Identificación de cultivares de *Medicago sativa* L. por caracteres bioquímicos en semillas y plántulas

Galussi, Alberto A.; Moya, María E.; Zimmermann, Liliana R.; Novelli, Leonardo E.; Fagúndez, Guillermina

Resumen

Las semillas de los cultivares de alfalfa son morfológicamente similares, por ello, el análisis de proteínas en semillas y plántulas podría resultar adecuado para diferenciar los cultivares. El objetivo de este trabajo fue caracterizar cultivares de alfalfa, provenientes de dos cosechas, a nivel de proteínas de las semillas a través de SDS PAGE y A PAGE, y en estado de protrusión y cotiledonar por el análisis de la isoenzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH). El tamaño muestral adecuado para electroforesis fue de 0,5g de semillas en 5,00ml de buffer de extracción y el volumen de siembra apropiado fue de 10µl. En ambos métodos, SDS PAGE y A PAGE, se logró el fraccionamiento proteico, aunque no fue posible la diferenciación entre cultivares; las escasas diferencias halladas no fueron repetibles en muestras de diferentes años de cosecha. El sistema ADH manifestó diferencias entre cultivares, lográndose mayor diferenciación en el estado de protrusión.

Palabras clave: botánica, alfalfa, electroforesis, proteínas, isoenzimas

Artículo producido en el marco del PID UNER 2101; 2004-2007; Director: Ing. Agr. Alberto Galussi; Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA), Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER); recibido en marzo 2011; admitido en agosto 2011.

Autores: Laboratorio de Identificación, Caracterización, Verificación de Especies Vegetales y Cultivares (LICVEVC), FCA, UNER, (Oro Verde, Entre Ríos, Argentina). Contacto: cultivar@fca.uner.edu.ar

Identification of *Medicago sativa* L. cultivars by its biochemical characteristics in seeds and seedlings

Abstract

Since alfalfa cultivar seeds are morphologically similar, seed and seedling protein analysis would be adequate to differentiate both cultivars. The purpose of this study was to characterize alfalfa cultivars from two different harvests according to seed protein level determined through SDS PAGE and A PAGE, and in protrusion and cotyledonar state through dehidrogenase alcohol isoenzyme. The adequate sample size for electrophoresis was 0.5g of seeds in 5.00ml of extraction buffer and the appropriate sowing volume was 10µl. In both SDS PAGE and A PAGE methods, protein fractioning was carried out though it was not possible to differentiate among cultivars; the slight differences found were not repeated in samples from different harvest years. The ADH system showed differences among cultivars getting a higher differentiation at the protrusion state.

Keywords: botany, alfalfa, electrophoresis, proteins, isoenzymes

Identificação de cultivares de *Medicago sativa* L. por caracteres bioquímicos em sementes e plântulas

Resumo

As sementes dos cultivares de alfafa são morfologicamente similares, por isso, a análise de proteínas em sementes e plântula poderia resultar adequada para diferençar os cultivares. O objetivo deste trabalho foi caracterizar cultivares de alfafa, provindas de duas colheitas, a nível de proteínas das sementes através de SDS PAGE e A PAGE, e em estado de protrusão e cotiledonar pela análise da isoenzima Álcool Deshidrogenada. O tamanho de amostra adequado para electroforese foi de 0,5g de sementes em 5,00ml de buffer de extração e o volume de semeadura apropriado foi de 10µl. Em ambos os métodos, SDS PAGE e A PAGE, logrou-se o fracionamento proteico, porém não foi possível a diferenciação entre cultivares; as escassas diferenças achadas não foram repetíveis em amostras de diferentes anos de colheita. O sistema ADH manifestou diferenças entre cultivares, logrando-se maior diferenciação no estado de protrusão.

