

Poliformismo isoenzimático de seis poblaciones naturales de Raigrás inglés de Galicia

J. A. OLIVEIRA PRENDES ¹, G. CHARMET ²

RESUMEN

El polimorfismo de siete sistemas isoenzimáticos (PGI, GOT, ACP, PGM, 6-PGD, SHDH y EST) se ha estudiado en seis poblaciones naturales de Lolium perenne representativas de dos grupos clasificados de acuerdo con características agronómicas, con objeto de comparar la adecuación entre la clasificación agronómica y otros parámetros de variabilidad genética.

Una interpretación genética de la variación se ha formulado basándose en el tipo de bandas polimórficas así como estudios de parámetros genéticos de las poblaciones.

La diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones se ha estimado mediante varios métodos: distancias genéticas de Nei, índices de fijación de Wright, número medio de alelos por locus y heterocigosidad media.

Las poblaciones naturales de raigrás inglés presentaron variabilidad genética: el número medio de alelos por locus fue de 3,16, la heterocigosidad media fue de 0,395 y la distancia genética media de Nei fue de 0,057.

El test de Chi-cuadrado (X^2) y los índices de fijación genéticos mostraron un déficit de heterocigotos (desequilibrio

Autores: ¹ Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Apartado 10, 15080, La Coruña; ² Station d'amélioration des plantes. I.N.R.A. 63039 Clermont-Ferrand (Francia).

panmíctico) en tres de las poblaciones, debido probablemente a que el tamaño de la unidad panmíctica era más pequeño que el tamaño del área de colecta o bien al cruzamiento preferencial de individuos emparentados.

La tipología agronómica no refleja relaciones genéticas, con lo cual la mejor estrategia para conservar la variabilidad genética existente es el multiplicar independientemente un cierto número de poblaciones representativas de cada grupo agronómico.

Palabras clave: *Lolium perenne* L., electroforesis en gel de almidón, distancias de Nei, índices de fijación de Wright.

INTRODUCCIÓN

El *Lolium perenne* ($2n=14$) es una de las gramíneas pratenses más utilizada en las explotaciones ganaderas que practican el pastoreo en el Norte de España.

Las principales ventajas del raigrás inglés son su alto valor nutritivo en comparación al de la festuca alta, y su relativamente buena persistencia comparada al raigrás italiano.

Cuarenta y siete poblaciones naturales de raigrás inglés recogidas en 1985 en Galicia se han estudiado entre 1986 y 1988 en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (22 km de La Coruña). El dispositivo experimental consistió en seis bloques al azar con diez plantas de cada población en cada bloque. Después de esta evaluación agronómica un análisis de varianza ha permitido determinar las medias ajustadas de las poblaciones que se han utilizado para establecer una tipología de éstas en cuatro grupos.

El interés de realizar una tipología basada en un índice de distancia a partir de distancias agronómicas es doble:

1) Para la constitución de «poblaciones de base», con base genética más o menos amplia, utilizables en un programa de mejora genética.

2) Para conservar y multiplicar las poblaciones como recursos genéticos:

- ya sea por el reagrupamiento de poblaciones dentro de cada grupo,
- ya sea por el muestreo de ciertas poblaciones representativas de cada grupo en el caso de que éstos no presenten características genéticas comunes.

Sin embargo la clasificación a partir de características agronómicas presenta una serie de limitaciones, pues: los caracteres agronómicos son caracteres cuantitativos con herencia poligénica y muy influenciados por el ambiente. Además éstos están sometidos a la selección natural, con lo cual es posible que dos poblaciones genéticamente diferentes sometidas a las mismas presiones de selección se comporten de la misma manera de un punto de vista agronómico (convergencia evolutiva). Por estas razones la utilización de la electroforesis de isoenzimas es un útil que nos puede ayudar en la evaluación de la variabilidad genética y en cuanto a la estrategia a seguir en la conservación de recursos genéticos.

En las gramíneas pratenses hay pocos marcadores genéticos disponibles para evaluar los niveles de variación inter e intrapoblacionales. El determinismo genético de varios sistemas enzimáticos ha sido estudiado como consecuencia de los trabajos de HAYWARD, McADAM (1976), NIELSEN (1980), HAYWARD et al., (1978), OSTERGAARD et al., (1985).

Investigaciones utilizando la electroforesis se han efectuado sobre el raigrás inglés y las especies vecinas del género *Lolium* por HAYWARD, JACKSON (1971), HAYWARD, ZARUK (1982), BULINSKA-RADOMSKA, LESTER (1984), HAYWARD (1985).

Los diferentes niveles de variación genética tienen implicaciones importantes en la estrategia de recolección y conservación de genes (BROWN, 1978, YONEZAWA, ICHIHASCHI, 1989).

