas estándar para describir la variabilidad genética se calcularon mediante el programa BIOSYS 1 (Swofford y Selander, 1981). Se calcularon las siguientes estadísticas: número medio de alelos por locus (A), heterocigosidad media observada (H_o), heterocigosidad media esperada en panmixia (H_s) y nº medio de genotipos para los cinco loci en cada población. Los índices

de fijación de Wright (1965) calculados fueron los siguientes: F_{IT} representa el déficit de heterocigotos relativo en la población total (las 10 poblaciones combinadas); F_{IS} que da el déficit relativo de heterocigotos en relación con cada sub-población (promediado en las 10 poblaciones). Ambos parámetros, cuando hay un exceso de heterocigotos se vuelven negativos; F_{ST} es el índice de fijación que representa el nivel de diferenciación de las poblaciones y es equivalente al D_{ST} de Nei (1977). Se calcularon las distancias modificadas de Rogers entre pares de poblaciones. La matriz de distancias se utilizó para obtener un dendrograma mediante el método UPGMA.

RESULTADOS

En la tabla 1 se resumen los índices de diversidad poblacionales. El número medio de alelos por locus y las heterocigosidades medias encontradas fueron respectivamente: $A = 3,7$, $H_O = 0,407$ y $H_S = 0,493$. Todos los loci resultaron polimórficos, de los cuales PGI2 fue el más polimórfico con hasta siete alelos, mientras que SKD1 mostró sólo tres. Siguiendo a Brown (1978), de un total de 22 alelos encontrados 16 (§) se pueden considerar comunes muy distribuidos (tabla 2), uno (*) como raro muy distribuido (frecuencia media menor de 5%, pero presente en más de la mitad de las poblaciones) y cinco (**) como raros y esporádicos. Tres alelos de esta última categoría alcanzan una frecuencia de 5% o más en al menos una población, mientras los otros tienen una frecuencia muy baja de menos del 2%. Los valores de los índices de fijación de Wright para cada locus promediados en todos los loci se dan en la tabla 3. Los valores más bajos de los índices de fijación corresponden a PGI2 y PGM1, lo cual indica que las poblaciones están en equilibrio panmítico para esos loci. Los loci ACP2, IDH1 y SKD1 mostraron unos índices F_{IS} y F_{IT} más altos, lo que ilustra sus déficits de heterocigotos. El valor medio de diferenciación interpoblacional (F_{ST}) fue de 0,104. La proporción de diversidad entre poblaciones con relación a la diversidad total (G_{ST}) se puede expresar como $D_{ST} / H = F_{ST} / (1-F_{ST})$ (Nei, 1977). En nuestro estudio $D_{ST} / H = 0,104 / 0,896 = 0,12$, es decir, sólo el 12 % de la diversidad genética se debe a la diferenciación entre poblaciones.

DISCUSIÓN

Las poblaciones locales de gramíneas en España suelen mostrar un amplio intervalo de variabilidad, como ya resaltaron otros autores (Piñeiro y Pérez, 1986; Oliveira *et al.* 1997a, Ansón *et al.* 1998), y frecuentemente presentan características de adaptación a las condiciones

locales. Ansón *et al.* (1998) encontraron mejores adaptaciones a los secanos de Aragón en poblaciones locales de *Lolium rigidum* que el cultivar comercial Wimmera.

Los índices de diversidad A (3,7), y H_S (0,493) de este estudio son mayores a los obtenidos por Balfourier *et al.* (1998) en poblaciones europeas de raigrás anual para 12 loci. También son mayores que los reseñados por Hamrick y Godt (1990) en especies alógamas con polinización anemófila. Nuestros índices de diversidad son algo superiores que los de Oliveira *et al.* (1997a) en poblaciones españolas y francesas de raigrás inglés ($A = 2,82$, $H = 0,312$) mediante diez loci, en poblaciones de raigrás italiano del Norte de España mediante nueve loci por Oliveira *et al.* (1997b), en 60 poblaciones naturales de raigrás inglés de Francia y siete loci polimórficos ($A=2,75$, $H=0,270$) por Charmet *et al.* (1993) y en 60 poblaciones y cultivares europeos de *Lolium perenne* en cinco loci ($A= 2,70$, $H=0,308$) por Loos (1994). Estos datos están de acuerdo con la hipótesis de Charmet y Balfourier (1994) de que *Lolium rigidum* es la especie del género *Lolium* con más diversidad, y que podría ser el antepasado común del género.

