

## Diversidad isoenzimática en accesiones de *Medicago polymorpha* colectadas a lo largo del gradiente climático en Chile, y su relación con otras especies de *Medicago*

Isozymatic diversity in accessions of *Medicago polymorpha* collected along an environmental gradient in Chile, and its relationship with other species of *Medicago*

MARIO PAREDES<sup>1</sup>, VIVIANA BECERRA<sup>1</sup>, PILAR CORREA<sup>1</sup> & ALEJANDRO DEL POZO<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>CRI Quilimapu, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 426, Chillán, Chile

<sup>2</sup>Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Casilla 537, Chillán, Chile

e-mail : adelpozo@udec.cl, <sup>3</sup> a quien dirigir la correspondencia

### RESUMEN

*Medicago polymorpha* es una especie naturalizada en Chile que presenta una gran variabilidad en características agronómicas, tales como precocidad, producción de semilla, y producción de materia seca, asociada de un gradiente climático. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la diversidad isoenzimática en accesiones de *M. polymorpha* y su relación con la variabilidad fenotípica, y establecer posibles relaciones genéticas con otras especies de *Medicago*. Para esto se analizaron 12 sistemas isoenzimáticos en 41 accesiones de *M. polymorpha*, provenientes de un amplio rango de condiciones edafoclimáticas, y de 16 accesiones de *M. arabica*, *M. rotata*, *M. rigidula*, *M. tornata*, *M. littoralis* y *M. truncatula*. Los resultados indicaron una escasa diversidad isoenzimática dentro de *M. polymorpha*, y una falta de correspondencia con la variabilidad fenotípica y distribución geográfica de las accesiones. El análisis multivariado permitió agrupar las especies en forma separada. *M. arabica*, que también está naturalizada en Chile, fue la especie más cercana a *M. polymorpha*, en cambio, *M. littoralis*, *M. rigidula* y *M. rotata* fueron las especies que presentaron una mayor distancia genética con *M. polymorpha*.

**Palabras clave:** diversidad genética, *Medicago polymorpha*, medicagos anuales, análisis multivariado.

### ABSTRACT

*Medicago polymorpha* is a naturalized species in Chile which presents great variability in agronomic traits such as flowering and reproductive phenology, seed production, seed hardness, and dry matter production, associated to a climatic gradient. The objectives of this work were to assess the isozymatic diversity in accessions of *M. polymorpha* and its relation with the phenotypic variability, and to establish possible genetic links with other species of *Medicago*. Forty one accessions of *M. polymorpha* obtained from a wide range of climatic and edaphic conditions, and 16 accessions of *M. arabica*, *M. rotata*, *M. rigidula*, *M. tornata*, *M. littoralis* and *M. truncatula*, were evaluated for 12 isozyme systems. The results showed a low isozymatic diversity within accessions of *M. polymorpha*, and a lack of association between geographical distribution and isozyme diversity. Multivariate analysis allowed to cluster the species separately. *M. arabica*, another naturalized species in Chile, was the closest species to *M. polymorpha*, whereas *M. littoralis*, *M. rigidula* and *M. rotata* presented a higher genetic distance from *M. polymorpha*.

**Key words :** genetic diversity, *Medicago polymorpha*, annual medics, multivariate analysis.

### INTRODUCCION

Los medicagos anuales (*Medicago* spp) fueron introducidos a Chile en forma accidental (Del Pozo et al. 1989). Actualmente, se conocen seis especies naturalizadas en la zona mediterránea: *Medicago polymorpha* L., *Medicago arabica* (L.) Huds., *Medicago mínima* (L.) Bart., *Medicago*

*orbicularis* (L.) Bart., *Medicago turbinata* (L.) All. y *Medicago lupulina* L., siendo las dos primeras las más abundantes (Marticorena & Quezada 1985, Del Pozo et al. 1989). En el país, se han descrito al menos cinco variedades de *M. polymorpha*: *M. polymorpha* var. hispida Gaerth, *M. polymorpha* var. denticulata (Willd.) Urb., *M. polymorpha* var. confinis (Koch) Aschet et

Graebn. y *M. polymorpha* var. *inermis* Urb. (Navas 1976).

*Medicago polymorpha* constituye un importante germoplasma, puesto que es una leguminosa forrajera que se utiliza en rotaciones con cereales en diversas zonas mediterráneas (Puckridge & French 1983), particularmente en Australia (Ewing & Howienson 1989), y más recientemente en Chile (Del Pozo et al. 1999). Presenta una amplia distribución dentro de la zona mediterránea de Chile, extendiéndose desde la zona árida hasta la zona perhúmeda (Del Pozo et al. 1989, Ovalle et al. 1997).

Estudios de caracterización efectuadas en diversas accesiones de *M. polymorpha*, colectadas entre La Serena (29°54' S) y Temuco (38° S), han determinado que existe diferenciación fenotípica en características agronómicas tales como precocidad, producción de semilla, porcentaje de semillas duras y producción de materia seca (Ovalle et al. 1997, Ovalle et al. 1998). Las poblaciones recolectadas en el norte de Chile son más precoces que las del sur (Del Pozo et al. 1995, Ovalle et al. 1997). El proceso de naturalización de *M. polymorpha*, estimado en aproximadamente 450 años, ha generado una diferenciación ecotípica en la fenología y en otras características. Sin embargo, se desconoce cómo es la diversidad genética en accesiones chilenas de *M. polymorpha*.

