

## ESTUDIO ISOENZIMÁTICO EN DIFERENTES MUESTRAS DE *MEDICAGO SATIVA* TETRAPLOIDE

M.R. MORALES CORTS y M.C. CRESPO MARTÍNEZ

Dpto de Pastos y Forrajes. SIA. Junta de Castilla-León.  
Apdo Oficial. 37008 Salamanca (España)

### RESUMEN

Se ha realizado el análisis de diversos sistemas enzimáticos en 12 muestras de *Medicago sativa* mediante la técnica de electroforesis en gel de almidón con el objeto de diferenciar unas muestras de otras. A pesar de la gran variabilidad genética que cabría esperar por tratarse de una especie tetraploide y alógama, en el estudio de algunos sistemas isoenzimáticos no se han encontrado polimorfismos. Para aquellos enzimas que sí los han mostrado y que han sido más claros de interpretación, el estudio y comparación de las frecuencias alélicas ha permitido diferenciar algunas de las variedades comerciales actuales. Al no poder conseguir la distinción de todas las muestras ensayadas y debido a la complejidad de este sistema, consideramos que podría ser interesante, con el fin de poder diferenciar futuras variedades de alfalfa, realizar una selección de los individuos homocigotos para los alelos de los loci polimórficos, lo cual permitiría la creación de variedades con un buen valor agronómico y diferenciables isoenzimáticamente.

**Palabras clave:** Electroforesis, zimograma, polimorfismo.

### INTRODUCCIÓN

La especie *Medicago sativa* tiene como genomio representativo  $x=8$ . Las variedades y ecotipos cultivados presentan en su mayoría una constitución genética  $4x=32$ , autotetraploide y de fecundación alógama, lo cual determina la gran variabilidad existente en los caracteres agronómicos y morfológicos que presenta esta especie. La existencia de esta gran variabilidad incluso a nivel intravarietal hace que sea difícil el reconocimiento a través de estos caracteres que se usan como descriptores de las distintas variedades.

Las isoenzimas son los productos enzimáticos de un sólo locus que migran de forma distinta cuando se las somete a un campo eléctrico. El polimorfismo de las bandas se produce bajo control de genes codominantes y se heredan de forma monogénica

de acuerdo con las proporciones mendelianas. Cualquier variación entre las bandas que aparecen en los zimogramas son atribuibles a diferencias genotípicas entre las muestras que se están comparando.

Tienen varias ventajas sobre otros marcadores moleculares puesto que son los que mejor se conocen, son enzimas de buena calidad al ser codominantes y repetibles, se determinan mediante un procedimiento rápido, son baratos y excelentes para identificar.

Presentan también ventajas sobre los marcadores genéticos convencionales porque permiten que el mejorador realice la identificación en plántulas, proporcionan un considerable ahorro de espacio en el campo y en el invernadero. Además, no hay epistasias ni relación con efectos medioambientales o morfológicos (Carepetian *et al.*, 1994).

Un objetivo de la Asociación Internacional de Identificación de Semillas es estudiar y proponer métodos que serán incluidos en las normas del ISTA (International Seed Testing Association). Test bioquímicos como la electroforesis han sido estandarizados para algunas especies como el trigo y la cebada y otros géneros como el *Lolium* están actualmente bajo estudio.

La electroforesis de isoenzimas puede usarse para:

- Determinación de variabilidad genética.
- Registro de nuevas variedades.
- Certificación de semillas mediante comprobación de identidad varietal o determinación de la pureza específica de lotes (Loos, 1993; Smith y Wich, 1986; Nielsen y Johansen, 1986; Greneche *et al.*, 1991).
- Determinación de alogamia.
- Determinación de niveles de ploidía.
- Identificación de material en programas de mejora genética Quirós (1980), Quirós y Kerbi (1982).
- Estudio del tipo de segregación en tetraploides (cromosómica o cromatídica).
- Estudio de ligamiento con caracteres de interés agronómico.

El uso de isoenzimas como marcadores genéticos para la caracterización de colecciones de germoplasma está reconocido ampliamente y se ha utilizado con este propósito en la evaluación de la variabilidad del género *Medicago* (Quirós, 1981, 1983), utilizando como sistemas isoenzimáticos: esterasas, ácido fosfatasa, leucín-aminopeptidasas y peroxidasa.

