

CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y CONTENIDO EN ADN NUCLEAR EN ACCESIONES DE CUATRO ESPECIES DE MEDICAGOS ANUALES DEL NORTE DE ESPAÑA

J.A. OLIVEIRA PRENDES Y E. AFIF KHOURI

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Escuela Politécnica de Mieres. Universidad de Oviedo. Calle Gonzalo

Gutiérrez de Quirós s/n. 33600 Mieres (España). oliveira@uniovi.es

RESUMEN

Dieciséis accesiones anuales y autógamas de cuatro especies del género *Medicago* procedentes del norte de España se caracterizaron durante dos años (2008 y 2009) en un diseño por bloques aleatorizados completos con tres repeticiones de 10 plantas por accesión (en total 30 plantas por accesión). El cv Santiago de *Medicago polymorpha* y la accesión 3710 de *Medicago arabica* se incluyeron como testigos en el estudio. Todas las accesiones y los testigos se evaluaron mediante nueve caracteres agromorfológicos. La accesión que presentó el mayor crecimiento en primavera fue la accesión 33 de *Medicago littoralis*, seguida de la accesión 29 de *Medicago lupulina*, aunque ninguna de las dos superó al cv Santiago de *Medicago polymorpha*. El cv Santiago resultó también el más precoz de floración (primera semana de abril) y el que tuvo más abundancia de inflorescencias con un hábito de crecimiento postrado. En general, las accesiones con fecha de floración tardía son las que presentaron peores crecimientos primaverales y menor abundancia de inflorescencias. Los valores medios del contenido de ADN nuclear (valor 2C) en las accesiones y los controles determinados mediante citometría de flujo muestran que *Medicago polymorpha* tiene el genoma más pequeño ($2C = 1,04$ pg, $n=2$) seguido por *Medicago littoralis* ($2C = 1,14$ pg, $n=3$), *Medicago lupulina* ($2C = 1,18$ pg, $n=12$) y *Medicago arabica* ($2C = 1,22$ pg, $n=1$) con el mayor y se correlacionaron significativamente con la anchura ($r = 0,56$, $p < 0,05$) y la longitud ($r = 0,47$, $p < 0,05$) del foliolo central de la última hoja terminal desarrollada por debajo de la flor terminal. Estos resultados sugieren que el contenido en ADN nuclear puede influir en la expresión de diferencias en el tamaño del foliolo en accesiones del género *Medicago*.

Palabras clave: Citometría de flujo, *Medicago arabica*, *Medicago littoralis*, *Medicago lupulina*, *Medicago polymorpha*.

INTRODUCCIÓN

El género *Medicago* comprende aproximadamente 83 especies (Small y Jomphe, 1989), incluyendo tanto especies perennes como anuales (Lesins y Lesins, 1979). La mayoría de las especies perennes del género *Medicago*, incluyendo la alfalfa (*Medicago sativa* L.) de gran importancia como cultivo forrajero a nivel mundial, son tetraploides ($2n=4x=32$) y alógamas (Quiros y Bauchan, 1988). Estas especies tienen un tamaño relativamente grande del genoma, de 3,4 picogramos (1 picogramo = 978 Megapares de bases) de ADN nuclear (valor $2C$ en picogramos “pg” o contenido somático de ADN nuclear, siendo C el contenido o masa absoluta de ADN del genoma haploide), y no son muy adecuadas para investigaciones fundamentales debido a ser perennes, alógamas y tetraploides (Blondon *et al.*, 1994). En comparación con las especies perennes tetraploides del género *Medicago*, la mayoría de las especies anuales del género *Medicago* son especies autógamas, mucho más homocigotas y diploides con 16 cromosomas ($2n=2x=16$), con la excepción de *Medicago constricta* Dur., *Medicago murex* Willd., *Medicago polymorpha* L., *Medicago praecox* DC., y *Medicago rigidula* Desr., que son diploides con 14 cromosomas (Diwan *et al.*, 1997). Bauchan y Elgin (1984) determinaron que *Medicago scutellata* Mill., y *Medicago rugosa* Desr., son las únicas especies anuales tetraploides con $2n=4x=30$. Algunos de los medicagos anuales, como *M. scutellata*, *M. polymorpha*, *M. rugosa* y *Medicago truncatula* Gaertn., se cultivan extensamente en Australia como forraje y abono verde (Crawford *et al.*, 1989) y en Francia se utilizan para restaurar la fertilidad en terrenos marginales como fuente de forraje de invierno (Prosperi, 1989).

Estas especies anuales tienen mayor capacidad de adaptación a estrés bióticos y abióticos (Galbraith *et al.*, 1983; Diwan *et al.*, 1994). Por otra parte, tienen un menor tamaño del genoma que la alfalfa (Arumuganathan y Earle, 1991a) por lo que se han propuesto como plantas modelos en estudios genéticos (Iantcheva *et al.*, 2003). Las especies de medicagos anuales nativas de la zona Mediterránea y derivadas de los medicagos perennes al final de la era Terciaria, tienen un alto interés agronómico, debido a que su cultivo previene la erosión del suelo y mejora la fertilidad del suelo, siendo una fuente de forraje invernal (Lesins y Lesins, 1979). La característica más importante de algunas leguminosas pratenses anuales es su uso como plantas mejoradoras de suelos más o menos arenosos, de baja fertilidad y someros, gracias a sus raíces profundas (Muslera y Ratera, 1991).

En varias especies vegetales, se ha correlacionado el contenido en ADN nuclear con numerosos caracteres fenotípicos como el tamaño celular, tamaño de polen y semillas, tasa de división celular, tasa fotosintética y tolerancia climática (Bennett y Smith, 1991; Bennett, 1998, Tatum *et al.*, 2006). El grado de correlación entre el tamaño del genoma y caracteres fenotípicos de interés agronómico puede variar dependiendo de las especies

de plantas, los caracteres fenotípicos de interés y las condiciones ambientales (Chung *et al.*, 1998).