A través de marcadores bioquímicos (isoenzimas), Bullita et al. (1994) encontraron una baja variabilidad genética en accesiones de *M. polymorpha*, colectadas en un amplio rango de climas y condiciones edáficas en Cerdeña. En este estudio, los sistemas isoenzimáticos que presentaron variación alélica fueron Malato dehidrogenasa (MDH), Aspartato amino transferasa (AAT), Esterasa (EST), Acido fosfatasa (ACPH), Leucina amino peptidasa (LAP) y Fosfo glucosa isomerasa (GPI). También, Fyad-Lamache et al. (1996), al analizar 11 sistemas enzimáticos en poblaciones pertenecientes a 8 especies de *Medicago*, detectaron un bajo nivel de polimorfismo, aunque si encontraron variación interespecífica en la enzima Leucina aminopeptidasa (LAP). Abdelkefi et al. (1996) encontraron un grado variable de polimorfismo en 7 sistemas enzimáticos, que les permitió separar poblaciones de *M. polymorpha*. Al parecer, el nivel de polimorfismo posible de detectar depende de los sistemas enzimáticos y de las poblaciones que se utilicen.

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la diversidad genética del germoplasma de *M. polymorpha* naturalizado en Chile, mediante el uso de 12 marcadores bioquímicos, y establecer posibles relaciones genéticas con otras espe-

cies de *Medicago*. En este estudio se postula que existe variabilidad isoenzimática entre accesiones de *M. polymorpha*, y que esta variación se relaciona con características fenotípicas y/o distribución geográfica de las accesiones.

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

Se utilizaron 41 accesiones de *M. polymorpha*, 7 de *M. arabica* y 9 accesiones y cultivares pertenecientes a otras especies de *Medicago* (Tabla 1). Las accesiones de *M. polymorpha* y de *M. arabica*, fueron obtenidas de colectas efectuadas entre los años 1988 y 1994, y provienen de una amplia distribución geográfica con variadas condiciones de clima y suelo (Tabla 1). Actualmente, estas accesiones se encuentran en el Banco de Germoplasma del Centro Regional de Investigación (CRI) Quilamapu del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). *M. rotata*, *M. rigidula*, *M. littoralis*, *M. tornata*, *M. truncatula* y 3 cultivares de *M. polymorpha* fueron introducidas desde Australia, Francia y Siria (Tabla 1).

### Estudio isoenzimático

Las accesiones utilizadas en el estudio fueron sembradas bajo condiciones de invernadero. Para el estudio isoenzimático se analizaron 5 individuos por accesión, cosechándose de ellas hojas jóvenes y sanas. Los 12 sistemas evaluados fueron los siguientes: Fosfo-glucosa isomerasa (GPI; EC.5.3.1.9), Leucina aminopeptidasa (LAP; EC.4.11.1), Peroxidasa (PXR; EC.1.11.1.7), Enzima málica (ME; EC.1.1.1.40), Fosfoglucomutasa (PGM; EC.2.7.5.1), Esterasa (EST; EC.3.1.1.1) y Aspartato amino transferasa (AAT; EC.2.6.1.1), todos bajo condiciones de buffer Tris citrato- Litio borato, pH 8,1. Además, se evaluaron los sistemas Shikimato dehidrogenasa (SKDH; EC.1.1.1.25), Malato deshidrogenasa (MDH; EC.1.1.1.37), 6-Fosfo-glucodehidrogenasa (6PGD; EC.1.1.1.44), Diaforasa (DIAP; EC.1.6.4.3) y Fosfatasa ácida (ACP; EC.3.1.3.2) bajo condiciones de Histidina, pH 6,5 (Quiroz 1981, Bullita et al. 1994).

La proteína cruda se obtuvo mediante la maceración de las hojas con Glutacion reducido y a 4°C. La separación de las proteínas se realizó en un gel de almidón horizontal (10%), al cual se le realizó un corte a 40 mm, desde el borde (origen de migración de las proteínas). En este corte se colocaron filtros embebidos con el extracto de

TABLA 1

Accesiones y cultivares de *Medicago* spp. naturalizadas e introducidas en ChileAccessions and cultivars of *Medicago* spp. naturalized and introduced in Chile