Palavras chave: botânica, alfafa, eletroforese, proteínas, isoenzimas

I. Introducción

La caracterización de cultivares de alfalfa, solicitada por el Registro Nacional de Cultivares de Argentina, actualmente se limita a la reacción a plagas y enfermedades. Estos caracteres resultan poco útiles para identificar rápidamente el lote a nivel de semillas. Algunas asociaciones como International Seed Testing Association (ISTA) y Association of Official Seed Analysts (AOSA), dedicadas a evaluar la calidad de semillas a través de diferentes análisis, entre ellos, el de verificación de la identidad de la semilla, han desarrollado técnicas apropiadas para identificar los cultivares directamente sobre las semillas en diversas especies. Si bien estos caracteres bioquímicos no están requeridos como obligatorios para la inscripción de un nuevo cultivar, existen numerosos trabajos en los que se expresan resultados exitosos, ya sea con proteínas de las semillas e isoenzimas de plántulas y plantas [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] para cultivares de trigo, como en arroz [7] [8], [9], en raigrás [10] [11] [12] [13] [14] y en avena [15].

Estudios isoenzimáticos por electroforesis en geles de almidón, evaluando los sistemas peroxidasa (Perox.), esterasa (Est.), leucine amino peptidasa (LAP) y alcohol dehidrogenasa (ADH) se mencionan para alfalfa, en semillas, raíces y hojas [4]. También se citan como métodos útiles para la identificación de cultivares a la electroforesis de las proteínas seminales en gel de poliacrilamida (PAGE) [16], pero sin mayores especificaciones sobre el tamaño muestral, y el de electroforesis de isoenzimas de semilla, raíz y hojas en geles de almidón. Variedades comerciales de alfalfa, en otros países se diferenciaron mediante la utilización de las isoenzimas fosfoglucomutasa (PGM) e isocitrato deshidrogenasa (IDH) [17]. También se mencionan resultados de identificación en alfalfa y otras leguminosas en [18] y [19].

Estos antecedentes nos indicarían la factibilidad de la identificación de cultivares de alfalfa por caracteres bioquímicos. Dichos caracteres tienen ventajas sobre otros (morfológicos y agronómicos) ya que son precisos, rápidos, estables y de bajo costo; no obstante, debe afirmarse la estabilidad del resultado en diferentes cosechas y ambientes.

El objetivo del trabajo fue caracterizar cultivares de *Medicago sativa* L. por electroforesis de sus proteínas seminales y por el sistema isoenzimá-

tico ADH, para diferenciar los genotipos de alfalfa. El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Identificación, Caracterización, Verificación de Especies Vegetales y Cultivares de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

II. Metodología

II.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) de 11 cultivares inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas: Sirivier, 5909 T, Baralfa 85, Baralfa 9242, P 30, Monarca ISP, Bárbara ISP, Victoria ISP; Dual; 5808 E; 5606 T. Las muestras de semillas provenientes de dos cosechas (450g) fueron provistas por los criaderos obtentores de los cultivares estudiados.

II.2. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

II.2.1. Extracción de proteínas seminales

Se usó una solución de buffer de extracción concentrado (Tris ClH pH 6,8, glicerol, SDS y azul de bromofenol), mercaptoetanol y agua, en relación 17:3:10 [20].

Las semillas se molieron en mortero de porcelana y posteriormente se colocaron en tubos de ensayo a los que se añadió la solución de extracción. Se agitaron en vórtex y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. La extracción se completó colocando los tubos en baño María durante diez minutos en agua hirviendo. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue usado en forma inmediata o se guardó en heladera a 4ºC durante un lapso de tiempo no superior a las 48 horas.

II.2.2. Electroforesis

El método sodium dodecyl sulphate –electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) se llevó a cabo en un equipo vertical Bio Rad Protean II, con geles discontinuos de poliacrilamida (gel superior: 5% T; 1,75% C; pH 6,8; gel inferior: 13 % T; 1,3% C; pH 8,8) y buffer de

cubas conteniendo 3g de Tris HCl; 14,1g de glicina y 1g de SDS por litro de solución. La misma se efectuó con una intensidad de 60 mA en un período de 4 a 5 horas.

La fijación de las proteínas se realizó con una solución acuosa de etanol (40% v/v) y ácido acético glacial (10% v/v), durante una hora. Luego se lavaron los geles y se procedió a la tinción con ácido acético al 15% v/v, solución acuosa y PAGE blue al 1% p/v en metanol durante 24 - 48 horas (200ml solución de ácido acético: 10ml de solución de PAGE Blue por gel). Posteriormente se lavaron con agua destilada, se secaron, digitalizaron en computadora y guardaron en heladera para su evaluación.