El valor medio de F_{IS} (0,169) es comparable con los valores reseñados por Hayward y McAdam (1977) en cultivares de *L. perenne*, Oliveira *et al.* (1997a) en poblaciones españolas y francesas de raigrás inglés. Estos valores bajos permiten concluir que las poblaciones están casi en equilibrio panmítico. El dendrograma de clasificación ascendente jerárquica a partir de la matriz de distancia modificada de Rogers (figura 2) no parece mostrar que exista una estructuración geográfica en las poblaciones de *L. rigidum* estudiadas, lo cual está de acuerdo con las observaciones de Balfourier *et al.* (1998).

El hecho de que la mayoría de la diversidad genética total se deba al componente intrapoblacional está de acuerdo con el trabajo de Hamrick y Godt (1990). Esto sugiere que con vistas a la conservación de recursos fitogenéticos, el muestreo de pocas poblaciones puede ser suficiente para preservar la mayor parte de la variabilidad isoenzimática. Para evitar los efectos de la deriva se deben utilizar tamaños de población altos.

Hasta ahora la mayor utilización de las colecciones de germoplasma había sido la obtención de variedades para una agricultura intensiva; en la actualidad hay una necesidad de promover el uso de estas colecciones para obtener variedades para una agricultura de bajos insumos (*low-input*), y para usos alternativos (campos de deporte, de esparcimiento, revegetación de suelos deteriorados etc.) en línea con los objetivos de la Política Agraria Comunitaria de aumento de las posibilidades de utilización de zonas marginales y de valorización del paisaje.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los Señores Ignacio Delgado Enguita del Servicio de Investigación Agroalimentaria de Aragón e Hipólito Medrano de la Universitat de les Illes Balears el envío de algunas muestras de *Lolium rigidum* utilizadas en este estudio.

ISOENZIMATIC CHARACTERIZATION OF SPANISH POPULATIONS OF ANNUAL RYEGRASS (*LOLIUM RIGIDUM GAUD.*)

SUMMARY

Ten accessions of annual ryegrass (*Lolium rigidum Gaud.*) collected in Spain were evaluated at Mabegondo (A Coruña). Populations showed a high variability for the enzymatic systems studied without showing a geographic structuration. Accessions were screened for allozyme diversity at five loci. Population genetic statistics were higher than those previously reported for other outbreeding species (mean number of alleles = 3.7 and mean expected heterozygosity = 0.493). Genetic diversity was mainly explained by the within population component. The between population differentiation only accounted for 12 % of the whole diversity. The use of these genetic resources is discussed.

KEY WORDS: annual ryegrass, germplasm evaluation, isozymes, population genetics

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANSÓN S., DELGADO I., MUÑOZ F., 1998. Valoración forrajera de las poblaciones de *Lolium rigidum Gaud.* del valle del Ebro. Actas de la XXXVIII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), Soria, pp. 185-188.
- BALFOURIER, F.; CHARMET, G.; RAVEL, C., 1998. Genetic differentiation within and between natural populations of perennial and annual ryegrass (*Lolium perenne* and *L. rigidum*). *Heredity*, 81, 100-110.
- BROWN A.H.D., 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52: 145-157.
- CHARMET G., BALFOURIER F., RAVEL C., 1993. Isozyme polymorphism and geographic differentiation in a collection of French perennial ryegrass populations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40, 77-89.
- CHARMET G., BALFOURIER F., 1994. Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium L.* (ryegrasses, Gramineae). *Theor. Appl. Genet.*, 87, 641-649.
- DELGADO I., 1996. Opción forrajera a los malos secanos cerealistas. *Agricultura*, 765, 295-297.
- FEARON C.H., HAYWARD M.D., LAWRENCE M.J., 1983. Self incompatibility in ryegrass. V. Genetic control in diploid *Lolium multiflorum*. *Heredity*, 50, 35-45.
- FRANCA A., FARA G.F., LEDDA L., PORQUEDDU C., CAREDDA S., 1996. Agronomic evaluation of annual ryegrass populations for the semi-arid environments. *Proceedings of the Grassland and Land Use Systems 16th E.G.F. Meeting.*, pp. 87-90.
- GRENECHE M., LALLEMAND J., MICHAUD O., 1991. Comparison of different enzyme loci as a means of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. *Seed Sci. Technol.*, 19, 147-158.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W., 1990. Allozyme diversity in plant species. In: A.D.H. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir (eds). *Plant Populations Genetics, Breeding, and Germplasm Resources*, Massachusetts, Sunderland, 43-63.