Accesión o cultivar	País/Localidad	Zona Climática	Latitud	Longitud
<i>M. polymorpha</i>	Chile			
MPO-10-88	Vicuña	Arida	30°07'	70°41'
MPO-11-88	El Tangué	Arida	30°17'	71°27'
MPO-8-88	Chañaral Alto	Arida	30°58'	71°01'
MPO-7-88	Combarbalá	Arida	31°09'	71°00'
MPO-13-1-88 *	Totoral	Arida	31°13'	71°36'
MPO-13-88 *	Totoral	Arida	31°13'	71°36'
MPO-13-88	Totoral	Arida	31°13'	71°36'
MPO-5-88	Illapel	Arida	31°40'	71°16'
MPO-44-88	Los Vilos	Semiárida	31°53'	71°28'
MPO-15-88	Zapallar	Semiárida	32°32'	71°26'
MPO-16-88 *	Maitencillo	Semiárida	32°40'	71°26'
MPO-16-88	Maitencillo	Semiárida	32°40'	71°26'
MPO-2-88	Palmas Ocoa	Semiárida	32°52'	71°07'
MPO-1-88	Batuco	Semiárida	33°11'	70°46'
MPO-18-88	Los Maitenes	Semiárida	33°20'	71°19'
MPO-19-88	Rapel	Subhúmeda	33°57'	71°32'
MPO-20-88	Hidango	Subhúmeda	34°10'	71°56'
MPO-21-88	Calleuque	Subhúmeda	34°26'	71°27'
MPO-25-88	Curicó	Subhúmeda	34°58'	71°41'
MPO-26-88	Licantén	Subhúmeda	35°01'	72°01'
MPO-26-1-88 *	Licantén	Subhúmeda	35°01'	72°01'
MPO-27-1-88 *	Quivilgo	Subhúmeda	35°19'	72°20'
MPO-27-88	Quivilgo	Subhúmeda	35°19'	72°20'
MPO-28-88 *	Faro Carranza	Subhúmeda	35°35'	72°31'
MPO-29-88 *	Chanco	Subhúmeda	35°41'	72°29'
MPO-41-88	Rucapequen	Subhúmeda	36°42'	72°13'
MPO-31-88	Cauquenes	Subhúmeda	35°50'	72°19'
MPO-30-88	Cauquenes	Subhúmeda	35°52'	72°11'
MPO-30-1-88 *	Cauquenes	Subhúmeda	35°52'	72°11'
MPO-43-88	Cauquenes	Subhúmeda	35°58'	72°19'
MPO-42-88	Sauzal	Subhúmeda	35°58'	72°19'
MPO-32-88 *	Coronel	Húmeda	37°03'	73°09'
MPO-33-88 *	Cañete	Húmeda	37°48'	73°23'
MPO-34-88	Los Sauces	Húmeda	37°58'	72°44'
MPO-34-1-88 *	Los Sauces	Húmeda	37°58'	72°44'
MPO-36-88 *	Traiguén	Perhúmeda	38°14'	72°23'
MPO-40-88 *	Victoria	Perhúmeda	38°14'	72°23'
MPO-39-88 *	Temuco	Perhúmeda	38°47'	72°37'
<i>M. polymorpha</i>	Australia			
cv. Circle Valley				
cv. Serena				
cv. Santiago				
<i>M. arabica</i>	Chile			
MAR-7-94	Los Vilos	Semiárida	31°52'	71°29'
MAR-41-94	Rungue	Semiárida	33°00'	70°53'
MAR-2-94	Tierras Blancas	Semiárida	32°36'	71°17'
MAR-65-88	Calleuque	Subhúmeda	34°26'	71°27'
MAR-1-88	Cauquenes	Subhúmeda	35°52'	72°11'
MAR-62-94	Huape	Subhúmeda	36°35'	72°14'
MAR-38-88	Galvarino	Húmeda	38°24'	72°49'
<i>M. rotata</i>	Siria			
2600 (ICARDA)				
<i>M. rigidula</i>	Francia			
FR-83004 (INRA)				
<i>M. litoralis</i>	Australia			
cv. Harbinger				
<i>M. tornata</i>	Australia			
cv. Tornafield				
<i>M. truncatula</i>				
cv. Borung	Australia			
cv. Cyprus	Australia			
cv. Jemalong	Australia			
cv. El Wassat	Australia			
FR-83005 (INRA)	Francia			

\* Accesiones con gloquideos espinudos

proteína cruda de las diferentes accesiones. A cada lado del gel se colocaron filtros con azul de bromofenol para indicar el estado de avance de las proteínas.

Los geles fueron sometidos a electroforesis a 4°C, cubriendo el gel para prevenir su deshidratación. En los geles con Tris-citrato se hizo una pre-corrída de 30 minutos a 25 mA, luego de sacados los filtros se subió la corriente a 75 mA, hasta que el bromofenol azul alcanzó una distancia de migración de 15 cm desde el origen. En los geles con Histidina se hizo una pre-corrída de 30 minutos a 15 mA, luego de sacados los filtros se subió la corriente a 30 mA, bajo las mismas condiciones de término de electroforesis de los geles de litio. Terminada la electroforesis los geles fueron laminados y sometidos a los diferentes sistemas de tinción histoquímica (Arulsekar & Parfitt 1986). La incubación de los geles se realizó a 37° C.

#### *Análisis de los datos*

La evaluación de las bandas se realizó midiendo su distancia de migración desde el origen. Las bandas fueron enumeradas en orden correlativo, desde la que alcanzó la mayor distancia (1) de migración hacia la de menor distancia (2). Se

realizó el zimograma para todos los sistemas isoenzimáticos analizados.

Los resultados fenotípicos de las isoenzimas fueron analizados en forma cualitativa (SIMQUAL). La comparación de pares de accesiones fue realizada con bandas presentes en común y bandas únicas para calcular los coeficientes de similaridad de Jaccard (Rohlf 1992). Los coeficientes fueron usados para la confección del fenograma basado en el método UPGMA, Unweighted pair group with arithmetic mean. El análisis fue realizado mediante el programa NTSYS-pc (Rohlf 1992).

Para aquellos sistemas isoenzimáticos cuya segregación genética ha sido descrita previamente se analizó el número de alelos y locus presentes.

## RESULTADOS

### *Diversidad isoenzimática*

De los 12 sistemas isoenzimáticos evaluados inicialmente, los sistemas EST y ACPH fueron descartados por su baja resolución e inconsistencia. El número total de patrones de bandas obtenidos en todas las especies y accesiones fue 36, de los cuales los sistemas que utilizaron como buffer Tris-Citrato presentaron un menor porcentaje

TABLA 2

Número de patrones y bandas totales por sistema isoenzimático en *Medicago* spp.

Banding patterns and total number of bands per isozyme system in *Medicago* spp.