II.2.3. Evaluación del peso de la muestra de siembra para identificar los cultivares

Se evaluaron 4 cultivares con 15 repeticiones de cada muestra de diferente peso por cultivar. Fueron 12 las variantes ensayadas, considerando los diferentes pesos de semillas molidas, los mililitros de buffer de extracción utilizado y los volúmenes de muestra de siembra en el gel, para la corrida electroforética (**Tabla 1**).

TABLA 1. Variantes de muestras ensayadas para la electroforesis de proteínas seminales

Pesos de semillas analizados (g)	0,50	0,20	0,10	0,060	0,040	0,020	0,010
Buffer de extracción (ml)	5,00	2,50	1,50	1,50	1,00	0,50	0,25
Volumen de siembra (µl)	10; 20	15		15 ; 20			

II.2.4. Caracterización e identificación de los cultivares

La caracterización se realizó sobre 60 muestras de trabajo para los once cultivares. Para la comparación de los perfiles proteicos se sembraron en un mismo gel todos los cultivares, repitiendo el análisis tres veces. A fin de calibrar los geles, se sembró la calle media de cada uno con proteínas marcadoras de pesos moleculares conocidos: fosforilasa b - 97 kDa, albúmina - 66 kD, ovoalbúmina - 45 kD, anhidrasa carbónica - 30

kD, inhibidor de tripsina - 20,1 kD y α- lactoalbúmina - 14,4 kD (Calibration Kit LMW for Electrophoresis, de Amersham Biosciences).

A partir de la mejor repetición obtenida de los geles de comparación de los once cultivares, se registraron el número y posición de las bandas y el electroforegrama proteico típico de cada cultivar. Se construyó una matriz de datos, asignando el valor 1 a las bandas presentes y el 0 a las ausentes. Tales datos se procesaron con software Infostat [21] mediante análisis de asociación con el método de encadenamiento promedio. El coeficiente de disimilitud entre cultivares se calculó de acuerdo a Jaccard [22] evaluando las distancias según (1-j).

II.3. Análisis de proteínas seminales por electroforesis en gel de poliacrilamida (A PAGE)

II.3.1. Extracción de proteínas

Se realizó la molienda de 0,5g de semilla por muestra en mortero de porcelana. La harina se trasvasó a tubos Eppendorf a los que se les agregó 5,0ml de la solución de extracción (verde de metilo (0,05% w/v) en 2 Cloro etanol (25% v/v). Las muestras se agitaron en un Vórtex y se dejaron en reposo toda la noche a temperatura ambiente; luego se las agitó nuevamente y se centrifugaron por 10 minutos a 8000 rpm.

II.3.2. Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en un equipo vertical Bio Rad Protean II, utilizándose una concentración del gel de 13% T [¨%T= (g acrilamida + g bisacrilamida) / Vol. total gel x 100)] y 3% C [%C= g bisacrilamida / (g acrilamida + g bisacrilamida) x 100]. Se sembraron 25µl por calle, del sobrenadante de la muestra de extracción. La electroforesis se realizó con una intensidad de corriente de 1,0 – 1,2mA/cm (largo del gel). En la cuba se colocaron dos geles por corrida, lo que significó 40mA y un voltaje aproximado de 800 voltios. El tiempo de corrida para dos geles con 15 muestras cada uno fue de aproximadamente una hora (tiempo de salida del verde de metilo). La temperatura durante la corrida se mantuvo entre 15 y 20ºC.

La fijación y tinción se realizaron por 48 horas en una solución acuosa de 1g de Coomassie Blue G250 en 100ml de etanol (40 cc) y 100ml de

ácido acético en 1 litro de agua destilada (160cc). Luego se lavaron los geles con agua destilada, se secaron y guardaron en heladera entre hojas de papel celofán cerradas, para su posterior lectura y evaluación.