En muchas especies vegetales, el contenido de ADN nuclear se ha utilizado para medir el nivel de ploidía (Bennett, 1987; Arumuganathan y Earle, 1991b). En el caso de tener que determinar el nivel de ploidía en un número importante de muestras, esta determinación resulta bastante laboriosa (Ollitrault-Sammarcelli *et al.*, 1994), por lo que varios autores han propuesto determinar el contenido de ADN o tamaño del genoma mediante citometría de flujo (Galbraith *et al.*, 1983) como una herramienta para incrementar la eficiencia y la velocidad de determinación de la ploidía.

Los objetivos de este estudio fueron la caracterización agromorfológica y la determinación del contenido de ADN nuclear de accesiones de medicagos anuales del Norte de España así como las relaciones entre ambos tipos de caracteres.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de las semillas

Con base en el proyecto RF02-025-C2 financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) se realizó una recolección de leguminosas pratenses con el fin de crear una colección de semillas de estas especies en la Universidad de Oviedo y contribuir a ampliar la diversidad de estas especies en la Colección Nacional del Centro de Recursos Fitogenéticos del INIA (CRF-INIA). Se recogieron en total 43 muestras de leguminosas pratenses en forma de semilla en el verano de 2003. De esas muestras, 15 fueron *Trifolium repens*, nueve *Trifolium pratense*, dos *Lotus corniculatus*, 12 de *Medicago lupulina*, tres de *Medicago littoralis*, una de *Medicago polymorpha* (syn. *hyspida*) y una de *Melilotus parviflora* (syn. *indica*). En el otoño se procedió a la limpieza de la semilla recogida y posteriormente al envío de una muestra de 4 000 semillas por accesión al CRF-INIA y se conservó el resto de la semilla en envases herméticos a 4 °C, previa desecación de las mismas con gel de sílice y realización de un ensayo de germinación. Las leguminosas perennes y alógamas (*Trifolium* y *Lotus*) se multiplicaron y caracterizaron en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo de la Xunta de Galicia, y las leguminosas anuales y autógamias (*Medicago* y *Melilotus*) en el Área de Producción Vegetal de la Universidad de Oviedo.

Las semillas estudiadas de las especies de leguminosas pratenses anuales de los géneros *Medicago* y *Melilotus*, recién cosechadas, requieren un tratamiento de escarificación previo a la siembra debido al fenómeno de dormancia o latencia, y también por si se quiere determinar su viabilidad antes del almacenaje en una colección de semillas (Oliveira *et al.*, 2007).

Caracterización agronómica

En el mes de septiembre de 2007 se sembraron en bandejas de alvéolos, 16 accesiones (Códigos 27 a 42) y dos testigos (Código 43: *Medicago polymorpha* cv Santiago y Código 44: *Medicago arabica* accesión 3710) (Tabla 1) de leguminosas anuales en el invernadero del Campus de Mieres de la Universidad de Oviedo (Asturias), obteniendo 30 plántulas por accesión. Los cultivares testigos fueron suministrados por D. Francisco González de la Finca de la Orden de la Junta de Extremadura (Badajoz). El cv Santiago fue originalmente recogido por el Dr. J.P. Simon cerca de Santiago de Chile en 1962 y se evaluó por la Universidad del Oeste de Australia durante los años posteriores. Se seleccionó por su alto rendimiento en semilla y por sus frutos sin espinas. Se registró en 1988 en la Oficina Australiana de cultivares de plantas herbáceas. El Departamento de Agricultura del Oeste de Australia mantiene la semilla de mejorador (prebase).

TABLA 1

Número de inventario en el Centro de Recursos Fitogenéticos Español (CRF-INIA) (número de accesión entre paréntesis) y orígenes de las 16 accesiones del género *Medicago* (el cv Santiago y la accesión 3710 fueron suministradas por el Banco de semillas del S.I.A de Badajoz).

Inventory number at the Spanish Genetic Resources Centre (CRF-INIA) and origins of the 16 accessions of the genus Medicago (The cv Santiago and the accession '3710' were obtained from the seed bank of the S.I.A. of Badajoz).

Código	Provincia	Localidad	Género	Especie	Lat	Long	Alt
NC079649 (27)	Asturias	Doiras	Medicago	lupulina	4322N	0652O	180
NC079651 (28)	Asturias	Grandas de Salime	Medicago	lupulina	4311N	0657O	300
NC079652 (29)	Asturias	San Martín de Oscos	Medicago	lupulina	4315N	0658O	700
NC079653 (30)	Asturias	Vegadeo	Medicago	lupulina	4327N	0703O	250
NC079654 (31)	Asturias	Navia	Medicago	lupulina	4333N	0643O	29
NC079655 (32)	Asturias	Playa de Penaronda	Medicago	lupulina	4334N	0658O	31
NC079656 (33)	Asturias	Navia	Medicago	littoralis	4333N	0643O	29
NC079657 (34)	Lugo	Reinante	Medicago	lupulina	4334N	0711O	9
NC079658 (35)	Lugo	Playa de San Cosme	Medicago	littoralis	4334N	0715O	11
NC079659 (36)	Lugo	Villanueva Lorenzana	Medicago	lupulina	4321N	0720O	500
NC079660 (37)	Lugo	Playa de San Cosme	Medicago	polymorpha	4334N	0715O	11
NC079661 (38)	Lugo	Playa de San Cosme	Medicago	lupulina	4334N	0715O	11
NC079662 (39)	Lugo	Playa de San Cosme	Medicago	lupulina	4334N	0715O	11
NC079663 (40)	Asturias	San Esteban Buitres	Medicago	lupulina	4319N	0651O	350
NC079664 (41)	León	Meroy	Medicago	lupulina	4255N	0610O	1 300
NC079666 (42)	Lugo	Reinante	Medicago	littoralis	4334N	0711O	9
"Santiago" (43)			Medicago	polymorpha			
"3710" (44)			Medicago	arabica			

En el mes de diciembre de 2007 se trasplantaron 30 plantas por accesión a una parcela de la finca "Casero" en Carreño, Asturias (43° 35' N, 5° 47' O, 80 m de altitud) en un suelo tipo Inceptisol, en líneas con una separación de 50 cm entre plantas y 2m entre accesiones para evitar un posible cruzamiento entre las mismas, aunque sean especies autógamias. Durante la primavera y el verano del año 2008 se realizó la caracterización morfológica de las accesiones y la recolección en conjunto de la semilla obtenida sobre las 30 plantas de cada accesión. Durante el otoño de 2008 se procedió a la limpieza y conservación de la semilla, enviando 3 000 semillas por accesión al Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos del INIA.