Sistema	Número de patrones		Número de bandas*	
	<i>Medicago</i> spp	<i>Medicago polymorpha</i>	<i>Medicago</i> spp	<i>Medicago polymorpha</i>
Tris-Citrato				
AAT	2	2	3	3
GPI	1	1	2	2
LAP	4	2	4	2
ME	2	1	2	1
PRX	4	3	7	7
PGM	2	2	3	3
Sub-total	15	11	21	18
Porcentaje	41,7	61,1	41,2	54,5
Histidina				
6-PGD	3	2	6	3
SKDH	5	1	5	1
MDH	7	2	11	8
DIAP	6	2	8	3
Sub-total	21	7	30	15
Porcentaje	58,3	38,9	58,8	45,5
Total	36	18	51	33
Porcentaje	100	52,9	100	64,7

\* bandas con diferente migración desde el origen

(42%) que los sistemas que utilizaron Histidina (58%) (Tabla 2). En *M. polymorpha* se detectó un 52,9% del total de patrones, pero en este caso los sistemas que usaron Tris-citrato (61%) como buffer presentaron un mayor número de fenotipos en comparación con Histidina (39%) (Tabla 2).

El número de bandas totales generadas por la actividad isoenzimática fue de 51, de las cuales 33 fueron detectadas en *M. polymorpha*, es decir, un 64,7%. Considerando el número de bandas totales generadas en los dos sistemas de buffer, podemos apreciar que Tris-citrato detectó un 41,2% e Histidina un 58,8%. Sin embargo, para el caso de *M. polymorpha* se observó una situación inversa, ya que el sistema de buffer Tris-citrato detectó un 54,5%, mientras que en Histidina se observó un 45,5% (Tabla 2).

Los datos obtenidos en este estudio mostraron un bajo polimorfismo para todas las isoenzimas estudiadas. A menudo se observó en forma predo-

minante un genotipo por especie. Para algunas isoenzimas se pudo constatar su control genético a través de la estabilidad y del bajo número de bandas que presentaron los sistemas (Tabla 3).

Para la isoenzima AAT las bandas son producto de dos loci AAT 1 y AAT 2. En este estudio, *Medicago polymorpha* presentó monomorfismo con los alelos AAT 1a y AAT 2 (Tabla 3); en cambio *M. truncatula*, *M. tornata*, *M. littoralis* y *M. rotata* presentaron una variante alélica para el locus AAT 1b. En términos de fenotipos, con la enzima AAT se observaron sólo dos patrones, en las 7 especies de *Medicago* incluidas en el estudio. Ambos fenotipos tienen una banda en común ubicada a 5 mm del origen (AAT 2). La segunda banda está situada a 30 mm (AAT 1a) y a 27 mm (AAT 1 b) en el primer y segundo patrón, respectivamente. El alelo AAT 1a también fue presentado por *M. arabica*, *M. rigidula* y *M. truncatula*.

TABLA 3

Enzimas, número de loci, alelos en poblaciones de *Medicago* spp naturalizadas en Chile

Enzymes, number of loci, alleles in *Medicago* spp populations naturalized in Chile

Enzima	Locus y alelos	<i>M. polymorpha</i>	Presencia de alelos en otros <i>Medicago</i> .
Aspartato amino transferasa	AAT 1 a	100,0 %	<i>M. arabica</i> , <i>M. truncatula</i> , <i>M. tornata</i> , <i>M. littoralis</i> , <i>M. rotata</i>
	AAT 1 b	-	
	AAT 2	100,0 %	<i>M. arabica</i> ,, <i>M. tornata</i> , <i>M. littoralis</i> , <i>M. rotata</i> ,, <i>M. rigidula</i>
Fosfoglucomutasa	PGM 1 a	100,0 %	<i>M. arabica</i> , <i>M. truncatula</i> ,, <i>M. tornata</i> , <i>M. littoralis</i> , <i>M. rotata</i>
	PGM 2 a	9,8 %	
	PGM 2 b	90,2 %	
Glucó Fosfo isomerasa	GPI 1	100,0 %	<i>M. arabica</i> ,, <i>M. truncatula</i> ,, <i>M. tornata</i> , <i>M. littoralis</i> , <i>M. rotata</i>
	GPI 2	100,0 %	
Enzima málica	ME 1 a	100,0 %	<i>M. arabica</i> ,, <i>M. truncatula</i> ,, <i>M. tornata</i> , <i>M. littoralis</i> , <i>M. rotata</i>
	ME 1 b	-	
Shikimato dehidrogenasa	SKDH 1 a	-	<i>M. truncatula</i> <i>M. rotata</i> , <i>M. rigidula</i> <i>M. littoralis</i> <i>M. arabica</i> <i>M. arabica</i>
	SKDH 1 b	-	
	SKDH 1 c	100,0%	
	SKDH 1 d	-	
	SKDH 1 e	-	
Leucina aminopeptidasa	LAP 2 a	95,1%	<i>M. rigidula</i> , <i>M. arabica</i> <i>M. truncatula</i> <i>M. tornata</i> , <i>M. littoralis</i> , <i>M. rotata</i> <i>M. truncatula</i>
	LAP 2 b	4,9%	
	LAP 2 c		
	LAP 2 d		

En el caso de GPI y PGM los fenotipos de dos bandas podrían ser el producto de dos loci (Tabla 3); en medicagos anuales se ha reportado anteriormente que estos loci son monomórficos más que polimórficos. Ello se observó en el caso de GPI, donde el único patrón observado presentó dos bandas, ubicadas a 50 y 40 mm, respectivamente, para todas las especies analizadas.

En el caso de PGM se presentaron dos loci, PGM 1 a 45 mm del origen de migración y PGM 2, con dos variantes alélicas PGM 2 a y PGM 2 b ubicados a 38 y 41 mm respectivamente. En *Medicago polymorpha*, el 90,2% de las accesiones presentó el alelo PGM 2 b y un 9,8% presentó la variante alélica PGM 2 a. Para las otras especies de medicagos las formas alélicas no fueron especie específica.