En nuestro estudio se ensayan nueve sistemas no descritos anteriormente para este género: aconitasas, alcohol-deshidrogenasas, aspartato-aminotransferasas, 6-fosfo-

gluconato-deshidrogenasas, fosfoglucoisomerasas, fosfoglucomutasas, isocitrato-deshidrogenasas, malato-deshidrogenasas y superóxido-dismutasas.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la utilización de la electroforesis de isoenzimas para la diferenciación de variedades de *Medicago sativa*.

Para ello se han analizado 12 sistemas isoenzimáticos en 12 tipos de *M.sativa*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material vegetal utilizado y extracción

Como tejido se ha usado hoja joven de unos 20 días de edad ya que con el tiempo se acumulan sustancias oxidantes tipo polifenoles o taninos que interfieren con las enzimas en la tinción.

Se han analizado 726 plantas pertenecientes a 12 muestras de distintas variedades de la especie *M. sativa*: 6 muestras seleccionadas por sus caracteres agronómicos y morfológicos a partir de 97 líneas recogidas de alfalfas del ecotipo Tierra de Campos (94 plantas de T.C. 3 , 21 plantas de T.C.6, 32 plantas de T.C.24, 105 plantas de T.C.63, 125 plantas de T.C.80 y 47 plantas de T.C.92) y seis muestras comerciales bastante extendidas (48 plantas de Aragón, 90 plantas de Europe, 44 plantas de Milfeuil, 41 plantas de Ranger, 42 plantas de Vertus y 42 plantas de Victoria).

La procedencia de las muestras de T. de Campos es la siguiente:

- TC - 3 Revellinos (Zamora)
- TC - 6 Villafrechos (Valladolid)
- TC - 24 Vega de Ruiponce (Valladolid)
- TC - 63 Villerpas (Palencia)
- TC - 80 Villanueva del Cerrato (Valladolid)
- TC - 92 Gatón de Campos (Palencia)

El tampón de extracción es el mismo que se utiliza para el gel, añadiendo un 2,5% de PVP 40 y un 0,25% de 2-mercaptoethanol. En un recipiente se coloca el tejido y se machaca con 0,4 ml del tampón. Con ello se impregna un papel Whatman de tamaño 0,5 x 10 mm. El papel se seca antes de introducirlo en el gel.

### Sistemas enzimáticos ensayados

Se ha realizado electroforesis en soportes de almidón para los sistemas enzimáticos reflejados en la Tabla 1.

TABLA 1

**Isoenzimas en *M. sativa*. Control genético.***Isozymes in M. sativa. Genetic control.*

Enzima	Abreviatura	Número E.C.	Loci	Estructura cuaternaria
Aconitasa	ACO	4.2.1.3	Aco-1	monomérico
Alcohol deshidrogenasa	ADH	1.1.1.1	Adh-1	dimérico
Esterasas	EST	3.1.1	$\alpha$ -est $\beta$ -est	
Fosfatasas ácidas	ACP	3.1.3.2	Acp-1 Acp-2	
6-Fosgluconato deshidrogenasa	6-PGD	1.1.1.44	6-Pgd-1 6-Pgd-2	dimérica
Fosfoglucoisomerasa	PGI	5.3.1.9	Pgi-1 Pgi-2	dimérica
Fofoglucomutasa	PGM	2.7.5.1	Pgm-1 Pgm-2	monomérica
Isocitrato deshidrogenasa	IDH	1.1.1.41	Idh-1	dimérica
Leucín aminopeptidasa	LAP	3.4.11.1	Lap-1 Lap-2	monomérica
Malato deshidrogenasa	MDH	1.1.1.37	Mdh-1	dimérica
Peroxidasas catódicas	CPX	3.1.1	Cpx-1 Cpx-2 Cpx-3 Cpx-4 Cpx-5	monomérica dimérica
Superóxido dismutasa	SOD	1.15.1.1	Sod-1 Sod-2	dimérica

El tipo de geles utilizado en la electroforesis ha sido en todos los casos de almidón al 11%. Los tampones utilizados en el gel y en los electrodos para la identificación de las isoenzimas se describen en la Tabla 2.