II.3.3. Caracterización e identificación

La comparación de los perfiles proteicos se realizó sembrando en un mismo gel todos los cultivares. Se registraron el número y posición de las bandas y el electroforegrama proteico típico de cada cultivar. Se construyó una matriz de datos, asignando el valor 1 a las bandas presentes y el 0 a las ausentes y se procesaron con el software Infostat [21] mediante análisis de asociación con el método de encadenamiento promedio. El coeficiente de disimilitud entre cultivares se calculó evaluando las distancias según (1-j) [22].

II.4. Análisis de isoenzimas en las plántulas. Primera y segunda cosecha

Para el análisis de las isoenzimas vegetales se probó el sistema enzimático alcohol deshidrogenasa (ADH) en los cultivares de alfalfa de 2 años de cosecha.

La caracterización genética se realizó mediante la técnica de electroforesis sobre geles de acrilamida [23]. Se llevó a cabo utilizando semillas en protrusión de 24 a 36 horas de realizada la siembra y en los cotiledones en el estado plántula de 5 días de edad. Las semillas se sembraron sobre papel y se colocaron 4 días en estufa (20 ºC); luego se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su evaluación.

II.4.1. Extracción de las enzimas

La extracción de enzimas se realizó según el protocolo descripto en AOSA (1991). Para obtener los homogenatos, cada porción de cotiledón/semilla se colocó por separado en tubos de vidrios a los cuales se les agregaron 50 µl de solución de extracción (1,67 g de sucrosa; 0,83 g de ascorbato sódico, agua destilada hasta 10 ml y azul de bromofenol como indicador de corrida), y se maceraron con una varilla de vidrio. Luego se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue utilizado para la siembra. Los extractos fueron conservados a menos de 4ºC hasta el momento de la corrida electroforética.

II.4.2. Electroforesis

Se sembraron 15 muestras de 30/40ul de extracto por gel (1mm de grosor y 20cm de largo), en geles de acrilamida, utilizando una cuba electroforética vertical Protean II XI Cell (Bio-Rad). La electroforesis se realizó con una intensidad de 35mA y una temperatura de 10ºC durante aproximadamente 5 horas.

El revelado de los sistemas isoenzimáticos se efectuó según AOSA [23]. En ADH se realizó incubando el gel en 200ml de solución de tinción (10,5ml de etanol al 95%; 0,0075g de PMS (phenazine methosulfate); 0,0267g NBT (nitro blue tetrazolium) y 0,045g de NAD (b-nicotinamide adenine dinucleotide), disuelto en 150ml de Na_2HPO_4 (0,05 M, pH 7), por 1 hora en oscuridad, a 22ºC).

Después de la tinción, los geles se lavaron varias veces con agua, se secaron, escanearon y se evaluaron los zimogramas obtenidos.

III. Resultados y discusión

III.1. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

III.1.1. Evaluación del peso muestral de siembra para identificar los cultivares

Se halló uniformidad de los componentes proteicos en los distintos pesos de muestras de trabajo estudiados para los cuatro cultivares ensayados. Como ejemplo, en la **Figura 1** se presentan los perfiles proteicos del cultivar P30 (5) obtenidos por la electroforesis de 10, 20, 40 y 60mg de peso y 0,15µ de volumen de siembra. En éste, similar a los otros tres cultivares, no se evidenciaron diferencias entre los electroforegramas provenientes de diferentes pesos de muestras de semillas. Sin embargo, los menores pesos de muestra para la extracción proteica manifestaron menor número de componentes proteicos, optándose por definir para la identificación de los cultivares un peso de muestra de 0,5g en 5,00ml de buffer de extracción. Considerando la nitidez de las bandas presentes, el volumen de siembra seleccionado fue de 10µl. De esta forma, con dicho peso muestral y volumen de siembra, se evaluaron los 11 cultivares por electroforesis básica y ácida.