- HAYWARD M.D., DEGENNARS G.H., BALFOURIER F., EICKMEYER F., 1995. Isozyme procedures for the characterisation of germplasm, exemplified by the collection of *Lolium perenne* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42, 327-337.
- HAYWARD M.D., MCADAM N.J., 1977. Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. *Z. Pflanzenzucht*, 79, 59-68.
- JOHNSON D.E., BORMAN M.M., BEN-ALI M.N., ALI-BEN MN., 1992. Evaluation of plant species for land restoration in Central Tunisia. *Journal of Arid Environments*, 22 (4), 305-322.
- LOOS B.P., 1994. Allozyme differentiation of European populations and cultivars of *Lolium perenne* L., and relation to ecogeographical factors. *Euphytica*, 80, 49-57.
- MUÑOZ, M.; HUMANES, J.; VEGA, V.; CASTRO, J., 1988. Diseño y manejo de plantaciones de olivar. Junta de andalucía. Consejería de Agricultura Pesca y Alimentación. Monografías 22/98. Sevilla. 225 pp.
- MUSLERA E., RATERA C., 1984. Praderas y forrajes: Producción y aprovechamiento. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 702 pp.
- NEI M., 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human. Genet.*, 41, 225-233.
- OLIVEIRA J.A., BALFOURIER F., CHARMET G., ARBONES E., 1997a. Isozyme polymorphism in a collection of Spanish and French perennial ryegrass populations. *Agronomie*, 17, 335-342.
- OLIVEIRA J.A., LINDNER R., BREGU R., GARCIA A., GONZÁLEZ A., 1997b. Genetic diversity of westerwold ryegrass landraces collected in Northwest Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 479-487.
- OSTERGAARD H., NIELSEN G., JOHANSEN H., 1985. Genetic variation in cultivars of diploid ryegrass, *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*, at five enzyme systems. *Theor. Appl. Genet.*, 69, 409-421.
- PIÑEIRO J., PEREZ M., 1986. El interés agronómico de ecotipos españoles de plantas pratenses. *Pastos*, 44 (1), 103-118.
- POLLANS N.O., ALLARD R.W., 1985. Inheritance of electrophoretically detectable variants in ryegrass. *J. of Heredity*, 76, 61-62.
- PORQUEDDU C., ROGGERO P. P., BULLITTA S., VERONESI F., 1990. Evaluation and characterization of a sardenian population of *Lolium rigidum* Gaud. *Proc of European Grassland Federation. Banska Bystrica (Tchécoslovaquie)*, 444-445.
- SAAVEDRA, M.; PASTOR, M.; CASTRO, J.; HUMANES, M. D. ,1998. Utilización y manejo de cubiertas vegetales. *Agricultura*, 788, 218-222.
- SWOFFORD D.L., SELANDER R.B., 1981. BIOSYS 1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. of Heredity*, 72, 281-283.
- TERREL E., 1968. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. *Techn. Bull. US Dept. Agric.* 1392, 65.
- WRIGHT S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution*, 19, 395.