Las bandas de LAP son para la mayoría de las especies codificadas por dos loci LAP 1 y LAP 2, por baja resolución LAP 1 no fue analizada. El locus LAP 2a se presentó en un 95% de las accesiones de *M. polymorpha*, a una distancia de migración de 38 mm desde el origen. Este alelo fue compartido con las especies *M. rigidula* y *M. arabica*. Por otro lado, el alelo LAP 2b se presentó en un 5% a 35 mm del origen. El locus LAP 2 lo presentó un 5% de *M. polymorpha*, este locus fue observado en una accesión de *M. truncatula*. El resto de las especies presentaron una sola banda de actividad, pero con distintas distancias de migración. El fenotipo 3, presentó una zona de actividad a 32 mm y correspondió a las especies *M. tornata*, *M. littoralis* y *M. rotata*. El fenotipo 4 presentó una banda a 27 mm y fue observada en 4 accesiones de *M. truncatula*.

Con el locus de ME se presentaron dos alelos; el primero ME 1a con una zona de actividad a 23 mm del origen, se observó en forma exclusiva en *M. polymorpha* no presentando polimorfismo, mientras que el segundo alelo ME 1b, a 25 mm se observó en el resto de las especies estudiadas.

La variación interespecífica fue demostrada por SKDH, donde la migración de sus bandas fue especie específica. Con este sistema se detectaron 5 fenotipos de banda única, que al parecer es la expresión de un solo gen. El primer fenotipo con una banda a 19 mm, fue monomórfico en todas las accesiones de *M. polymorpha* y *M. littoralis*. El segundo patrón, a 26 mm se observó exclusivamente en *M. truncatula*. El tercer fenotipo, a 23 mm lo presentaron *M. rotata* y *M. rigidula*. Finalmente, el cuarto y quinto fenotipo, localizados a 17 mm y 13 mm respectivamente, fueron exclusivos para la especie *M. arabica*.

Para los sistemas PRX, 6PGD, MDH y DIAP no se han realizado estudios de herencia en medicago, por lo cual fueron analizados fenotípicamente. El

sistema 6PGD presentó 3 fenotipos con bandas heteroduplex. El fenotipo 1, con bandas a 34 y 32 mm, lo presentaron todas las accesiones de *M. polymorpha*, un 80% de las accesiones de *M. truncatula*, *M. littoralis* y *M. rigidula*. El segundo fenotipo, con bandas a 32 y 30 mm, se observó solo en *M. rotata*. Finalmente, el fenotipo 3, con bandas a 38 y 40 mm, lo presentaron *M. arabica*, *M. tornata* y *M. truncatula*.

Con la PRX catodal se detectaron cuatro fenotipos isoenzimáticos. El fenotipo 1, con bandas a 38, 35, 25, 12 y 4 mm, se detectó en un 93% de las accesiones de *M. polymorpha*, en *M. truncatula* y *M. arabica*. El fenotipo 2, con bandas a 38, 35, 25, 12, 8 y 4 mm, se observó en una sola accesión de *M. polymorpha*. El fenotipo 3, con bandas a 38, 35, 25, 15 y 4 mm, fue observado en *M. arabica* y *M. polymorpha* en una baja frecuencia. El fenotipo 4, con bandas a 38, 35, 25 y 4 mm, se presentó solo en *M. truncatula*.

Con la isoenzima MDH se detectaron siete fenotipos. El fenotipo 1 (bandas a 28, 25, 23, 20 y 7 mm) se presentó en el 98% de las accesiones de *M. polymorpha*, en un 20% de *M. truncatula*, en *M. rigidula* y *M. rotata*. El segundo fenotipo (bandas a 28, 25, 23 y 7 mm) se presentó en *M. arabica* y en un 40% de las accesiones de *M. truncatula*. El tercer fenotipo (28, 25, 20, 17, 15, 13 y 7 mm) se presentó en una proporción muy baja en *M. polymorpha*. El cuarto fenotipo (34, 31, 28, 25 y 6 mm) lo presentó solo una accesión de *M. arabica*. El quinto fenotipo (31, 25, 23, 20 y 6 mm) lo presentó un 20% de las accesiones de *M. truncatula*. El sexto fenotipo (31, 28 y 7 mm) lo presentaron solo *M. littoralis* y *M. tornata*. Finalmente, el séptimo fenotipo (28, 25 y 7 mm) fue detectado en un 20% de las accesiones de *M. truncatula*.

En el sistema DIAP se detectaron seis fenotipos. *M. polymorpha* presentó mayoritariamente el primer fenotipo (45 y 31 mm) y una baja proporción del fenotipo 2 (45, 33 y 31 mm). El tercer fenotipo fue exclusivo de *M. arabica*, con bandas ubicadas a 4,3 y 3,1 cm. El cuarto fenotipo (37, 35 y 29 mm) lo presentó *M. rotata*, mientras que el quinto fenotipo (48, 45, 35 y 29 mm) fue detectado en *M. rigidula* y *M. littoralis*. Finalmente, el sexto fenotipo (32 y 29 mm) lo presentaron *M. tornata* y *M. truncatula*.