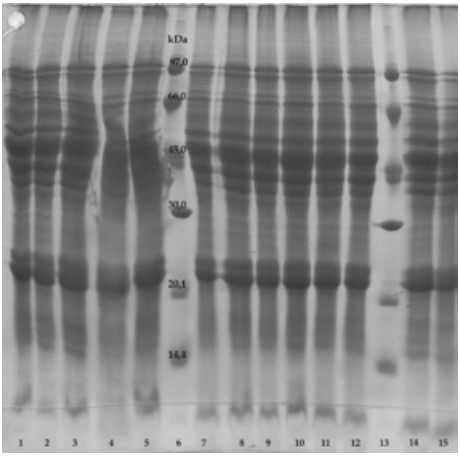

FIGURA 1. Electroforegrama de proteínas seminales de semillas de *Medicago sativa* cv. P30 determinado por SDS PAGE

PESO DE SEMILLAS: 60 mg (1 y 2); 40 mg (3, 4 y 5); 20 mg (7, 8, 9 y 10); 10 mg (11, 12, 14 y 15). PROTEÍNAS MARCADORAS: Fosforilasa b - 97 kDa; Albúmina - 66 kDa; Ovoalbúmina - 45 kDa; Anhidrasa carbónica - 30 kDa; Inhibidor de tripsina - 20,1 kDa y α- lactoalbúmina - 14,4 kDa (calles 6 y 13).

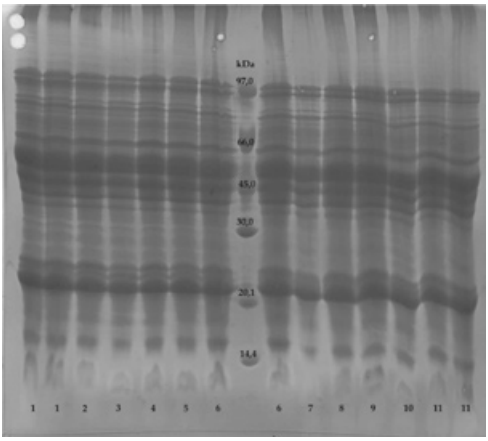

FIGURA 2. Electroforegrama de proteínas seminales totales de 11 cultivares de *Medicago sativa* determinados por SDS PAGE

CULTIVAR: (1) Sirivier; (2) 5909 T; (3) Baralfa 85; 4) Baralfa 9242; 5) P30; 6) Monarca ISP; 7) Bárbara ISP; 8) Victoria ISP; 9) Dual; 10) 5808 E; 11) 5606 T. PROTEÍNAS MARCADORAS: Fosforilasa b - 97 kDa; Albúmina - 66 kDa; Ovoalbúmina - 45 kDa; Anhidrasa carbónica - 30 kDa; Inhibidor de tripsina - 20,1 kDa y α- lactoalbúmina - 14,4 kDa.

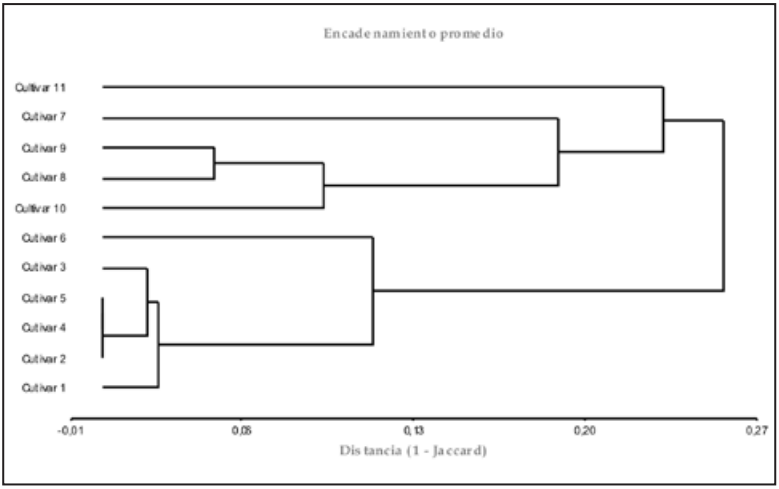

FIGURA 3. Dendrograma de 11 cultivares de *Medicago sativa* obtenido por encadenamiento promedio

CULTIVARES: (1) Sirivier; (2) 5909 T; (3) Baralfa 85; (4) Baralfa 9242; (5) P 30; (6) Monarca ISP; (7) Bárbara ISP; (8) Victoria ISP; (9) Dual; (10) 5808 E; (11) 5606 T. Correlación cofenética (ccc: 0,776).