Debido a ser leguminosas anuales y haber muerto en el mes de septiembre, en el mes de octubre de 2008 se sembraron otra vez en bandejas de alvéolos las 16 accesiones y los dos testigos de leguminosas anuales en el invernadero del Campus de Mieres, obteniendo 30 plántulas por accesión. En el mes de diciembre de 2008 se trasplantaron las 30 plantas por accesión a una parcela de la finca "Casero", en líneas con una separación de 50 cm entre plantas y 2m entre accesiones. Sobre esas plantas se volvió a realizar la caracterización durante el año 2009.

Los caracteres observados durante los años 2008 y 2009 (IBPGR, 1984, 1991) fueron los siguientes: Cre = crecimiento de primavera (1=poco, 5=mucho) (carácter observado en el mes de abril), Hab = hábito de crecimiento (1=erecto, 5=postrado) (carácter observado en el mes de abril), Col = color de las flores (1=blanco, 2=amarillo, 3=violeta azul claro, 4=violeta azul oscuro, 5=violeta rojo), Floini = floración inicial (en nº de días desde el 1 de enero), Flofin = floración final (en nº de días desde el 1 de enero), Abu = abundancia de inflorescencias en floración (1=pocas, 5=muchas), Ltf = longitud del tallo floral (cm), For = forma del foliolo central (1=alargada, 5=redondeada), Lon = longitud del foliolo central (mm) y Anc = anchura del foliolo central de la última hoja terminal desarrollada por debajo de la flor terminal (mm).

Citometría de flujo

En septiembre de 2010, se sembraron diez semillas por accesión en bandejas de alvéolos (30 x 50 x 4,7 cm), 61 ml de volumen por alvéolo (Projar, Quart de Poblet, Valencia), conteniendo una mezcla de turbas y vermiculita (3:1, v/v) en el invernadero situado en el Campus de Mieres de la Universidad de Oviedo. Las plántulas se mantuvieron en el invernadero con unas temperaturas medias de 16 °C (11-20 °C), y humedad relativa media del 92% (83-99%) y un fotoperiodo medio de 11:13 (Día:Noche). Las plántulas se regaron con agua corriente una vez por día y se abonaron cada 15 días con un abono líquido 7-7-7 para suministrar 80 mg N kg⁻¹ (2 kg N ha⁻¹) en cada aplicación. En noviembre de 2010 se utilizaron las plántulas en citometría utilizando tres plantas por accesión. La preparación del material vegetal para

la citometría de flujo consiste en conseguir dispersados celulares a los que se les aísla los núcleos mediante destrucción del citoplasma con pepsina o detergentes. Finalmente los núcleos son marcados con fluorocromos que se unen estequiométricamente con los ácidos nucleicos por lo que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN nuclear (valor 2C en pg). Uno de los fluorocromos más frecuentemente usado es el Ioduro de Propidio.

Siguiendo la técnica descrita por Dolezel *et al.* (1994), se cortaron y picaron 100-200 mg de hojas frescas en trozos (1-2 mm) y se colocaron en placas Petri con 2 mL del tampón Otto I (ácido cítrico 0,1M, 0,5% v/v Tween 20 almacenado a 4 °C) con el fin de romper las células y obtener los núcleos. Las placas Petri se mantuvieron en hielo durante 15 minutos. La suspensión se filtró a través de un filtro de nylon de 50 μ m de malla en un tubo y se añadió 350 μ l del tampón Otto II (fosfato de sodio dihidrogenado 0,4M almacenado a temperatura ambiente), luego 50 μ l de la enzima ribonucleasa (RNasa A de 100 μ g/ml) y 50 μ L de una solución de ioduro de propidio de 140 μ g ml⁻¹. Como control interno se añadió también 5 μ l de una solución optimizada de hematíes de pollo (Pollo 2x). Las muestras se incubaron durante 10 minutos en hielo y a continuación se analizaron en un citómetro de flujo (Cytomics FC500, Beckman Coulter). Las lecturas se hicieron sobre al menos 10 000 eventos (núcleos) por muestra. Las señales fluorescentes se detectaron con un detector FL3 y los datos correspondientes se analizaron mediante el programa RXP Cytomics. En cada una de las muestras se determinó el contenido de ADN nuclear mediante el cociente del valor medio del pico en la muestra vegetal y el valor del pico de muestras control, multiplicado por el contenido del ADN nuclear de cada una de las muestras control, es decir, 2,33 pg/2C en la muestra control de hematíes de pollo (Costich *et al.*, 1991). Se tomaron tres medidas replicadas (tres plantas diferentes) mediante el citómetro de flujo para cada una de las accesiones de las leguminosas anuales.

Los datos obtenidos en la citometría de flujo se recogen en histogramas en los que se comparan los datos obtenidos en las accesiones de medicagos con los de los hematíes de pollo usados como control. En el eje de abscisas aparece la intensidad de la fluorescencia del ADN (contenido de ADN de núcleos de células teñidos) y en el eje de ordenadas el número total de células o núcleos con la misma intensidad de fluorescencia.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) considerando el factor año, el factor bloque o repetición jerarquizado al año debido a que se sembraron los ensayos dos años, el factor accesión y la interacción accesión y año. Los factores año y accesión se consideraron fijos y el factor bloque o repetición aleatorio.