#### Agrupación de las especies y accesiones

El análisis fenotípico de los datos isoenzimáticos agrupó las especies de *Medicago* en 4 grandes grupos (Fig. 1). El primer grupo estuvo formado por las accesiones de *M. polymorpha* naturaliza-

das en Chile y cultivares australianos de la misma especie. Las accesiones chilenas de *M. polymorpha* se agruparon a una corta distancia genética (o nivel de similitud cercano a 0,93), lo que indica una escasa diversidad para los sistemas enzimáticos evaluados. El segundo grupo, próximo al primero (a 0,88), lo formaron accesiones de *M. arabica* naturalizadas en Chile. El tercer grupo estuvo formado por las accesiones de *M. tornata* y *M. truncatula*, y el cuarto grupo lo formaron las especies *M. rotata*, *M. rigidula* y *M. littoralis*. Estas agrupaciones presentaron dos excepciones, la primera de ellas fue que la accesión "El Wassat" perteneciente a *M. truncatula* que se agrupó con las accesiones de *M. polymorpha* (grupo 1), lo que se podría explicar por su naturaleza híbrida y, la segunda es la accesión MAR-1-88, perteneciente a *M. arabica*, la cual se agrupó con *M. rotata*, *M. rigidula* y *M. littoralis* (grupo 4).

Las especies *M. tornata* y *M. truncatula* aparecen como las especies más cercanas a *M. polymorpha* y *M. arabica* con un nivel de similitud promedio de 0,8. Sin embargo, *M. rotata*, *M. rigidula* y *M. littoralis* son las que presentan una mayor distancia genética (0,68) con respecto a las dos especies naturalizadas en Chile (Fig. 1). Las distancias de similitud, dentro de la especie *Medicago polymorpha*, variaron entre 1,0 y 0,81 (Tabla 4). Mayores fueron las distancias entre *M. polymorpha* con las otras especies. Por ejemplo, se observó que con *M. arabica* las distancias variaron entre 0,62 y 0,97, con *M. rotata* entre 0,68 y 0,78, con *M. rigidula* entre 0,64 y 0,72, con *M. littoralis* entre 0,53 y 0,64, con *M. tornata* entre 0,78 y 0,86 y con *M. truncatula* entre 0,74 y 0,96.

#### DISCUSION

El análisis de los diversos sistemas isoenzimáticos mostró un bajo nivel de diversidad a nivel de fenotipo y frecuencia de alelos en *M. polymorpha*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en poblaciones de *M. polymorpha* proveniente de diferentes localidades de Cerdeña (Bullita et al. 1994), Túnez (Abdelkefi et al. 1996) y Argelia (Fyad-Lameche et al. 1996). Esta escasa diversidad genética observada en esta especie se puede deber a la naturaleza cleistogámica de sus flores (Fyad-Lameche et al. 1996) que determina su sistema de reproducción (autopolinización), disseminación de semilla y deriva genética (Abdelkefi et al. 1996).

De los 10 sistemas enzimáticos seleccionados, GPI fue el único sistema monomórfico, o sea, no

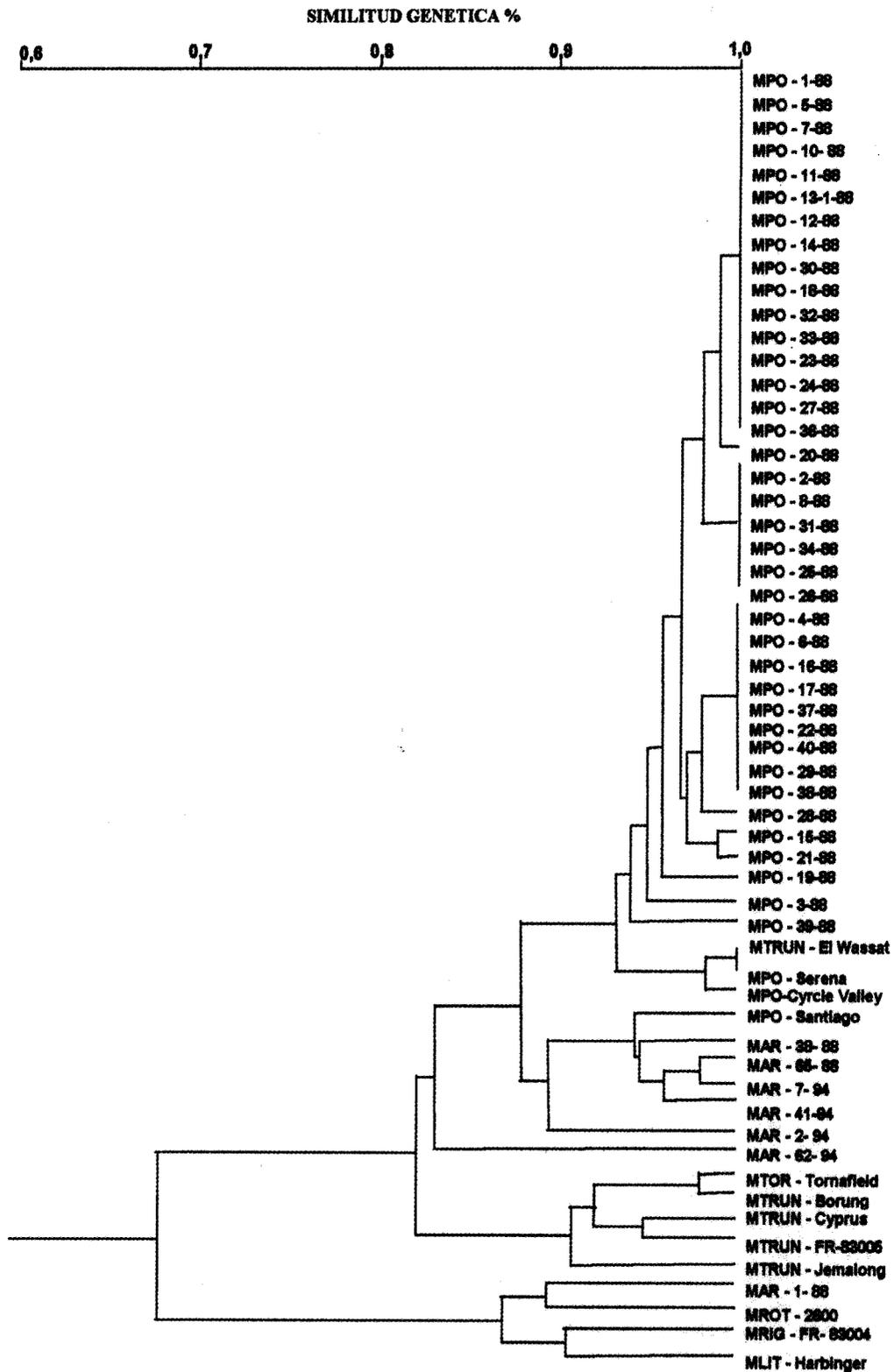
detectó diferencias entre ni dentro de las especies y accesiones estudiadas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Abdelkefi et al. (1996) y Fyad-Lameche et al. (1996). Sin embargo, el sistema GPI fue polimórfico en el estudio de diversidad genética en poblaciones italianas (Bullita et al. 1994). El sistema que presentó el mayor número de patrones de bandas dentro de *Medicago polymorpha* fue PRX, por lo cual esta enzima puede ser de gran utilidad en determinar diferencias genéticas, una vez clarificado el control genético de esta isoenzima. En otros estudios efectuados en *Medicago* spp, las enzimas MDH (Abdelkefi et al. 1996) y AAT (Fyad-Lameche et al. 1996) han sido los sistemas que han detectado un mayor nivel de diversidad. Fenotípicamente también se observó lo mismo con MDH en este estudio, pero la herencia de este patrón debe ser estudiada para la determinación de frecuencias alélicas.