TABLA 2

**Tipo de tampones utilizados.***Kind of buffers used.*

Sistema enzimático	Tampón l de ge	Tampón del electrodo	Voltaje-tiempo
ADH, EST,ACPLAP, MDH, CPX	Tris-citrato pH=7,8 (Quirós, 1981)	Bórico-Sosa pH=7,8: ácido bórico 0,3M ajustado con NaOH 1M	300V - 4 horas
ACO, 6-PGD, PGI, PGM, IDH	Histidina pH=7 L-Histidina-ClH monohidrato 5mm aj. con NaOH 1M	Tris-citrato pH=7 Tris 0,13M ajustado con ácido cítrico 0,5M	175V - 4 horas
SOD	Litio-borato pH=8,3 (Soltis y Soltis, 1990)	Tris-citrato pH=8,3 (Soltis y Soltis, 1990)	175V - 4 horas

**Tinción****Alcohol deshidrogenasa (ADH)**

Se disolvieron 40 mg de B-NAD, 40 mg de MTT y 10 mg de PMS en 100 ml de tampón Tris - HCl 0,1 M, pH = 7,5. Se añadieron 10 ml de etanol 95 % y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad. Las bandas comenzaron a aparecer a los 15 minutos.

**Esterasas (EST)**

Según el método de Pasteur *et al.* (1987), se preparó un tampón Fosfato Na/Na<sub>2</sub>, 0,1 M, pH = 6,5 con 9,98 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5,11 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro, completando con agua hasta 1000 ml. Se tomaron 100 ml de esta solución tampón y se añadieron 2 ml de α-naftil propionato al 1% en acetona, 2 ml de β-naftil propionato al 1% en acetona y 40 mg de Fast Blue RR. Se incubó a temperatura ambiente.

**Fosfatasa ácida (ACP)**

Según el método de Soltis y Soltis (1990), se prepararon 100 ml de tampón acetato de sodio 50 mM, pH = 5, y se añadieron 100 mg de α-naftil fosfato sódico,

100mg de  $MgCl_2$  disueltos en 2 ml de agua y 100 mg de Fast Garnet GBC salt disueltos en 2 ml de agua. Se incubó en la oscuridad.

### **Leucin aminopeptidasa (LAP)**

Según el método de Quirós (1981). Se disuelven 40 mg de L-leucil- $\beta$ -naftil amida en 1 ml de metanol absoluto. Se añadieron 100 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH = 6, y finalmente se incorporaron 50 mg de Fast Black K salt, agitándose al menos 5 minutos antes de verter sobre el gel.

### **Malato deshidrogenasa (MDH)**

Según el método de Vallejos (1983), se prepararon 100 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH = 7,5, y se añadieron 3 ml de DL- Malato 1 M, pH = 7,5, 30 mg de NAD, 20 mg de MTT y 4 mg de PMS. Se incubaron en la oscuridad a 30° C.

### **Peroxidasas catódicas (CPX)**

Según el modelo de Quirós (1981), se disolvieron 50 mg de 3 - amino - 9 - etil carbazol en 5 ml de N,N'- dimetil formamida. Se añadieron 100 ml de tampón acetato sódico 0,2 M, pH = 5 y 0,5 ml de peróxido de hidrógeno al 3%. Aparecieron bandas catodales y anodales. Hemos considerado las catodales porque aparecieron con mayor nitidez.

### **Aconitasa (ACO)**

Siguiendo la comunicación personal del Dr. M. C. Benito se prepararon 20 ml de tampón Tris Hcl 1M, pH=8 al que se añadieron 2 ml de  $MgCl_2$  al 10%, 70 ml de agua destilada, 8 ml de Cis-aconítico al 1% y 6 mg de isocitrato deshidrogenasa disueltos en 2 ml de agua destilada. Finalmente se incorporaron a la solución anterior 30 mg de NADP, 20 mg de MTT y 3 mg de PMS. Se dejó incubar en la oscuridad y a temperatura ambiente.

### **6 - Fosfoglucosa deshidrogenasa (6-PGD)**

Según la comunicación personal del Dr. M.C. Benito se prepararon 25 ml de una solución tampón Tris-Hcl 1M, pH=8, se añadieron 70 ml de agua destilada y 2 ml de

MgCl<sub>2</sub> al 10%. A esta solución se incorporaron 15 mg de NADP, 20 mg de NBT, 30 mg de ácido 6 - fosfogluconico y 3 mg de PMS. Se dejó incubar a temperatura ambiente y en la oscuridad.