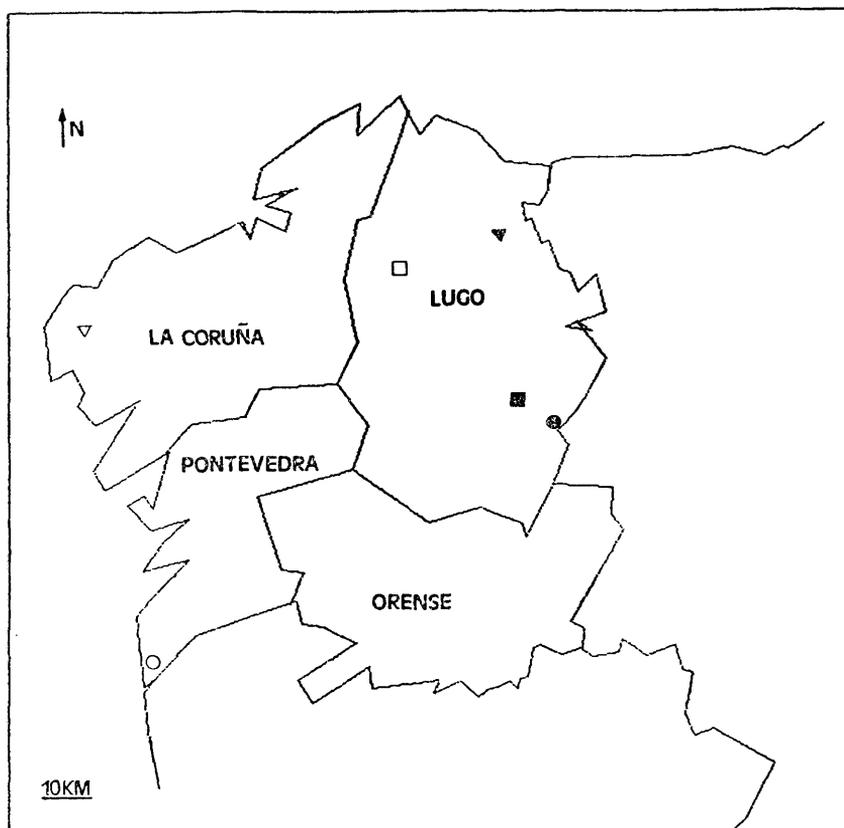
Este trabajo se inscribe en el marco de un programa de mejora de poblaciones naturales de raigrás inglés llevado a cabo en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.

Los objetivos de este trabajo son:

— Obtener las frecuencias alélicas de siete sistemas enzimáticos sobre seis poblaciones naturales de raigrás inglés representativas de los grupos clasificados de acuerdo con criterios agronómicos.

— Calcular los índices de fijación genéticos de Wright, así como las distancias genéticas de Nei entre las poblaciones.

— Comprobar si la clasificación de grupos de poblaciones basada en características agronómicas refleja relaciones genéticas mostradas por las distancias de Nei, o son el resultado de una convergencia evolutiva, con el fin de definir una mejor estrategia para la conservación de poblaciones naturales dentro de cada grupo de poblaciones agronómicamente homogéneo.



Símbolo	Población	"Pool" agronómico
Symbol	Population	Agronomic "pool"
□	938	1
○	942	1
▽	945	1
■	897	2
▼	939	2
●	941	2

Fig. 1.—Localización geográfica de seis poblaciones gallegas de *Lolium perenne*.

Fig. 1.—Geographic localization of six galician populations of *Lolium perenne*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado en este estudio comprende seis poblaciones naturales de raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) representativas de dos grupos obtenidos por un método de clasificación ascendente jerárquica a partir de 12 observaciones agronómicas. La localización geográfica de estas poblaciones se ha presentado en la figura 1.

1. *Protocolo experimental*

Por cada población se han estudiado 75-100 individuos obtenidos a partir de semillas germinadas en el invernadero durante tres a seis semanas.

Los sistemas enzimáticos utilizados han sido los siguientes:

Fosfo-glucoisomerasa (PGI), Esterasa (EST), Acido-fosfatasa (ACP), Fosfoglucomutasa (PGM), Fosfogluconato-deshidrogenasa (PGD), Glutamato-oxalato-transaminasa (GOT) y Shikimato-deshidrogenasa (SHDH). Las enzimas se han extraído sobre hojas jóvenes trituradas en un tampón de Tris-HCL 0,1M de pH 7,2 y conteniendo 0,01 % de 2-Mercapthoetanol.