Tabla 1: Parámetros de variabilidad genética en cinco *loci* para las 10 poblaciones. A: número medio de alelos por *locus*; H_O: heterocigosis observada; H_S: heterocigosis esperada; N° Genotipos: número medio de genotipos encontrados para los 5 *loci* en cada población.

Localidad	A	H _O	H _S	N° Genotipos
Cádiz	3,2	0,129	0,276	4,4
Gomera	3,2	0,333	0,437	5,6
La Palma	4,0	0,400	0,541	7,6
Málaga	3,4	0,476	0,497	5,4
Granada	4,2	0,273	0,427	7,4
Ibiza	4,0	0,357	0,516	6,8
Pontevedra	3,8	0,556	0,584	7,2
Zaragoza	3,6	0,508	0,576	7,0
Ourense	3,4	0,585	0,569	6,0
Mallorca	3,8	0,459	0,512	7,2
Media	3,7	0,407	0,493	6,46
Error estándar	0,5	0,071	0,053	2,08

Tabla 2: Frecuencias medias de alelos detectada en las poblaciones (§ = alelo común; * = alelo raro distribuido; ** = alelo raro y esporádico).

Alelo	Frecuencia	Min	Max
PGI2-10 **	0,006	0	0,023
PGI2-20 §	0,098	0	0,326
PGI2-30 §	0,288	0,032	0,587
PGI2-40 §	0,101	0,020	0,222
PGI2-45 **	0,005	0	0,022
PGI2-50 §	0,475	0,070	0,922
PGI2-60 *	0,013	0	0,074
ACP2-20 §	0,308	0,091	0,569
ACP2-30 §	0,570	0,419	0,677
ACP2-40 §	0,109	0,012	0,205
ACP2-50 **	0,013	0	0,055
IDH1-20 §	0,156	0,032	0,371
IDH1-30 §	0,664	0,449	0,926
IDH1-40 §	0,169	0,021	0,506
IDH1-50 **	0,009	0	0,070
SKD1-20 §	0,155	0,026	0,257
SKD1-30 §	0,707	0,393	0,907
SKD1-40 §	0,137	0,009	0,405
PGM1-10**	0,019	0	0,143
PGM1-20 §	0,612	0,344	0,855
PGM1-30 §	0,293	0,145	0,404
PGM1-40 §	0,076	0	0,156

Tabla 3: Índices de fijación de Wright.

Loci	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
PGI2	0,037	0,199	0,169
ACP2	0,310	0,344	0,049
IDH1	0,285	0,369	0,118
SKD1	0,193	0,272	0,099
PGM1	0,038	0,107	0,072
Media	0,169	0,255	0,104

Figura 1: Mapa de situación de las 10 poblaciones estudiadas.

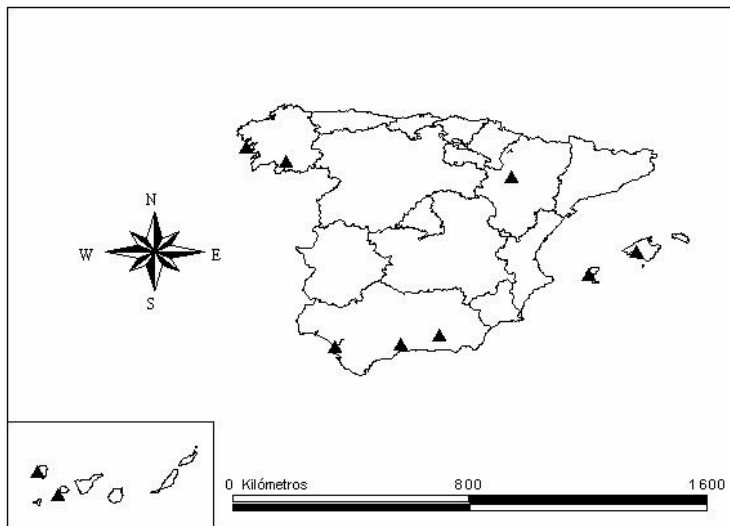


Figura 2: Dendrograma UPGMA de las 10 poblaciones estudiadas utilizando la distancia de Rogers modificada.