#### **Fosfoglucoasa isomerasa (PGI)**

Se prepararon 12 ml de solución tampón Tris-HCl 1M a pH=8. Se añadieron 2 ml de MgCl<sub>2</sub> al 10%, 2 ml de fructosa 6-P-Na<sub>2</sub> 0,036 M, 1ml de glucosa 1-6-difosfato al 0,5%, 40 unidades de glucosa 6-P deshidrogenasa disueltas en 4 ml de agua destilada y 75 ml de agua destilada. A esta solución se le añadieron 15 mg de NADP, 20 mg de MTT y 5 mg de PMS. Se dejó incubar en la oscuridad y a 37°C durante 1/2 hora.

#### **Fosfoglucoasa mutasa (PGM)**

Se prepararon 12 ml de solución tampón Tris-HCl 1M a pH=8. Se añadieron 2 ml de MgCl<sub>2</sub> al 10%, 5 ml de glucosa 1-P Na<sub>2</sub> al 1%, 1 ml de glucosa 1-6-difosfato al 0,05%, 40 unidades de glucosa 6-P deshidrogenasa disueltas en 4 ml de agua destilada y 75 ml de agua destilada. A esta solución se le añadieron 15 mg de NADP, 20 mg de MTT y 5 mg de PMS. Se dejó incubar en la oscuridad y a 37°C durante 1/2 hora.

#### **Isocitrato deshidrogenasa (IDH)**

A 75ml de agua destilada se añadieron 12ml de Tris-HCl 0,1M a pH=8 y 2 ml de MgCl<sub>2</sub>. Como reactivos se utilizaron 100mg de ácido isocítrico, 15mg de NADP, 20mg de MTT y 5mg de PMS. Se incubó en la oscuridad y a 37°C durante 1/2 hora.

#### **Superoxido dismutasa (SOD)**

A 75 ml de Tris-HCl 0,005 M a pH=8,2 se añadieron 5 mg de Riboflavina, 7,5 mg de EDTA y 15 mg de NBT. Se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente en exposición a la luz.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Para comprobar si existían diferencias significativas en las frecuencias alélicas de las distintas muestras se realizó mediante el programa Statgrafic-Plus un test Chi-2 aplicando la corrección de Yates en los casos en los que fue necesaria. Los resultados aparecen en 4 tablas de contingencia para los *loci* Pgi-1, Pgm-1, Pgm-2 e Idh-1 ya que son los únicos en los que el polimorfismo pudo ser analizado con claridad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Enzimas monomórficos codificados por un solo *locus*

Para ADH (dímero), MDH (dímero) y ACO (monómero), en todas las plantas de las distintas muestras apareció un sólo punto, el enzima mostró una única forma y fue común en todas las muestras analizadas. Se deduce que podría existir un sólo *locus* en *M. sativa* que codificase para cada una de estas enzimas.

### Enzimas monomórficos codificados por dos *loci*

En el caso de 6 - PGD (dímero) , SOD (dímero) y LAP (monómero) todas las plantas de todas las muestras mostraron 2 bandas, puesto que los dos primeros enzimas son dímeros, cada forma encontrada podría corresponder a un *locus*. En LAP podría encontrarse también con el caso de dos *loci* anodales Lap-1 y Lap-2 ya señalados por otros autores anteriormente (Quirós, 1983). Así pues, en *M. sativa* existen 2 *loci* que codifican para 6-PGD, SOD, y LAP.

### Enzimas en las que aparecen polimorfismos variables en distintas plantas

Los enzimas CPX (Peroxidasas catódicas), ACP, EST, IDH, PGM y PGI mostraron buena definición y gran variabilidad.

#### CPX

En las peroxidasas estudiadas en numerosas especies se han encontrado siempre, tanto monómeros como dímeros en múltiples *loci*. (Pasteur *et al.*, 1987). En nuestro caso se han observado cinco zonas de actividad que podrían corresponder a 5 *loci* diferentes que hemos denominado 1,2,3,4 y 5. En la zona 1 pueden aparecer de una o tres bandas. Podría ser un *locus* que codifica para un enzima dímero. Las zonas 2,3,4 y 5 constan de una o dos bandas por lo que podría tratarse de 4 *loci* que codifican para monómeros.

#### ACP

Se han encontrado dos zonas de actividad que pueden presentar de una a tres bandas cada una de ellas. Podría tratarse de dos *loci* diferentes, uno de migración más rápida y otro más lenta, Quirós (1983), señala la existencia de hasta 11 bandas distintas en



la zona de migración más lenta. En nuestros geles no se llegó a determinar todas estas bandas probablemente por la falta de nitidez lograda en esta zona.