La normalidad de los residuos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk (W) y la homogeneidad de las varianzas residuales mediante el test de Levene. La comparación de medias de las accesiones se obtuvo mediante el test de la mínima diferencia significativa (LSD). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 18 (SPSS, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización agromorfológica

Dado que el desarrollo anual está muy condicionado por la meteorología, en la Tabla 2 se recogen los datos meteorológicos de los dos años de estudio de la estación meteorológica más cercana a la parcela del ensayo de caracterización agronómica. No hubo diferencias importantes entre los dos años de estudio, lo que se refleja en la falta de significación estadística del efecto año en el análisis de varianza de las variables agromorfológicas.

Los resultados del análisis de varianza de los nueve caracteres en los dos años de estudio se resumen en la Tabla 3. El efecto accesión fue significativo para todos los caracteres. Los valores medios y las desviaciones estándar de los caracteres se resumen en la Tabla 4. No se presentan los datos de la variable color de las flores pues en todas las plantas de las accesiones estudiadas el color de las flores fue amarillo.

Se obtuvo una correlación lineal significativa entre la longitud (Lon) y anchura (Anc) del foliolo central ($r = 0,91, p < 0,01$), del crecimiento de primavera (Cre) con la longitud del tallo floral (Ltf) ($r = 0,75, p < 0,01$), con la fecha de floración inicial (Floini) ($r = -0,70, p < 0,01$), con la abundancia de inflorescencias (Abu) ($r = 0,66, p < 0,01$), con la forma del foliolo (For) ($r = 0,57, p < 0,05$), con la anchura del foliolo central (Anc) ($r = 0,55, p < 0,05$) y con la longitud del foliolo central (Lon) ($r = 0,54, p < 0,05$). También se obtuvo una correlación significativa entre la fecha de floración inicial (Floini) y la longitud del tallo floral (Ltf) ($r = -0,75, p < 0,01$) y entre la abundancia de inflorescencias (Abu) con la forma del foliolo (For) ($r = 0,70, p < 0,01$) y con la longitud del tallo floral (Ltf) ($r = 0,65, p < 0,01$).

La accesión que presentó el mayor crecimiento en primavera fue la accesión 33 de *Medicago littoralis*, seguida de la accesión 29 de *Medicago lupulina*, aunque ninguna de las dos superó al cv Santiago de *Medicago polymorpha*. *Medicago polymorpha* es una leguminosa forrajera que se adecua muy bien a rotaciones con cereales en áreas de secano, ya que produce una gran cantidad de semillas “duras”, impermeables al agua, capaces de permanecer en el suelo durante la fase de crecimiento del cereal, y de germinar al año siguiente del cultivo (Ewing y Howieson, 1989; Del Pozo *et al.*, 1989).

Según Vitale *et al.* (1998) esta especie tiene una buena adaptación en suelos ácidos y debido a su hábito de crecimiento postrado es adecuada para su utilización en pastoreo.

En general, las accesiones con fechas de floración más tardía son las que mostraron peores crecimientos primaverales y valores más bajos de abundancia de inflorescencias, perteneciendo sobre todo a *Medicago lupulina*.

TABLA 2

Temperaturas y precipitación durante los dos años de caracterización agromorfológica obtenidos en la estación meteorológica más próxima a la zona de caracterización agronómica (finca "Casero" en Carreño, Lat: 43° 35' N, Long: 5° 47' O, Altitud: 80 m). Estación meteorológica de Somio (Gijón), Lat: 43° 32' 17" N; Long: 5° 37' 26" O, Altitud: 30 m.

Temperatures and precipitations during the two years of the study obtained in the nearest meteorological station to the area of agromorphologic characterization ('Casero' parcel in Carreño, Lat: 43° 35' N, Long: 5° 47' W, Altitude: 80 m). Meteorological station at Somio (Gijón), Lat: 43° 32' 17" N; Long: 5° 37' 26" W, Altitude: 30 m.

Año	Mes	T ^a media (°C)	T ^a máxima (°C)	T ^a mínima (°C)	Precipitación (mm)
2008	1	10,2	21,6	0,2	55,6
2008	2	10,4	19,3	1,3	21,2
2008	3	10,9	20,7	0,2	149,2
2008	4	12,0	23,6	4,1	145,8
2008	5	14,6	21,4	5,1	102,4
2008	6	17,3	23,1	10,1	49,6
2008	7	18,9	28,2	11,2	39,0
2008	8	19,7	25,2	13,1	46,8
2008	9	17,2	29,1	8,5	32,8
2008	10	14,2	25,8	5,1	111,4
2008	11	10,6	21,0	1,6	194,6
2008	12	8,7	18,4	-0,4	182,4
2008		13,7			1 130,8
2009	1	8,7	20,8	-1,1	128,6
2009	2	8,5	21,9	0,4	67,2
2009	3	10,0	22,1	2,3	119,6
2009	4	11,1	20,4	2,4	69,2
2009	5	14,2	21,6	6,2	48,0
2009	6	17,6	24,8	11,0	18,8
2009	7	19,1	25,3	12,4	50,0
2009	8	19,5	28,9	13,3	52,0
2009	9	18,0	23,9	10,5	35,2
2009	10	16,5	27,1	4,3	34,2
2009	11	12,9	26,7	4,8	221,6
2009	12	8,9	19,3	-1,1	107,1
2009		13,8			951,6

TABLA 3

Cuadros medios del análisis de varianza para los factores año, repetición(año), accesión, accesión*año y error (grados de libertad entre paréntesis) de las accesiones de medicagos anuales caracterizadas durante dos años mediante nueve caracteres: Cre = crecimiento de primavera (1=poco, 5=mucho), Hab = hábito de crecimiento(1=erecto, 5=postrado), Floini = inicio de floración (en n° de días desde el 1 de enero hasta que aparecen flores en cada planta), Flofin = final de floración (en n° de días desde el 1 de enero hasta que las plantas dejan de producir flores), Abu = abundancia de inflorescencias (1=pocas, 5=muchas), Ltf = longitud del tallo floral (cm), For = forma del foliolo central (1=alargado, 5=redondeado), Lon = longitud del foliolo central (mm), Anc = anchura del foliolo central de la última hoja terminal desarrollada por debajo de la flor terminal (mm); *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, NS = $p > 0,05$.