Con algunos sistemas enzimáticos se obtuvieron patrones específicos para ciertas especies. Así por ejemplo, para ME, el primer fenotipo se presentó sólo en *M. polymorpha*, y en el sistema 6-PGD el fenotipo 2 fue exclusivo de *M. rotata*. Esto indicaría que es posible identificar algunas especies de *Medicago* y evaluar el posible flujo de genes de una especie a otra, mediante el uso de estos sistemas enzimáticos. Esta misma tendencia se observó en el análisis de otras especies de *Medicago* (Fyad-Lameche et al. 1996).

El análisis isoenzimático permitió separar las especies involucradas en el estudio, a pesar de que la cantidad de bandas polimórficas utilizadas no fue muy alto dado la naturaleza del marcador utilizado. Esta situación podría ser mejorada al usar marcadores moleculares como la Amplificación al azar del ADN (RAPD), Amplificación de Fragmentos polimórficos (AFLP) o microsatélites. A pesar del escaso polimorfismo detectado por las isoenzimas, este tipo de marcadores puede tener utilidad en las etapas iniciales de caracterización genética de germoplasma, como ha sido confirmado en otras especies leguminosas.

La agrupación de *M. polymorpha* y *M. arabica*, dos de las especies más abundantes en el país, permite suponer que las condiciones de adaptación de estas dos especies son bastante similares. A pesar de la similitud morfológica entre estas dos especies, al parecer, poseen algunos mecanismos que les permiten mantener una aislación reproductiva, impidiendo el flujo de genes entre ellas. En este sentido, se presentó una sola accesión de *M. arabica* ubicada fuera de su grupo.

La escasa diversidad isoenzimática de *Medicago polymorpha*, contrasta con la presencia de una mayor diversidad a nivel agronómico, tales como



*Fig. 1.* Dendrograma de genotipos de *Medicago* spp. basado en datos isoenzimáticos.  
Dendrogram of genotypes of *Medicago* spp. based on isozyme data.

días a floración y madurez (Ovalle et al. 1997, Ovalle et al. 1998) y a nivel fisiológico, como respuesta de la floración a la temperatura y fotoperíodo (Del Pozo et al. 1995). El fenómeno, no es exclusivo de *M. polymorpha* y se presenta en otras especies leguminosas como *Phaseolus vulgaris* (Paredes & Gepts 1995), *Lens culinaris* (Rodríguez 1996) y *Lathyrus sativus* (Alfaro 1997). Es posible que las isoenzimas evaluadas no estén ligadas a características adaptativas y sean, neutras desde el punto de vista de la selección natural (Fyad-Lemeche et al. 1996). Sin embargo, la relación entre la frecuencia de algunos alelos de las isoenzimas con algunas características morfológicas y/o agronómicas, asociadas a la adaptación de esta especie a diferentes ambientes, podría influir en la mantención o pérdida de ciertos alelos. Por ejemplo, Bullita et al. (1994) detectaron una correlación positiva y significativa entre la frecuencia del alelo "b" del gen AAT-2 y el largo de la hoja y el peso de las 1000 semillas. Esta situación no está clara y necesita de un mayor estudio.

Desde el punto de vista genético, las características fisiológicas como reacción al fotoperíodo y temperatura, que controlan los ciclos reproductivos de las plantas, y que son claves en la determinación de la adaptación de la especie a un amplio rango de condiciones agroclimáticas, están controlados por un número reducido de genes, que tienen grandes efectos sobre el fenotipo de la planta (Roberts et al. 1997), pero estos no reflejan con exactitud la diversidad presente en el genoma de la planta.

La agrupación de las accesiones de *M. polymorpha* basado en fenotipos isoenzimáticos (Fig. 1), tuvo una escasa o nula concordancia con la distribución geográfica (Tabla 1), como tampoco con características agronómicas como precocidad, presencia o ausencia de espinas en los gloquidios, y productividad (Ovalle et al. 1997). Esto contrasta con lo obtenido en el análisis multivariado basado en características agronómicas, donde sí se encontró una clara relación con el ambiente de los sitios de colecta en *M. polymorpha* (Del Pozo et al. manuscrito).