## EST

Se revelaron conjuntamente las  $\alpha$ -esterasas (bandas de color negro) y las  $\beta$ -esterasas (bandas de color rojo).

Estudiando separadamente cada una de ellas, se apreciaron en las  $\alpha$ -esterasas hasta 3 bandas. En las  $\beta$ -esterasas se distinguieron hasta cuatro bandas.

Quirós (1983), estudiando  $\alpha$  y  $\beta$ -esterasas en conjunto, encontró hasta 7 bandas distintas en hoja de alfalfa, lo cual parece estar de acuerdo con nuestros resultados.

## IDH

Es un enzima dímero situado en el citosol. Sólo se conoce un gen que codifique para él. En nuestros zimogramas hemos encontrado 3 alelos distintos.

## PGM

El enzima es un monómero. En un diploide, las plantas homocigóticas para un alelo presentan una sólo banda y las heterocigóticas dos. En una especie tetraploide pueden aparecer hasta 4 bandas por *locus*. Hemos encontrado zimogramas correspondientes a la expresión de dos loci cada uno de ellos con tres alelos.

## PGI

Se han descrito dos genes que codifican para este enzima, Pgm-1 localizado en los cloroplastos y Pgm-2 localizado en el citosol. Para Pgi-1 aparece un sólo alelo común en todas las muestras. Para Pgi-2 han aparecido zimogramas que corresponden a la expresión de 5 alelos distintos.

En la Tabla 3 presentamos un resumen de todos los *loci* analizados con sus correspondientes frecuencias. (En el caso de los *loci* que codifican para esterasas, ácido fosfatasas y peroxidases catódicas no se han podido analizar las frecuencias alélicas debido a la excesiva complejidad que presentan sus zimogramas.

TABLA 3

**Alelos encontrados y sus frecuencias medias en distintas muestras de *M. sativa*.***Alleles and their mean frequencies found in different samples of M. sativa.*

Locus	Alelo	Frecuencia	Intervalo	Población
Aco-1	a	1		12
Adh-1	a	1		12
Mdh-1	a	1		12
ó-Pgd-1	a	1		12
ó-Pgd-2	a	1		12
Lap-1	a	1		12
Lap-2	a	1		12
Sod-1	a	1		12
Sod-2	a	1		12
Cpx-1	a,b	sin determinar		12
Cpx-2	a,b	sin determinar		12
Cpx-3	a,b	sin determinar		12
Cpx-4	a,b	sin determinar		12
Cpx-5	a,b	sin determinar		12
Acp-1	sin			12
Acp-2	Sin			12
a-esterasas	a,b,c	sin determinar		12
A-esterasas	a,b,c	sin determinar		12
Idh-1	a	0,038	0,000-0,100	12
	b	0,907	0,823-0,971	12
	c	0,055	0,006-0,146	12
Pgm-1	a'	0,001	0,000-0,001	12
	a	0,887	0,800-0,970	12
	b	0,112	0,030-0,200	12
Pgm-2	a	0,149	0,031-0,225	12
	b	0,413	0,094-0,825	12
	c	0,438	0,131-0,544	12
Pgi-1	a	1		12
Pgi-2	a'	0,009	0,00-0,13	12
	a	0,304	0,19-0,39	12
	b	0,341	0,23-0,40	12
	c	0,083	0,06-0,11	12
	d	0,264	0,13-0,27	12

Con los datos que se han podido obtener hemos calculado las siguientes medidas de la variabilidad genética:

- A: N° medio de alelos por locus: 2,05
- P: Porcentaje de loci polimórficos: 56,5%
- H: Heterocigosidad esperada:  $\Sigma H_k / n^\circ$  de loci= 18,64%
- H<sub>k</sub>: Heterocigosidad esperada para cada locus:  $1 - \Sigma p_i^2$ :  
siendo  $p_i$ = frecuencia del alelo i.

En estudios realizados por Bregu (1995) con poblaciones espontáneas de la especie alógama *Lolium multiflorum*, se han obtenido valores de A:3,3; P:99%; H: 52,6%. Estas cifras son considerablemente más altas que las obtenidas en las variedades cultivadas de alfalfa analizadas, las cuales han sufrido en proceso de selección y mejora en el que puede haberse reducido la variabilidad genética.