Analizando los electroforegramas en los once cultivares, se detectó un total de 55 componentes proteicos diferentes, de los cuales 24, según su presencia o ausencia, contribuyeron a manifestar diferencias entre algunos de ellos (**Figura 2**). Tres cultivares (5909 T, Baralfa 9242 y P30) presentaron un único patrón de bandas.

El dendrograma obtenido por el encadenamiento promedio con un coeficiente de correlación cofenética (ccc) de 0,776 mostró un valor de disimilitud máximo de 0,25, evidenciando pocas bandas discriminantes entre cultivares (**Figura 3**).

Los resultados finales logrados –con un peso muestral de 0,5g en 5,00ml de buffer de extracción y un volumen de siembra de 10µl– expresaron uniformidad entre los cultivares de un mismo año de cosecha y entre los de cosechas diferentes evaluados por electroforesis SDS PAGE, demostrando un alto grado de uniformidad en los componentes proteicos. Los perfiles electroforéticos permitieron visualizar 57 componentes (**Figura 4**).

Si bien se estableció el tamaño de muestra de siembra conveniente en los análisis por SDS PAGE, los electroforegramas hallados no permitieron la diferenciación entre cultivares.

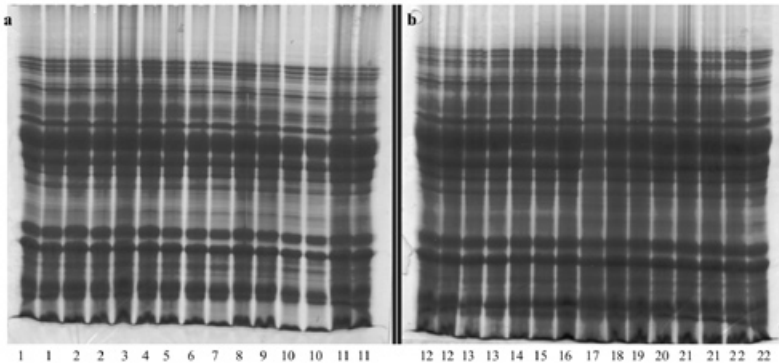

Figura 4. Electroforegrama de proteínas seminales totales de 11 cultivares de *Medicago sativa* determinados por SDS PAGE. (a) Primera cosecha (1-11); (b) Segunda cosecha (12-22)

CULTIVARES: (1; 12) Sirivier; (2; 13) 5909 T; (3; 14) Baralfa 85; (4; 15) Baralfa 9242; (5; 16) P 30; (6; 17) Monarca ISP; (7; 18) Bárbara ISP; (8; 19) Victoria ISP; (9; 20) Dual; (10; 21) 5808 E; (11; 22) 5606 T.

III.1.2. Análisis de proteínas seminales por electroforesis en gel de poliacrilamida (A PAGE)

La observación de los geles correspondientes a las dos cosechas de alfalfa (**Figura 5**), muestra escasas diferencias entre cultivares y años. El cultivar Victoria ISP (8 y 19) expresa diferencias en ambos años, aunque la diferencia no es en la misma banda en cada año y es en una sola banda, ya sea presente o ausente. Se observan numerosos componentes proteicos similares en los cultivares, no evidenciando el mismo comportamiento en las semillas en la subsiguiente cosecha, con lo cual no resultó un método exitoso para diferenciar cultivares.