Se ha utilizado la técnica de electroforesis standard en gel de almidón (SCANDALIOS, 1969). El gel (500 ml) se ha hecho con almidón hidrolizado al 12 % de concentración. La separación de las isoenzimas de PGI2, EST2 y GOT3 se ha realizado con un tampón de gel litio-borato + tris-citrato: 1 parte de litio-borato (1,5 g/l LiOH, 11,13 g/l H3BO3) y 9 partes de tris-citrato (8,48 g/l Tris, 1,47 g/l ácido cítrico) a pH 8,1. El tampón de migración utilizado ha sido litio-borato (pH 8,3) con un voltaje de 150-200 voltios durante 5 horas. La separación de las isoenzimas de PGM1, PGD2, ACP1 y SHDH1 se ha realizado con un tampón de gel histidina-citrato: 34 ml de tampón histidina-citrato (12,12 g de L-Histidina y ácido cítrico hasta ajustar a pH 6,5, 240 ml de agua desionizada). El tampón de migración utilizado ha sido histidina-citrato (200 ml tampón histidina-citrato + 1000 ml de agua desionizada) con un voltaje de 225-300 voltios durante 6 horas.

Todas las manipulaciones desde la extracción a la revelación se han realizado a bajas temperaturas (próximas a 4° C).

Una vez realizada la separación de las isoenzimas se procedió a su revelación, usando los sistemas de revelación descritos por HVID, NIELSEN (1977), OSTERGAARD et al., (1985) y NIELSEN, JOHANSEN (1986).

Finalmente los geles se incubaron en la oscuridad a 37° C, a excepción del sistema GOT que se mantuvo a temperatura ambiente.

2. Composición genética de las poblaciones

Las frecuencias genotípicas se han determinado considerando la población global (conjunto de seis poblaciones) y las subpoblaciones (cada población independiente).

La diversidad genética entre poblaciones y dentro de cada población se ha estimado por dos métodos: a) mediante el cálculo del índice de distancia genética de Nei (NEI, 1972) y b) utilizando los índices de fijación genéticos (WRIGHT, 1965, NEI, 1977).

2.1. Tratamiento de datos alélicos

En la determinación del número medio de alelos por locus se han utilizado varios parámetros:

n = número de alelos/número total de loci analizados.

H_{Oj} = Heterocigosis media observada en cada población.

H_{Sj} = Heterocigosis media calculada en cada población.

2.2. Frecuencias genotípicas

Si se considera como WRIGHT (1965) y NEI (1977) una población global dividida en subpoblaciones aisladas unas de otras por la distancia (flujo de genes disminuido), el estudio de la diversidad genética de las subpoblaciones pasa por el cálculo de las frecuencias de heterocigotos observados (H_{Oj}) y esperadas (H_{Sj}). Para un locus determinado:

$$H_{Sj} = 1 - \sum_{k=1}^h P_{jk} \quad H_{Oj} = 1 - \sum_{k=1}^h p_{jk}^2$$

siendo:

n el número de alelos, P_{jk} la frecuencia de homocigotos observada del alelo k en la subpoblación j , p_{jk} la frecuencia genética del alelo k en la subpoblación j .

El índice de fijación genético dentro de cada subpoblación j es:

$$F_{isj} = (H_{Sj} - H_{Oj}) / H_{Sj}$$

F_{isj} nos indica la desviación de la panmixia en cada lugar de colecta.

2.3. Análisis de la diversidad genética

El análisis de la diversidad genética de las poblaciones se ha hecho basándose en el estudio de la heterogeneidad genética de las poblaciones por la fórmula de (WRIGHT, 1965).

$$1 - \text{Fit} = (1 - \text{Fis}) (1 - \text{Fst})$$

El índice de fijación genético (Fis) promediando los H_{sj} en el conjunto de las subpoblaciones es $\text{Fis} = (H_s - H_o) / H_s$, donde: H_s y H_o son respectivamente las medias de H_{sj} y H_{oj} para los siete loci.

El índice de fijación genético global (Fit) se define de la misma manera que Fis, usando las frecuencias génicas y genotípicas de la población total.

$$\text{Fit} = (H_t - H_o) / H_t$$

donde:

$$H_t = 1 - \sum_{k=1}^h p_k^2 \quad \text{y} \quad H_o = 1 - \sum_{k=1}^h P_k$$

siendo H_t y H_o las frecuencias de heterocigotos esperadas y observadas en la población global respectivamente; p_k y P_k las frecuencias del alelo k y de los homocigotos observados respectivamente.

Fit nos informa sobre la desviación de la panmixia de la población global.

La medida del grado de diferenciación genética entre poblaciones se ha obtenido mediante la fórmula:

$$\text{Fst} = (H_t - H_s) / H_t$$

Mediante el método Jackknife (LEBART et al., 1982) se ha extraído del conjunto de siete loci un locus de cada vez y se han recalculado los parámetros siguientes: H_o , H_t , H_s , Fit, Fis y Fst. Se han obtenido siete valores por cada parámetro tomándose los valores extremos para tener un intervalo de cada valor medio en todos estos parámetros.