Para analizar si existen diferencias significativas entre las distintas muestras se realizó el análisis estadístico a través del test Chi-2 utilizando las frecuencias los alelos encontrados en los loci: Pgi-2, Pgm-1, Pgm-2 e Idh-1 para las distintas muestras de alfalfa. (Las 6 muestras del ecotipo Tierra de Campos se han tomado en conjunto).

**Análisis para Pgi-2.**

En la Tabla 5 se reflejan los valores de  $\chi^2$  entre las distintas muestras de alfalfa obtenidos con los datos de las frecuencias alélicas mostradas en la Tabla 4.

TABLA 4

**Frecuencias relativas de los alelos de Pgi-2 encontradas en distintas alfalfas tetraploides.**

*Relative frequencies of Pgi-2 alleles found in different tetraploid alfalfas.*

		a'	a	b	c	d
T. C.global	(424pl)	1,3	30,4	34,9	7,4	26,1
Aragón	(48pl)	0,5	19,8	40,6	11,4	27,6
Europe	(90 pl)	0,6	28,3	32,8	10,6	27,8
Milfeuil	(39pl)	0	39,7	23,1	11,5	25,6
Ranger	(41pl)	1,2	26,8	35,4	6,1	31,7
Vertus	(42pl)	0	38,1	33,3	7,1	21,4
Victoria	(42pl)	0	34,5	31	9,5	23,8

TABLA 5

**Valores de  $\chi^2$  en la relación entre variedades de alfalfa para las frecuencias alélicas del locus Pgi-2.**

*$\chi^2$  values in the relation between alfalfa varieties for the allelic frequencies of Pgi-2 locus.*

	T.de C.	Victoria	Vertus	Ranger	Milfeuill	Europe	Aragon
T. de C.	-						
Victoria	0,76	-					
Vertus	1,78	0,91	-				
Ranger	1,02	2,94	4,18	-			
Milfeuill	4,34	1,78	3,67	6,94	-		
Europe	0,40	1,2	3,4	1,23	4,02	-	
Aragon	2,75	5,84	8,34	3,71	11,84	2,2	-

Sólo aparecen diferencias entre Milfeuill con Ranger con un nivel de significación del 95%, entre Aragón con Vertus a nivel del 95% y Aragón con Milfeuill a nivel del 99%.

**Análisis para Pgm-1.**

En la Tabla 6 se reflejan los valores de  $\chi^2$  entre las distintas muestras de alfalfa obtenidos con los datos de las frecuencias alélicas mostradas en la Tabla 7.

TABLA 6

**Frecuencias relativas de los alelos de Pgm-1 en las distintas alfalfas tetraploides.**

*Relative frequencies of Pgm-1 alleles found in different tetraploid alfalfas.*

		A'	a	b
T.C.global	(136pl)	0,011	0,877	0,112
Aragón	(40 pl)	0	0,840	0,160
Europe	(40 pl)	0	0,890	0,110
Milfeuill	(44 pl)	0	0,970	0,030
Ranger	(40 pl)	0	0,920	0,080
Vertus	(40 pl)	0	0,910	0,090
Victoria	(40 pl)	0	0,800	0,200

TABLA 7

**Valores de  $\chi^2$  en la relación entre variedades de alfalfa para las frecuencias alélicas del locus Pgm-1.**

*$\chi^2$  values in the relation between alfalfa varieties for the allelic frequencies of Pgm-1 locus.*

	T.de C.	Victoria	Vertus	Ranger	Milfeuil	Europe	Aragon
T. de C.	-						
Victoria	2,44	-					
Vertus	0,06	4,03	-				
Ranger	0,23	5,02	0	-			
Milfeuil	3,76	12,85	2,22	1,54	-		
Europe	0	2,44	0,06	0,23	3,76	-	
Aragón	0,69	0,30	1,65	2,32	8,37	0,69	-

Aparecen diferencias con un nivel de significación del 99% para Milfeuil con Victoria y con Aragón, a nivel de significación del 95% para Victoria con Vertus y con Ranger, y del 90% para Milfeuil con T. de Campos y con Europe.

**Análisis para Pgm-2.**

En la Tabla 9 se reflejan los valores de  $\chi^2$  entre las distintas muestras de alfalfa obtenidos con los datos de las frecuencias alélicas mostradas en la Tabla 8.

TABLA 8.