Desde el punto de vista del mejoramiento genético de *M. polymorpha*, en una primera etapa, es posible seleccionar y multiplicar accesiones que posean características agronómicas adecuadas para diversas zonas agroecológicas del área mediterránea de Chile (e.g., Del Pozo et al. en prensa; Ovalle et al. en prensa) y ponerla a disposición de los agricultores. Sin embargo, debido a la aparente escasa diversidad genética que presentan las poblaciones chilenas y en otras regiones del mundo sería conveniente iniciar un pro-

grama de cruzamientos tendientes a ampliar la base genética de las poblaciones y a incorporar otras características deseadas.

La escasa diversidad encontrada a nivel isoenzimático necesita ser confirmada con una evaluación a nivel molecular para complementar la caracterización ya existente para lograr una mayor estabilidad y sustentabilidad productiva de este recurso.

#### AGRADECIMIENTOS

A Filomena Venegas por el manejo de las accesiones en el Banco de Germoplasma del CRI Quilamapu y cuidado de plantas en el invernadero. Esta investigación ha sido financiada por FONDECYT N°1961142. El trabajo fue presentado al XLVIII Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile, Arica, 1997.

#### LITERATURA CITADA

- ABDELKEFI A, M BOUSSAID, A BIBORCHI, A HADDIOUI, A SALHI-HANACHI & M MARRAKCHI (1996) Genetic diversity inventory and evaluation of spontaneous species belonging to *Medicago* L. genus in Tunisia. Cahiers. Options Méditerranéennes 18: 143-149.
- ARULSEKAR S & D PARFITT (1986) Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, pistachio and fig. Hortscience 21: 928-933.
- ALFARO M (1997) Variación isoenzimática en *Lathyrus sativus* y su relación con otras especies. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Universidad Adventista. Chillán, Chile. 55 pp.
- BULLITTA S, R FLORIS, MD HAYWARD, A LOI, C PORQUEDDU & F VERONESI (1994) Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. Euphytica 77: 263-268.
- DEL POZO A, C OVALLE & J AVENDAÑO (1989) Los Medicagos anuales en Chile. I. Comparación con Australia. Agricultura Técnica (Chile) 49: 260-267.
- DEL POZO A, C OVALLE & J AVENDAÑO (1995) Time to flowering of *Medicago polymorpha* ecotypes and cultivars in response to temperature and photoperiod. Cahiers Options Méditerranéennes 12: 33-35.
- DEL POZO A, J AVENDAÑO & C OVALLE (1999) Long term productivity of a ley farming system in the "secano interior" of Chile. Cahiers Options Méditerranéennes 39: 235-258.
- DEL POZO A, J AVENDAÑO, C OVALLE & T ARAVENA (en prensa) Combarbala-INIA, un cultivar precoz de hualputra (*Medicago polymorpha*), para áreas de secano mediterráneo. Agricultura Técnica (Chile).

- EWING MA & JG HOWIESON (1989) The development of *Medicago polymorpha* L. as an important pasture species for southern Australia. En: Proceedings XVI International Grasslands Congress: 197-198. Association Française pour la Production Fourragère, INRA, Paris.
- FAYD-LAMECHE FZ, G BELLATAR, S BOUABDALLAH & N YAHIA (1996) Between and within species variation in annual *Medicago* species. Cahiers Options Méditerranéennes 18: 161-169.
- MARTICORENA C & M QUEZADA (1985) Catálogo de la flora vascular de Chile. Gayana 42: 1-155.
- NAVAS LE (1976) Flora de la cuenca de Santiago de Chile. Editorial Universidad de Chile. 55 pp.
- OVALLE C, A DEL POZO, J AVENDAÑO & J ARONSON (1997) Características fenológicas y productivas de 34 accesiones de *Medicago polymorpha*, colectadas en la zona mediterránea de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 57: 261-271.
- OVALLE C, J AVENDAÑO & A DEL POZO (1998) Productividad de accesiones de *Medicago polymorpha* en relación a la precocidad y a la altura de corte. Agricultura Técnica (Chile) 58: 15-22.
- OVALLE C, A DEL POZO, J AVENDAÑO & T ARAVENA (en prensa) Cauquenes-INIA, nueva variedad de hualputra chilena (*Medicago polymorpha*), para áreas de secano mediterráneo. Agricultura Técnica (Chile).
- PAREDES M & P GEPTS (1995) Extensive introgression of Middle American germplasm into Chilean common bean cultivars. Genetic Resources & Crop Evolution 42: 29-41.
- PUCKRIDGE DW & RJ FRENCH (1983) The annual legume pasture in cereal-ley farming systems of southern Australia : a review. Agriculture, Ecosystem & Environment 9: 229-267.
- QUIROS FC (1981) Starch gel electrophoresis technique used with alfalfa and other *Medicago* species. Canadian. Plant Science 61: 745-749.
- ROBERTS EH, RJ SUMMERFIELD, RH ELLIS, PQ CRAUFURD & TR WHEELER (1997) The induction of flowering. En: Wien HC (eds) The physiology of vegetables crops: 69-99. CAB International. Wallingford, UK.
- RODRIGUEZ M (1996) Diversidad genética del germoplasma de lentejas (*Lens culinaris* M.) naturalizado en Chile. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Universidad Adventista. Chillán, Chile. 53 pp.
- ROHFL FJ (1992) NYSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems. Version 1.70. Exeter Publ, New York. 250 pp.