2.3.1. Medida de la divergencia genética

El estudio de la divergencia genética de poblaciones pasa por el cálculo del índice de semejanza de Nei, que es la probabilidad de identidad de alelos tomados al azar en dos poblaciones dadas.

$$I = \bar{P}_{xy} / (\bar{P}_x \cdot \bar{P}_y)^{1/2}$$

La barra que cubre las P, indica que se trata de medias de probabilidades de identidad sobre el conjunto de loci.

\bar{P}_{xy} es la media en el conjunto de loci estudiados, de la probabilidad de identidad de dos alelos tomado al azar en la población x y otro en la población y .

En el caso de un solo locus y n alelos:

\bar{P}_x y \bar{P}_y son medias en el conjunto de loci estudiados de las probabilidades de identidad de 2 alelos tomados al azar en la población x y en la población y respectivamente.

$$P_{xy} = \sum_{i=1}^h x_i y_i \quad P_x = \sum_{i=1}^h x_i^2 \quad P_y = \sum_{i=1}^h y_i^2$$

x_i es la frecuencia del alelo i en la población x

y_i es la frecuencia del alelo i en la población y

El índice de distancia genético de Nei viene dado por $D = -\ln I$. Este índice varía entre 0 (identidad de las poblaciones) a infinito (PASTEUR et al., 1987).

Se ha calculado una matriz de distancias genéticas con el programa Consistent System (CONSISTENT SYSTEM, 1981). Esta matriz se ha utilizado en una clasificación ascendente jerárquica con el criterio de agregación de medias de distancias entre poblaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Número de alelos por locus

El estudio electroforético puso en evidencia que cada uno de los siete loci analizados exhibían al menos dos alelos en cinco de las seis poblaciones estudiadas.

Los valores del número medio de alelos por locus, de la heterocigosidad calculada y de la Fis se presenta en la Tabla 1.

Las poblaciones 939, 941 y 942 mostraron un mayor número de alelos.

La población 941 representó una heterocigosis esperada más alta que el resto de las poblaciones.

Las poblaciones 941 y 945 mostraron una Fis más elevada, 0,174 y 0,147 respectivamente. Esto nos indica que estas poblaciones no están en equilibrio panmítico.

Tabla 1.—PARAMETROS DE DIFERENCIACION GENETICA EN POBLACIONES GALLEGAS DE *LOLIUM PERENNE*

Table 1.—Genetic differentiation parameters in galician populations of *Lolium perenne*

Locus	N.º alelos	Ho _j	Hs _j	X ²	Fis _j
Población 897					
PGI2	5	0,550	0,571	0,17	0,037
EST2	3	0,310	0,447	7,59***+	0,306
ACP1	3	0,543	0,518	0,16	—0,048
GOT3	3	0,060	0,087	0,91	0,310
PGM1	3	0,453	0,493	0,33	0,081
PGD2	3	0,800	0,612	5,21*—	—0,307
SHDH1	3	0,286	0,444	8,56***+	0,356
Media	3,43	0,429	0,453		0,105
Intervalo (Θ)					0,063-0,174
Población 938					
PGI2	4	0,258	0,334	0,80	0,251
EST2	2	0,179	0,300	1,95	0,403
ACP1	4	0,475	0,516	0,30	0,079
GOT1	1	0,000	0,000	0,00	0,000
PGM1	2	0,577	0,493	1,46	—0,170
PGD2	3	0,800	0,645	2,09	—0,240
SHDH1	1	0,000	0,000	0,00	0,000
Media	2,43	0,327	0,326		0,046
Intervalo					—0,013-0,094
Población 939					
PGI2	5	0,660	0,618	0,75	—0,068
EST2	3	0,370	0,370	0,00	0,000
ACP1	4	0,420	0,577	10,09***+	0,272
GOT3	3	0,263	0,236	0,13	—0,114
PGM1	3	0,404	0,473	1,09	0,146
PGD2	3	0,604	0,601	0,02	—0,005
SHDH1	3	0,191	0,191	0,00	0,000
Media	3,43	0,416	0,438		0,050
Intervalo					—0,007-0,057
Población 941					
PGI2	3	0,560	0,573	0,07	0,023
EST2	3	0,240	0,239	0,00	—0,004
ACP1	3	0,370	0,501	6,86***+	0,261
GOT3	3	0,340	0,470	6,78***+	0,276
PGM1	3	0,467	0,521	1,05	0,104
PGD2	4	0,500	0,629	6,60**+	0,205
SHDH1	4	0,234	0,361	5,38**+	0,352
Media	3,43	0,387	0,470		0,174
Intervalo					0,110-0,203
Población 942					
PGI2	5	0,630	0,649	0,15	0,029
EST2	3	0,269	0,370	4,06**+	0,273
ACP1	3	0,400	0,418	0,13	0,043
GOT3	2	0,020	0,020	0,00	0,000
PGM1	3	0,667	0,610	0,81	—0,093
PGD2	4	0,694	0,735	0,53	0,056
SHDH1	4	0,450	0,416	0,28	—0,082
Media	3,43	0,447	0,460		0,032
Intervalo					—0,008-0,053