**Frecuencias relativas de los alelos de Pgm-2 en las distintas alfalfas tetraploides.**

*Relative frequencies of Pgm-2 alleles found in different tetraploid alfalfas.*

		A	b	c
T.C.0obal	(134pl)	0,310	0,300	0,390
Aragón	(40 pi)	0,075	0,380	0,544
Europe	(40 pl)	0,043	0,825	0,131
Milfeuil	(40pl)	0,225	0,300	0,475
Ranger	(40pl)	0,031	0,556	0,412
Vertus	(40pl)	0,225	0,094	0,681
Victoria	(40 pl)	0,131	0,431	0,437

TABLA 9

**Valores de  $\chi^2$  en la relación entre variedades de alfalfa para las frecuencias alélicas del locus Pgm-2.**

*$\chi^2$  values in the relation between alfalfa varieties for the allelic frequencies of Pgm-2 locus.*

	T.de C.	Victoria	Vertus	Ranger	Milfeuil	Europe	Aragón
T. de C.	-						
Victoria	7,49	-					
Vertus	27,46	30,5	-				
Ranger	25,81	8,06	56,06	-			
Milfeuil	2,99	5,26	14,75	23,79	-		
Europe	49,4	34,32	110,24	18,49	58,31	-	
Aragón	15,64	2,52	26,76	7,5	8,55	43,16	-

Pgm-2 permite distinguir todas las muestras analizadas excepto T. de Campos con Milfeuil y Victoria con Aragón. Con un nivel de significación del 90% aparecen diferencias entre Victoria y Ranger. A nivel del 95% entre Victoria con T. de Campos y con Ranger, y entre Aragón con Milfeuil y con Europe. En los demás cruces las diferencias son a nivel del 99%.

**Análisis para Idh-1.**

En la Tabla 11 se reflejan los valores de  $\chi^2$  entre las distintas muestras de alfalfa obtenidos con los datos de las frecuencias alélicas mostradas en la Tabla 10.

TABLA 10

**Frecuencias relativas de los alelos de Idh-1 en las distintas alfalfas tetraploides.**

*Relative frequencies of Idh-1 alleles found in different tetraploid alfalfas.*

		a	B	c
T. C.global	(212pl)	0,0306	0,8232	0,1462
Aragón	(40pl)	0,0250	0,9313	0,0437
Europe	(40 pl)	0,0187	0,8875	0,0937
Milfeuil	(44 pl)	0,0170	0,9716	0,0113
Ranger	(40pl)	0,0750	0,9187	0,0062
Vertus	(40pl)	0,1000	0,8687	0,0312
Victoria	(40 pl)	0,0000	0,9500	0,0500

TABLA 11

**Valores de  $\chi^2$  en la relación entre variedades de alfalfa para las frecuencias alélicas del locus Idh-1.**

*$\chi^2$  values in the relation between alfalfa varieties for the allelic frequencies of Idh-1 locus.*

	T.de C.	Victoria	Vertus	Ranger	Milfeuil	Europe	Aragón
T. de C.	-						
Victoria	7,07	-					
Vertus	0,61	2,99	-				
Ranger	3,58	0,33	0,85	-			
Milfeuil	10,43	0,13	5,50	1,54	-		
Europe	1,45	1,70	0,05	0,23	3,76	-	
Aragón	4,57	0,09	1,39	0,00	0,95	0,55	-

Idh-1 ha permitido diferenciar a nivel del 99% T. de Campos de Victoria y de Milfeuil, a nivel del 95% T. de Campos de Aragón y de Ranger; también a este nivel se pueden distinguir Milfeuil y Vertus. Entre Europe con Milfeuil y Vertus con Victoria aparecen diferencias con un nivel de significación del 90%.

## CONCLUSIONES

Aunque las características de alogamia y poliploidia de *M. sativa* pueden originar mucha diversidad, la mayor parte de los sistemas enzimáticos analizados resultaron monomórficos y no sirven para discriminar unas variedades con respecto a otras. Todas las variedades estudiadas fueron monomorfas respecto a los enzimas ADH, MDH y ACO. En cuanto a 6 PGD, SOD y LAP estarían codificados por dos *loci*, también muy fijados en todas las variedades ya que su expresión es igual en todas ellas. Para las formas variables de unas plantas a otras, el estudio centrado en PGI, PGM e IDH nos demostró que en todas las variedades analizadas existen los mismos tipos aloenzimáticos. El análisis de las frecuencias alélicas ha permitido diferenciar casi todas las variedades utilizando en conjunto los *loci*: Pgi-2, Pgm-1, Pgm-2 e Idh-1. No hemos podido distinguir Aragón de Victoria, lo cual es lógico, puesto que es una variedad sintética obtenida de alfalfa tipo Aragón.