*Mean squares of the analysis of variance for the factors year, replication (year), accession, accession*year and error (degrees of freedom within parenthesis) of the accessions of annual medicagos evaluated during two years using nine traits: Cre = spring growth (1=low, 5=high), Hab = growth habit (1=erect,5=prostrate), Floini = beginning of flowering (n° of days after January 1st), Flofin = end of flowering (n° of days after January 1st), Abu = abundance of inflorescences (1=low, 5= high), Ltf = length of the flowering stem (cm), For = shape of central leaflet (1=elongated, 5=round), Lon =length of central leaflet (mm), Anc =width of central leaflet of the last terminal leaf developed below the terminal flower (mm); *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, NS: $p > 0.05$.*

Caracteres	Cuadros medios				
	Año (1)	Repetición (Año) (2)	Accesión (17)	Accesión*Año (17)	Error (1042)
Cre	12,03NS	0,55NS	23,02***	1,04NS	0,31
Hab	0,21NS	2,40**	16,04***	0,77NS	0,40
Floini	80,03NS	47,29NS	9 072,48***	142,70NS	31,58
Flofin	33,07NS	10,28*	2 473,47***	0,12NS	3,19
Abu	0,21NS	1,13NS	65,01***	0,94NS	0,59
Ltf	37,59NS	1,95NS	21294,10***	0,55NS	2,63
For	1,63NS	0,17NS	17,18***	0,29NS	0,43
Lon	1,07NS	0,46NS	2 050,51***	2,05NS	2,00
Anc	3,79NS	1,00NS	1 461,12***	1,46NS	1,47

Citometría de flujo

El contenido en ADN nuclear presentó valores medios de $2C = 1,04$ pg en *Medicago polymorpha* (el genoma más pequeño, $n=2$), $2C = 1,14$ pg en *Medicago littoralis* ($n=3$), $2C = 1,18$ pg en *Medicago lupulina* ($n=12$) y $2C = 1,22$ pg en *Medicago arabica* (el genoma mayor, $n=1$) (Tabla 5).

TABLA 4

Medias de dos años (Desviación estándar entre paréntesis) de las accesiones de medicagos anuales para Cre = crecimiento de primavera (1=poco, 5=mucho), Hab = hábito de crecimiento (1=erecto,5=postrado), Floini = inicio de floración (en n° de días desde el 1 de enero hasta que aparecen flores en cada planta), Flofin = final de floración (en n° de días desde el 1 de enero hasta que las plantas dejan de producir flores), Abu = abundancia de inflorescencias (1=pocas, 5=muchas), Ltf = longitud del tallo floral (cm), For = forma del foliolo central (1=alargado, 5=redondeado), Lon = longitud del foliolo central (mm), Anc = anchura del foliolo central (mm); LSD = Mínima diferencia significativa al nivel del 5%.

Two-year means (SD within brackets) of the accessions of annual medicagos for Cre = spring growth (1=low, 5=high), Hab = growth habit (1=erect,5=prostrate), Floini = beginning of flowering (n° of days after January 1st), Flofin = end of flowering (n° of days after January 1st), Abu = abundance of inflorescences (1=low, 5= high), Ltf = length of the flowering stem (cm), For = shape of central leaflet (1=elongated, 5 = round), Lon = length of central leaflet (mm), Anc = width of central leaflet (mm); LSD = Least significant differences at 5% level.