Tabla 1 (Continuación)

Locus	N.º alelos	Ho _j	Hs _j	X ²	Fis _j
Población 945					
PGI2	5	0,590	0,595	0,01	0,008
EST2	3	0,343	0,313	0,29	-0,096
ACP1	3	0,262	0,504	19,68***	0,480
GOT3	2	0,083	0,080	0,00	-0,037
PGM1	3	0,465	0,508	0,31	0,085
PGD2	3	0,486	0,534	0,32	0,090
SHDH1	2	0,120	0,241	3,45	0,502
Media	3,00	0,335	0,396		0,147
Intervalo					0,092-0,188

- (Θ) = Intervalo calculado por el método Jackknife.
 **, * = Significativo al nivel 1 y 5 % respectivamente.
 + = Déficit de heterocigotos.
 - = Déficit de homocigotos.
 Ho_j = Frecuencia de heterocigotos observada.
 Hs_j = Frecuencia de heterocigotos calculada.
 X² = Test de Chi-cuadrado.
 Fis_j = Índice de fijación genético dentro de cada subpoblación.
- (Θ) = *Range calculated by Jackknife method.*
 **, * = *Test significant at the 1% and 5% level respectively.*
 + = *Deficiency of heterozygotes.*
 - = *Deficiency of homozygotes.*
 Ho_j = *Heterozygosity observed.*
 Hs_j = *Heterozygosity calculated.*
 X² = *Chi-squared test.*
 Fis_j = *Fixation index within subpopulation.*

Los valores del número de alelos y de la diversidad genética no ponen en evidencia diferencias significativas de variabilidad genética entre las poblaciones de los dos grupos.

La población 938 presentó valores de varios parámetros de variabilidad: número medio de alelos por locus, heterocigosis esperada y Fis respecto al conjunto global de las poblaciones debido a un efecto de muestreo por el número más bajo de individuos estudiados o al hecho de ser una población con menor variabilidad.

El número de alelos fue intermedio (3,16) entre los valores encontrados por HAYWARD (1985) en poblaciones inglesas (3,09) e italianas (3,27).

2. Heterocigosidad

En el conjunto de poblaciones, las frecuencias de heterocigotos observadas (Ho) fueron inferiores a las frecuencias de heterocigotos esperadas (Ht). Ho varió de 0,139 a 0,618 y Ht de 0,201 a 0,672. Las medias de Ho y Ht fueron respectivamente 0,395 y 0,462.

El test de X^2 (Tabla 1) no mostró diferencias significativas en el caso de PGI2 y PGM1. En cambio se encontró un déficit de heterocigotos significativo en los EST2 (poblaciones 897 y 942), ACP1 (poblaciones 939, 941, 945) y GOT3 (población 941), lo que significa que para esos loci el conjunto de las seis poblaciones no está en equilibrio panmítico. En el caso del locus PGD2 de la población 897 se encontró un déficit de homocigotos.

La heterocigosidad media observada (0,395) fue un poco superior a la observada por HAYWARD (1985) en poblaciones inglesas de *Lolium perenne* (0,372) e inferior a la observada en poblaciones italianas (0,424) (Tabla 3).

3. *Indices de fijación genética de Wright*

El índice de fijación genética F_{it} (Tabla 2) calculado en el conjunto de poblaciones estudiadas reveló una desviación respecto a la situación de panmixia a causa de un déficit de heterocigotos ($F_{it}=0,172$). El F_{it} de las poblaciones consideradas globalmente no muestra la existencia de un equilibrio panmítico de *Lolium perenne*, sino una estructuración en subpoblaciones. El índice de fijación genética (F_{is}) dentro de cada subpoblación ha mostrado valores casi nulos para los loci PGI2, GOT3 y PGM1. Esto nos ha sugerido la existencia de un equilibrio panmítico de las subpoblaciones de *Lolium perenne*. En cambio los EST2, ACP1 y SHDH1 mostraron un déficit de heterocigotos, lo que se traduce en una mayor consanguinidad en esos loci, debido a no haber ligamiento entre esos loci y los loci del sistema de autoincompatibilidad (MCADAM, 1988).

La situación de las poblaciones en relación a la hipótesis de panmixia, medida por F_{is} es diferente.

Las poblaciones 938, 939 y 942 están en equilibrio panmítico.