En *M. sativa*, resultados obtenidos por autores de este trabajo (Cordero y Crespo, 1995), mostraron que los caracteres morfológicos y agronómicos no permiten una dife-

renciación de las variedades. Al no poder conseguir la distinción de todas las muestras ensayadas y debido a la complejidad de este sistema, consideramos que podría ser interesante, con el fin de poder diferenciar futuras variedades de alfalfa, realizar una selección de los individuos homocigotos para los alelos de los *loci* polimórficos, lo cual permitiría la creación de variedades con un buen valor agronómico y diferenciables isoenzimáticamente.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda prestada por los doctores C. Mario Benito de la Universidad Complutense de Madrid y Pére Arus del IRTA de Cabrils (Barcelona), por su colaboración al iniciarnos en el conocimiento de la técnica de isoenzimas y su interpretación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BREGU, R., 1995. *Evaluación de la variabilidad morfológica, agronómica e isoenzimática en poblaciones del país de raigras italiano (Lolium multiflorum Lam.)*. Tesis Master of Science. C.I.H.E.A.M. Zaragoza (España).
- CAREPETIAN, J.; ESTILAI, A.; HASHEMI, A., 1994. Variation and Inheritance of Isozymes in Safflower. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **119**(3), 624-628.
- CORDERO, S.A.; CRESPO, M.C., 1995. Caracterización del ecotipo de alfalfa Tierra de Campos. *Pastos*, **XXV**, 57-86.
- GRENECHE, M.; LALLEMAND, J.; MICHAUD, O., 1991. Comparison of different enzyme *loci* as a means of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. *Seed Sci. Technology*, **19**, 147-158.
- HAYWARD, M.D.; McADAM, N.J., 1977. Isozyme polymorphism as a measure of the distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. *Z. Pflanzenzücht*, **79**, 59-78.
- LOOS, B.P., 1993. Allozyme variation within and between populations in *Lolium*. *Pl. Syst. Evol.*, **188**, 101-113.
- NIELSEN, G., 1980. Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium spp.*) 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 genotype for hordein and 39 isoenzyme *loci* of 47 reference varieties. *Euphytica*, **35**, 717-728.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J., 1987. *Manuel Technique de Génétique par Électrophorèse des Protéines*. Technique et Documentation. Lavoisier. 117 pp. Paris (Francia).
- QUIROS, C.F., 1980. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. *Crop Science*, **20**, 262-264.
- QUIROS, C.F., 1981. Starch gel electrophoresis technique used with alfalfa and other Medicago species. *Can. J. Plant. Sci.*, **61**, 745-749.



- QUIROS, C.F., 1983. Perennials. Alfalfa and its closely related species. En: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part B, 253-294. Eds. S.D.TANKSLEY, T.J. ORTON. Elsevier. Amsterdam (Holanda).
- QUIROS, C.F.; KERBI K., 1982. Determination by allozymes of natural cross-pollination and hibridization in alfalfa. *Z. Pflanzenzüchtg*, **89**, 177-186.
- SOLTIS, D.G.; SOLTIS P.S., 1990. *Isozymes in Plant Biology*. 267 pp. Chapman add Hall. Londres (Inglaterra).
- SMITH, J.S.C.; WYCH, R.D., 1986. The identification of female selfs in hybrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. *Seed Science and Technology*. **14**, 1-8.
- VALLEJOS, C.E., 1983. Enzyme activity staining. En: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part A, 469-616. Eds. S.D. TANKSLEY, T.J.ORTON. Elsevier. Amsterdam (Holanda).

## ISOENZYMATIC STUDY ON DIFFERENT SAMPLES OF TETRAPLOID *M.SATIVA*

### SUMMARY

The analysis of several enzymatic systems on 12 samples of *M. sativa* by the starch gel electrophoresis technique has been carried out as a means of distinguishing varieties.

In spite of the high level of variability that could be expected in a tetraploid and outcrossing species, no polymorphic zymograms have been found in some enzymatic systems. For the polymorphic systems which offered the clearest interpretation, the study and comparison of the allelic frequencies seems to be useful as a criterion of identification of some varieties analysed. Because some of them can not be distinguished, it could be worthwhile to convert the segregating *loci* into fixed *loci* in a breeding process of new varieties.

**Key words:** Electrophoresis, zimogram, polimorphism.