Accesiones	Cre	Hab	Floini	Flofin	Abu	Ltf	For	Lon	Anc
NC079649 (27)	2,4 (0,5)	3,9 (0,7)	140,2 (3,7)	179,4 (2,1)	2,1 (0,6)	43,4 (1,4)	3,0 (0,5)	20,5 (1,5)	10,8 (1,3)
NC079651 (28)	2,3 (0,6)	2,8 (0,4)	139,8 (3,8)	183,8 (1,6)	2,2 (0,6)	32,0 (1,6)	2,6 (0,5)	20,8 (1,5)	14,8 (1,4)
NC079652 (29)	2,9 (0,6)	2,9 (0,7)	134,0 (4,2)	196,7 (1,7)	2,9 (0,6)	47,1 (1,5)	3,0 (0,7)	22,6 (1,4)	18,0 (0,9)
NC079653 (30)	2,8 (0,6)	3,0 (0,4)	135,1 (4,2)	185,3 (1,8)	3,4 (0,7)	35,6 (1,6)	2,5 (0,6)	20,6 (1,9)	16,0 (0,9)
NC079654 (31)	2,1 (0,5)	3,1 (0,7)	136,9 (5,2)	195,9 (1,7)	2,0 (0,9)	51,9 (1,5)	2,4 (0,6)	28,4 (1,4)	21,3 (1,6)
NC079655 (32)	2,1 (0,6)	3,1 (0,4)	135,0 (6,6)	190,3 (2,1)	1,7 (0,8)	21,9 (1,8)	2,2 (0,5)	15,2 (1,1)	9,1 (0,9)
NC079656 (33)	3,3 (0,5)	3,0 (0,8)	128,8 (7,3)	181,1 (1,6)	3,7 (1,3)	54,6 (2,0)	2,9 (0,9)	28,8 (1,4)	20,4 (1,4)
NC079657 (34)	2,1 (0,6)	3,5 (0,8)	136,3 (5,6)	196,6 (1,5)	1,6 (0,8)	21,3 (1,9)	2,8 (0,7)	9,3 (1,8)	5,0 (1,4)
NC079658 (35)	1,5 (0,7)	3,0 (0,8)	124,2 (1,5)	194,7 (1,7)	1,5 (0,7)	46,9 (1,3)	2,5 (0,8)	10,8 (1,2)	4,2 (0,9)
NC079659 (36)	2,0 (0,5)	2,6 (0,6)	138,3 (3,8)	196,7 (1,6)	4,2 (1,1)	30,0 (1,4)	3,3 (0,8)	15,7 (1,1)	10,5 (1,3)
NC079660 (37)	2,7 (0,8)	4,0 (0,7)	130,2 (10,4)	180,1 (1,6)	4,7 (0,6)	71,3 (1,5)	3,1 (0,5)	21,0 (1,4)	15,0 (1,3)
NC079661 (38)	1,6 (0,9)	4,0 (0,7)	138,2 (8,1)	184,4 (1,7)	2,8 (0,7)	39,1 (1,5)	2,9 (0,6)	12,6 (1,2)	8,2 (1,1)
NC079662 (39)	1,6 (0,6)	2,7 (0,7)	137,0 (8,1)	184,3 (2,2)	2,2 (0,6)	30,9 (1,6)	2,2 (0,6)	18,7 (1,4)	8,6 (1,1)
NC079663 (40)	2,0 (0,6)	3,5 (0,6)	139,7 (5,4)	184,4 (1,9)	2,8 (0,5)	39,5 (1,6)	2,9 (0,7)	10,6 (1,3)	7,4 (1,2)
NC079664 (41)	1,9 (0,5)	3,4 (0,8)	146,1 (2,8)	196,4 (1,8)	2,5 (0,7)	30,2 (1,4)	2,8 (0,6)	12,5 (1,2)	9,8 (1,1)
NC079666 (42)	2,5 (1,4)	2,3 (0,5)	104,7 (8,6)	184,2 (1,7)	3,1 (0,9)	76,2 (1,8)	3,5 (0,6)	24,8 (1,4)	14,9 (0,9)
“Santiago” (43)	4,0 (0,6)	3,9 (1,1)	98,1 (2,5)	184,1 (1,9)	4,6 (0,6)	86,8 (1,8)	3,6 (0,7)	18,5 (1,4)	11,7 (1,4)
“3710” (44)	2,3 (0,6)	3,9 (0,6)	124,5 (1,6)	184,1 (1,8)	4,3 (0,6)	69,6 (1,6)	4,4 (0,8)	16,3 (1,5)	14,6 (1,3)
LSD ($p = 0,05$)	0,2	0,2	2,1	0,7	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4

TABLA 5

Medias (Desviación estándar entre paréntesis) para el contenido en ADN (valor 2C) en pg en las 16 accesiones y dos testigos. LSD = Mínima diferencia significativa al nivel del 5%.

Means for the DNA content (2C-value) in pg (SD within brackets) for 16 accessions and two controls. LSD = Least significant differences at 5% level.

Accesiones	DNA (pg)
NC079649 (27)	1,27(0,01)
NC079651 (28)	1,23(0,02)
NC079652 (29)	1,22(0,13)
NC079653 (30)	1,23(0,02)
NC079654 (31)	1,35(0,23)
NC079655 (32)	1,29(0,35)
NC079656 (33)	1,21(0,02)
NC079657 (34)	1,03(0,02)
NC079658 (35)	1,02(0,02)
NC079659 (36)	1,14(0,02)
NC079660 (37)	0,99(0,02)
NC079661 (38)	1,07(0,02)
NC079662 (39)	1,00(0,02)
NC079663 (40)	1,21(0,02)
NC079664 (41)	1,16(0,24)
NC079666 (42)	1,21(0,03)
“Santiago” (43)	1,09(0,02)
“3710” (44)	1,22(0,02)
LSD (p=0,05)	0,18

El análisis de citometría de flujo de los núcleos aislados de las hojas de las accesiones de los medicagos anuales mostró sólo un pico en los histogramas que representan el nº de células teñidas con la fluorescencia en función de la intensidad de la fluorescencia. Por ejemplo, en la Figura 1 se muestra que el pico de fluorescencia en la accesión 33 de *Medicago littoralis* se situó a la izquierda del pico de la fluorescencia de las células de hematíes de pollo usadas como control indicando, que tuvieron un contenido en ADN nuclear (valor 2C) más bajo.

Los valores obtenidos del contenido de ADN nuclear en las accesiones de medicagos anuales están en correspondencia con los obtenidos por otros autores en las mismas especies diploides (Diwan *et al.*, 1997; Iantcheva *et al.*, 2003), lo que indica que las accesiones estudiadas son diploides. Las accesiones de *Medicago lupulina*, 31, 32 y