La existencia simultánea en la población 897 de un exceso de homocigotos en los loci EST2 y SHDH1 sólo puede explicarse (aparte de por un error experimental) por la selección de ciertos genotipos.

La población 941 mostró un déficit de heterocigotos en los loci ACP1, GOT3, PGD2 y SHDH1.

El valor medio de su F_{is} fue de 0,174, lo que indica que esta población no está en equilibrio panmítico.

La población 945 tenía un déficit de heterocigotos significativo en el locus ACP1 y su F_{is} es de 0,147.

En todas las poblaciones el locus PGI2 no ha mostrado un déficit de heterocigotos ya que éstos se han seleccionado en razón del liga-

miento entre los loci PGI2 y S (locus de autoincompatibilidad) (frecuencia de recombinación = 0,15).

Las explicaciones más probables del déficit de heterocigotos son el cruzamiento entre individuos próximos emparentados en un mismo lugar de colecta (GURIES, LEDIG, 1982) y la mezcla de individuos (durante la colecta) de varias unidades panmícticas, con frecuencias alélicas diferentes (efecto WAHLUND).

Tabla 2.—INDICES DE FIJACION GENETICOS DE WRIGHT

Table 2.—Wright's fixation indices

Locus	Ho	Ht	Fit	Hs	Fis	Fst
PGI2	0,578	0,609	0,051	0,557	-0,038	0,085
EST2	0,293	0,358	0,181	0,340	0,138	0,050
ACP1	0,404	0,549	0,364	0,506	0,201	0,078
GOT3	0,139	0,201	0,308	0,149	0,067	0,259
PGM	0,504	0,542	0,070	0,516	0,023	0,048
PGD2	0,618	0,672	0,080	0,626	0,013	0,068
SHDH1	0,229	0,306	0,252	0,275	0,167	0,101
Media	0,395	0,462	0,172	0,424	0,089	0,092
Intervalo (Jackknife)	0,358-0,438	0,427-0,506	0,149-0,192	0,390-0,470	0,061-0,101	0,073-0,086

Ho = Frecuencias de heterocigotos observadas.

Ht = Frecuencias de heterocigotos teóricos.

Fit = Índice de fijación global ($Ht - Ho/Ht$).

Hs = Frecuencias de heterocigotos esperadas sobre la media de las subpoblaciones.

Fis = Índice de fijación dentro de cada subpoblación ($Hs - Ho/Hs$).

Fst = Índice de diferenciación entre subpoblaciones ($Ht - Hs/Ht$).

Ho = *Observed heterozygosity*.

Ht = *Total gene diversity*.

Fit = *Overall fixation index*.

Hs = *Expected heterozygosity*.

Fis = *Fixation index over all subpopulations*.

Fst = *Fixation index among subpopulations*.

Debido a la poca dispersión de las semillas del raigrás inglés, es posible que la mayoría de las polinizaciones se hagan entre individuos emparentados como ocurre también en las coníferas (LEVIN, KERSTER, 1968, LIBBY et al., 1969). Esto tiene como consecuencia la formación de grupos de familias y una distribución no aleatoria de los individuos que puede sesgar las estimaciones de Fis debido a la consanguinidad.

El valor de Fst fue de 0,092. Las poblaciones 941, 897 y 945 no estaban en equilibrio panmíctico.

Ya que Fst se ha obtenido a partir de varios alelos y siendo equivalente al parámetro de diversidad genética (Gst) de Nei (NEI, 1977),

se puede suponer que aproximadamente el 91 % de la variación ($F_{st} = 0,092$) genética detectada en el raigrás inglés es intrapoblacional.

En el caso de la población 897 se ha encontrado un déficit de homocigotos en el locus PGD2. El valor medio de su F_{is} es de 0,105. El déficit de homocigotos se puede deber a varias causas:

- a) Un error experimental durante la electroforesis.
- b) Una ventaja selectiva de los individuos heterocigotos sobre los individuos homocigotos (heterosis), la que no puede ser excluida.

Los índices de fijación y las distancias genéticas confirman una débil diferenciación de las seis poblaciones naturales del raigrás inglés.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el raigrás inglés presenta una gran variabilidad sobre todo dentro de cada subpoblación, ya que la diferenciación entre poblaciones no es importante.

4. *Índices de distancias genéticas de Nei*

El dendrograma ilustrativo de la clasificación ascendente jerárquica a partir de las distancias de Nei se presenta en la figura 2.

La distancia media de Nei entre el conjunto de poblaciones estudiadas fue de 0,057 (Tabla 3).

Las poblaciones que fueron agrupadas según características agronómicas en un mismo grupo mostraron ser diferentes de acuerdo con las distancias genéticas de Nei.

El índice de distancia genética de Nei entre las poblaciones estudiadas mostró valores un poco más bajos a los encontrados por HAYWARD (1985) en poblaciones naturales italianas de raigrás inglés (0,010). En cambio era bastante más próximo del obtenido en poblaciones inglesas de raigrás inglés (0,045).

El dendrograma ilustrativo de la clasificación ascendente jerárquica a partir de las distancias de Nei entre las diferentes poblaciones no muestra una correspondencia con la clasificación de poblaciones a partir de características agronómicas.

Las distancias de Nei muestran grupos de poblaciones diferentes a los obtenidos por la clasificación agronómica. De esta manera, poblaciones que pertenezcan a un mismo grupo agronómico estarían más próximas genéticamente a las poblaciones del otro grupo agronómico (poblaciones 945 y 897 y poblaciones 942 y 939).

El hecho de no haber obtenido una correspondencia entre las distancias isoenzimáticas y las distancias agronómicas sugiere que los loci implicados no son los mismos y pueden estar sometidos a régimen de selección diferentes (BROWN et al., 1978, DAMERVAL, DE VIENNE, 1985).

DISTANCIAS

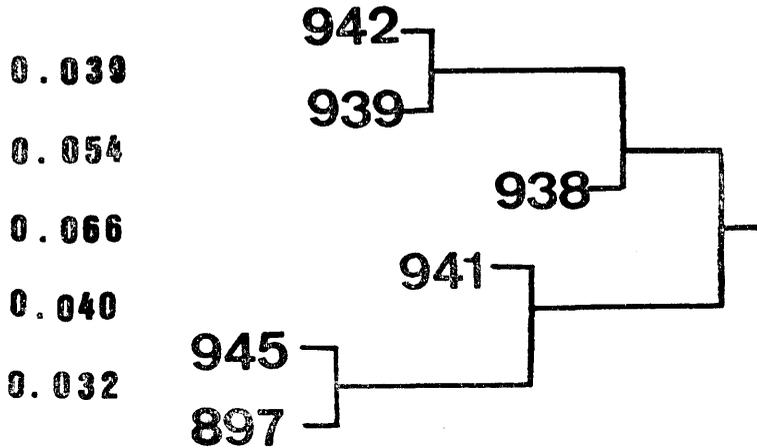


Fig. 2.—Arbol jerárquico de distancias genéticas de Nei entre seis poblaciones naturales de raigrás inglés a partir de 7 sistemas enzimáticos.

Fig. 2.—Dendogramme of Nei's genetic distances among six wild ryegrass populations from seven enzyme systems.

Tabla 3.—VARIACION GENETICA EN POBLACIONES GALLEGAS DE *LOLIUM PERENNE*

Table 3.—Genetic variation in galician populations of *Lolium*

	Ho	N.º medio alelos/locus	Distancia genética media	N.º de poblaciones
Galicia Intervalo (Jackknife)	0,395 0,358-0,438	3,16 2,33-4,66	0,057	6

Ho = Heterocigosis media observada.

* = Información obtenida a partir de siete loci y parámetros calculados según los métodos de Nei (1978).

Ho = Average heterozygosity.

* = Information based on seven loci with parameters calculated according to the methods of Nei (1978).

CONCLUSIÓN

La clasificación agronómica de gramíneas pratenses es difícil debido a las bajas heredabilidades de las observaciones agronómicas y a la presencia de interacciones genotipo x ambiente.

Una clasificación de poblaciones naturales integrando a la vez las observaciones agronómicas útiles al seleccionador y la variabilidad isoenzimática permitiría una mejor partición de los recursos genéticos del raigrás inglés, en cuanto a su utilización en selección y para su conservación.

A partir de los resultados obtenidos se puede hacer notar que la clasificación basada exclusivamente en características agronómicas no refleja necesariamente relaciones genéticas entre las poblaciones (no hay una correspondencia entre los dos tipos de clasificación). En este caso la mezcla de poblaciones dentro de cada grupo agronómico no es aconsejable a causa del riesgo de recombinación genética.

Se puede aconsejar el escoger un cierto número de poblaciones representativas de cada grupo como mejor estrategia para conservar la variabilidad existente.

Nuestras conclusiones se han obtenido a partir de resultados en los cuales puede haber factores de sesgo (muestreo, número de loci...), por lo que sería necesario intensificar este tipo de trabajos sobre más poblaciones y más loci.