41 mostraron la mayor variabilidad en el contenido de ADN (mayores desviaciones estándar). El contenido en ADN nuclear debería ser más o menos constante entre los individuos de una población, siempre que haya suficiente intercrucamiento entre ellos. Sin embargo, casi siempre hay algo de variación cromosómica dentro de las poblaciones, debida a duplicaciones y deleciones, poliploidías y aneuploidías espontáneas, cromosomas B y en casos especiales a la presencia de cromosomas sexuales (Greilhuber, 1998; Murovec *et al.*, 2009). Se esperaría una alta uniformidad en el contenido de ADN nuclear en poblaciones autógamas como es el caso de los medicagos anuales, sin embargo no se puede excluir, una cierta heterogeneidad en el contenido de ADN cuando en el proceso de recolección de semilla se mezclan las semillas de varias plantas procedentes de la misma accesión, como ocurre también en plantas apomícticas (Murovec *et al.*, 2009). La determinación del nivel de ploidía es útil para la selección y mejora genética de estas especies. Nuestros resultados muestran el valor del contenido en ADN en picogramos para estas especies, siendo más fácil y rápido determinar el contenido en ADN que realizar un conteo de cromosomas con microscopía óptica. Se obtuvo una correlación lineal significativa y positiva entre el contenido en ADN y la anchura ($r = 0,56$, $p < 0,05$) y longitud ($r = 0,47$, $p < 0,05$) del foliolo central de la última hoja terminal desarrollada por debajo de la flor terminal. Las correlaciones positivas entre el contenido en ADN nuclear y el tamaño (longitud y anchura) de la hoja obtenidas en este trabajo sobre medicagos son similares a las obtenidas en otras especies por Chung *et al.* (1998) y Sugiyama *et al.* (2002). Aunque estas correlaciones significativas obtenidas pueden estar influidas por el pequeño número de accesiones junto a la variabilidad en el contenido de ADN entre las accesiones, estos resultados sugieren que el contenido en ADN nuclear puede influir en la expresión de diferencias fenotípicas en accesiones del género *Medicago*. El conocimiento del contenido de ADN nuclear tiene aplicabilidad en una amplia variedad de campos biológicos, como en ecología, biología celular y molecular (Bennett y Leitch, 1997), estando correlacionado con parámetros celulares, morfológicos, fisiológicos (Gregory, 2002). En este sentido, Iantcheva *et al.* (2003) mostraron en un estudio sobre especies anuales y diploides de medicagos de Argelia, que los genotipos con menor tamaño de genoma tenían un mayor potencial de formación de embriones somáticos en cultivo “in vitro”, lo que facilitaba la selección de los mismos.

CONCLUSIÓN

En la caracterización agromorfológica realizada durante los años 2008 y 2009 en dieciséis accesiones anuales y autógamas del género *Medicago* procedentes del norte de España, la accesión que presentó el mayor crecimiento en primavera fue la accesión

33 de *Medicago littoralis*, seguida de la accesión 29 de *Medicago lupulina*, aunque ninguna de las dos superó al cv Santiago de *Medicago polymorpha*. El cv Santiago resultó también el más precoz de floración (primera semana de abril) y el que tuvo más abundancia de inflorescencias con un hábito de crecimiento postrado. En general, las accesiones con fecha de floración tardía son las que presentaron peores crecimientos primaverales y menor abundancia de inflorescencias.

El contenido medio de ADN nuclear (valor 2C) en las accesiones y los controles, determinado mediante citometría de flujo, muestra que *Medicago polymorpha* (2C = 1,04 pg, n=2) fue el que menor tamaño del genoma tuvo, seguido por *Medicago littoralis* (2C = 1,14 pg, n=3), *Medicago lupulina* (2C = 1,18 pg, n=12) y *Medicago arabica* (2C = 1,22 pg, n=1) con el genoma mayor. Estos resultados sugieren que el contenido en ADN nuclear puede influir en la expresión de diferencias en el tamaño del foliolo en accesiones del género *Medicago*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado mediante la financiación aportada por el proyecto INIA RF2006-00012-C02-01: "Multiplicación y caracterización primaria de leguminosas pratenses recogidas en la Cordillera Cantábrica". Se agradece a las estudiantes de la Titulación de Ingeniería Forestal de la Escuela Politécnica de Mieres, Maria Gayol Villar y Yolanda Martínez Reguera por la ayuda en los trabajos de limpieza de las semillas, caracterización agromorfológica y análisis de laboratorio en las accesiones de los *Medicagos*, así como a Ana Salas Bustamante, técnico del Laboratorio de Citometría del Servicio Científico-Tecnológico, Biomedicina, del Edificio Científico-Tecnológico del Campus del Cristo de la Universidad de Oviedo por la ayuda en la realización de los análisis de citometría de flujo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D., 1991a. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter.*, **9**(3), 208-218.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D., 1991b. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol. Biol. Reporter.*, **9**(3), 229-233.
- BAUCHAN, G.R.; ELGIN, J.H. Jr., 1984. A new chromosome number for the genus *Medicago*. *Crop Sci.*, **24**, 193-195.
- BENNETT, M.D., 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol.*, **106**, 177-200.
- BENNETT, M.D., 1998. Plant genome values: How much do we know?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. **95** pp. 2011-2016 (<http://www.pnas.org/content/95/5/2011.full.pdf+html>).