Acceptado para su publicación, el 17-5-90

BIBLIOGRAFIA

- BROWN, A. H. D.; NEVO, E.; ZOHARY, D.; DAGAN, O., 1978. Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Genética*: 97-108.
- BROWN, A. H. D., 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52, 145-157.
- BULINKA-RADOMSKA, Z.; LESTER, R. W., 1984. Relationships between five species of *Lolium* (Poaceae). *PL. Syst. Evol.* 148: 169-175.
- CONSISTENT SYSTEM., 1981. *Laboratory of Architecture and Planning Massachusetts Institute of technology. Third edition.*
- DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D., 1985. Divergence morphologique et divergence moléculaire. 1. Apport des marqueurs protéiques. In M. Lefort-Buson & D. de Vienne. Les distances génétiques. Estimations et applications. I.N.R.A. Paris, pp. 61-80.
- GURIES, R. P.; LEDIG, F. T., 1982. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evolution (Lawrence, Kans.)*, 36: 387-402.

- HAYWARD, M. D.; JACKSON, J. C., 1971. The genetic organisation of populations of the inbreeding species *Lolium temulentum* L. *Heredity*, 26, 323-326.
- HAYWARD, M. D.; MCADAM, N. J., 1976. Genetic control of isoenzymes phenotypes in *Lolium perenne* L. Rep. Welsh Plant Breed Stn 1976, 28-29.
- HAYWARD, M. D.; MCADAM, N. J.; BALLS, T.; ZARUK, M., 1978. The use of isozymes as genetic markers. Rep. Welsh Plant Breed Stn 1978, 47-48.
- HAYWARD, M. D.; ZARUK, M., 1982. Allozyme variation in the inbreeding species *Lolium temulentum* L. *Heredity* 49 (2), 225-257.
- HAYWARD, M. D., 1985. Adaptation, differentiation and reproduction systems in *Lolium perenne* L. In: Genetic Differentiation and Dispersal in Plants. Ed by P. Jacquard et al., pp. 89-93.
- HVID, S.; NIELSEN, G., 1977. Esterase isozyme variants in barley. *Hereditas*. 87: 155-162.
- LEBART, L.; MORINEAU, A.; FENELON, J. P., 1982. Traitement des données statistiques. 2.^a Edition. Dunod, pp. 70-73. Paris.
- LEVIN, D. A.; KERSTER, H. W., 1968. Local gen dispersal in *Phlox*. *Evolution* 22: 130-139.
- LIBBY, W. J.; STETTLER, R. F.; SEITZ, F. W., 1969. Forest genetics and forest-tree breeding. *Ann. Rev. Genet.* 3: 469-494.
- MCADAM, N. J., 1988. Linkage relationships in *Lolium*. Rep. Welsh Plant Breed Stn 1988: 30.
- NEI, M., 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. Vol 106 (949), pp. 283-292.
- NEI, M., 1977. F-Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet. Land.* 41, 225-233.
- NEI, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- NIELSEN, G., 1980. Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium sp*) segregating for four alleles in a PGI enzyme locus. *Hereditas* 92, 49-52.
- NIELSEN, G.; JOHANSEN, H. B., 1986. Proposal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordeins and 39 isozyme loci of 47 reference varieties. *Euphytica* 36: 717-728.
- 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.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, J.; BONHOME, F.; CATALÁN, J.; BRITTON - DAVIDIEN, J., 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Lavoisier Tec & Doc. Paris.
- SCANDALIOS, J. C., 1969. Genetic of multiple molecular forms of enzymes in plant. A review. *Biochem. Genet.* 3, 37-79.
- WRIGHT, S., 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regards to systems of mating. *Evolution.* 19, 395-420.
- YONEZAWA, K.; ICHIHASHI, H., 1989. Sample size for collecting germplasms from natural plant populations in view of the genotypic multiplicity of seed embryos borne on a single plant. *Euphytica*. 41, 91-97.

SUMMARY

ISOZYME POLYMORPHISM IN SIX WILD PERENNIAL RYEGRASS POPULATIONS FROM GALICIA

Six wild populations of *Lolium perenne* representing two agronomic «pools» were scored for isozyme variants in seven enzyme systems: PGI, GOT, ACP, PGM, 6-PGD, SHDH and EST.

From the individual banding pattern a genetic interpretation of the variation was formulated and population studies of the resulting seven polymorphic enzyme loci were performed.

Genetic differentiation between and within populations was estimated using several methods: Nei's genetic distances, Wright's fixation indices, average number of alleles and average heterozygosity.

Perennial ryegrass populations were variable genetically; the average number of alleles per locus was 3.16, the average heterozygosity was 0.395 and average Nei's distance was 0.057.

Chi-squared test and Fixation indices showed a deficiency of heterozygotes relative to Hardy-Weinberg expectations for three populations, likely because either the neighbourhood size was smaller than the «sampling» area size there was a preferential crossing among related individuals.

Agronomic typology does not show genetic relationships, with which the better strategy for conserving genetic variability is to multiply independently several representative populations of each agronomic «pool».

Key words: *Lolium perenne* L., starch gel electrophoresis, Nei's distances, Wright's fixation indices.