- BENNETT, M.D.; LEITCH, I., 1997. Nuclear DNA amounts in Angiosperms-583 new estimates. *Annals of Botany*, **80**, 169-196.
- BENNETT, M.D.; SMITH, J.B., 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **334**, 309-345.
- BLONDON, F.; MARIE, D.; BROWN, D.; KONDOROSI, A., 1994. Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* species. *Genome*, **37**, 264-270.
- COSTICH, D.E.; MEAGHER, T.R.; YURKOW, E.J., 1991. A rapid means of sex identification in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **9**, 359-370.
- CRAWFORD, E.J.; LAKE, A.W.H.; BOYCE, K.G., 1989. Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in southern Australia. *Adv. Agron.*, **42**, 399-437.
- CHUNG, J.; LEE, J.H.; ARUMUGANATHAN, K.; GRAEF, G.L.; SPECHT, J.E., 1998. Relationships between nuclear DNA content and seed and leaf size in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* **96**, 1064-1068.
- DEL POZO, A.; OVALLE, C.; AVENDAÑO, J.; DEL CANTO, P., 1989. Adaptation of *Medicago polymorpha* to a subhumid Mediterranean zone of Chile. *Proceedings of the 16th International Grassland Congress*, 1539-1540. Nice (France).
- DIWAN, N.; BHAGWAT, A.A.; BAUCHAN, G.R.; CREGAN, P.B., 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, **40**, 887-895.
- DIWAN, N.; BAUCHAN, G.R.; MCINTOSH, M.S., 1994. A core collection for the United States annual *Medicago* germplasm collection. *Crop Science*, **34**, 279-285.
- DOLEZEL, J.; LUCRETTI, S.; I. SCHUBERT, I., 1994. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. *Crit. Rev Plant Sci.*, **13**, 275-309.
- EWING, M.; HOWIESON, J., 1989. The development of *Medicago polymorpha* L. as an important pasture species for southern Australia. *Proceedings of the 16th International Grassland Congress*, 197-198. Nice (France).
- GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E., 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, **220**, 1049-1051.
- GREGORY, R., 2002. Genome size and developmental complexity. *Genetica*, **115**, 131-146.
- GREILHUBER, J., 1998. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany*, **82**, 27-35.
- IANTCHEVA, A.; BROWN, S.; ATANASSOV, A., 2003. Flow cytometry analysis in diploid *Medicago* species from Algeria: relationship between genome size and competence for direct somatic embryo formation. *Biotechnology and Biotechnological equipment*, **17(2)**, 44-49.
- IBPGR, 1984. Forage legume descriptors. International Board for Plant Genetic Resources, 24 pp. Rome (Italy).
- IBPGR, 1991. Descriptors for annual medicago. International Board for Plant Genetic Resources, 33 pp. Rome (Italy).
- LESINS, K.; LESINS, L., 1979. Genus *Medicago* (*Leguminosae*). A taxogenetic study. Dr. W. Junk Publisher, 132 pp. The Hague (The Netherlands).
- MUROVEC, J.; KASTELEC, D.; VILHAR, B.; ČOP, J.; BOHANEC, B., 2009. High variability of nuclear DNA content in cultivars and natural populations of *Poa pratensis* L. in relation to morphological characters. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **51/2**, 45-52.

- MUSLERA, E.; RATERA, C., 1991. *Praderas y forrajes: Producción y aprovechamiento*. Mundi-Prensa, 674 pp. Madrid (España).
- OLIVEIRA, J.A.; AFIF, E.; ORTIZ, J., 2007. Evaluación de un método de escarificación mecánica en la germinación de semillas de leguminosas pratenses. *Pastos*, 37 (2), 179-191.
- OLLITRAULT-SAMMARCELLI, E.; LEGAVE, J.M.; MICHAUX-FERRIERE, N.; HIRSCH, A.M., 1994. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actmidium*. *Sci. Hortic.*, 57, 303-313.
- PROSPERI, J.M., 1989. Selection of annual medics for French Mediterranean regions. En: *Workshop on introducing the ley farming system to the Mediterranean basin*, 173-191. Ed. S. CHRISTIANSEN, L. MATERON, M. FALCINELLI, P. COCKS. Perugia (Italy).
- QUIROS, C.F.; BAUCHAN, G.R., 1988. The genus *Medicago* and the origin of *Medicago sativa* complex. En: *Alfalfa and alfalfa improvement*, 93-124. Ed. A.A. HANSON, D.K. BARNES, R.R. HILL. Agronomy Monograph No. 29. American Society of Agronomy – Crop Science Society of America – Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin (EEUU).
- SMALL, E.; JOMPHE M., 1989. A synopsis of the genus *Medicago* (*Leguminosae*). *Canadian Journal of Botany*, 67, 3260–3294.
- SPSS, 2009. SPSS for Windows, *version 18*. SPSS Inc. Chicago (EEUU).
- SUGIYAMA, S.; YAMAGUCHI, K.; YAMADA, T., 2002. Intraspecific phenotype variation associated with nuclear DNA content in *Lolium perenne* L. *Euphytica* 128, 145-151.
- TATUM, T.C.; NUNEZ, L.; KUSHAD, M.M.; RAYBUM, A.L., 2006. Genome size variation in pumpkin (*Cucurbita sp.*). *Annals of Applied Biology*, Volume 149, Issue 2 145-151.
- VITALE, M.; PUPILLI, F.; LABOMBARDA, P.; ARCIONI, S., 1998. RAPD analysis reveals a low rate of outcrossing in burr medic (*Medicago polymorpha* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 337–342.

AGROMORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND NUCLEAR DNA CONTENT IN ANNUAL MEDICAGO ACCESSIONS IN NORTHERN SPAIN

SUMMARY

Sixteen annual, autogamous *Medicago* accessions collected in northern Spain were characterized in two successive years (2008 and 2009) in a completely randomized block design with three replications of 10 plants per accession (in total 30 plants per accession). Cv Santiago of *Medicago polymorpha* and the accession 3710 of *Medicago arabica* were included as controls in the study. Nine agromorphological traits were used to evaluate all the accessions and controls. The accession that showed the highest spring growth was the accession 33 of *Medicago littoralis* followed by the accession 29 of *Medicago lupulina* although none of them exceeded the cv Santiago of *Medicago polymorpha*. Cv Santiago showed also high inflorescence abundance, prostrate growth habit and early flowering. In general, the late flowering accessions showed the lowest spring growth and less inflorescence abundance. The average nuclear DNA content (2C-value) of the accessions and controls, assessed by flow cytometry, shows that *Medicago polymorpha* has the smallest genome (2C = 1.04 pg, n=2), followed by *Medicago littoralis* (2C = 1.14 pg, n=3), *Medicago lupulina* (2C = 1.18 pg, n=12) and *Medicago arabica* (2C = 1.22 pg, n=1) with the largest one. A significant linear correlation was found between the nuclear DNA content and the width ($r = 0.56$, $p < 0.05$) and length ($r = 0.47$, $p < 0.05$) of the central leaflet of the last terminal leaf, developed under the terminal flower. These results suggest that nuclear DNA content can play an important role in determining leaf size differences between accessions of *Medicago*.

Key words: flow cytometry, *Medicago arabica*, *Medicago littoralis*, *Medicago lupulina*, *Medicago polymorpha*.