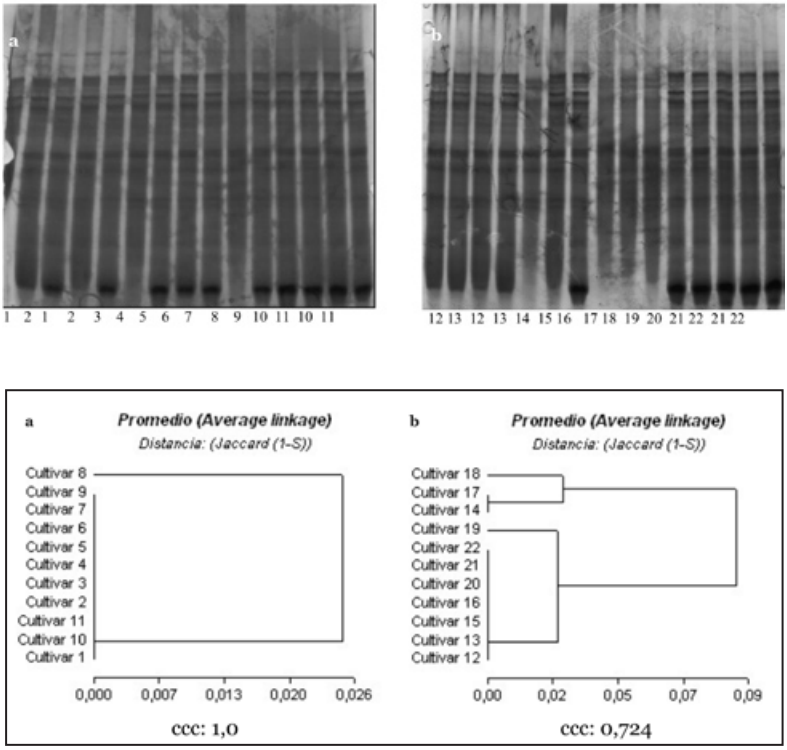

FIGURA 5. Electroforegramas de proteínas seminales por A PAGE y sus correspondientes dendrogramas en cultivares de alfalfa. (a) Primera cosecha (1-11); (b) Segunda cosecha (12 – 22)

CULTIVARES: (1; 12) Sirivier; (2; 13) 5909 T; (3; 14) Baralfa 85; (4; 15) Baralfa 9242; (5; 16) P30; (6; 17) Monarca ISP; (7; 18) Bárbara ISP; (8; 19) Victoria ISP; (9; 20) Dual; (10; 21) 5808 E; (11; 22) 5606 T. (ccc): Correlación cofenética.

El tamaño de la muestra que mejor expresó el fraccionamiento de los componentes proteicos de las semillas, a través de SDS PAGE y A PAGE, manifiestó escaso número de bandas discriminantes y reproducibilidad en los electroforegramas.

III.2. Análisis de isoenzimas en las plántulas. Primera y segunda cosecha

El sistema ADH mostró diferencias entre algunos cultivares, en ambas cosechas, observándose un total de 12 componentes isoenzimáticos. El número de bandas por cultivar y por momento de extracción del material vegetal se detalla en la **Tabla 2**.

Se observaron 7 bandas (bandas 2, 7, 8, 9, 10, 11 y 12) comunes a todos los patrones independientemente del origen del material vegetal trabajado. El número de patrones distintos obtenidos fue de 7 para los 8 cultivares ensayados en protrusión (cultivar Monarca ISP y Bárbara ISP, sin componentes isoenzimáticos definidos) y de 4 en los 5 cultivares evaluados en el estado de cotiledones, basados en la presencia o ausencia de las primeras bandas del zimograma (1, 3, 4, 5 y 6). Respecto de los patrones isoenzimáticos –obtenidos en los estados de protrusión y plántula– de un mismo cultivar, fueron diferentes en los cultivares Sirivier, Baralfa 9242 y Dual, y similares en los cultivares Baralfa 85 y 5808 E (**Figuras 6** y **7**).

TABLA 2. Componentes isoenzimáticos de ADH en cultivares de *Medicago sativa* L. en diferentes estructuras y estados: pt: protrusión, ct: cotiledones

Cultivar	Banda (componente)												
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	total
Siriver pt	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	8
5909 T pt	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	8
Baralfa 85 pt	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	10
Bar 9242 pt	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	9
P 30 pt	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	9
Dual pt	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	8
5808 E pt	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	7
5606 T pt	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	10
Sirivier ct	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	9
Baralfa 85 ct	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	10
Bar 9242 ct	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	8
Dual ct	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	8
5808 ct	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	7

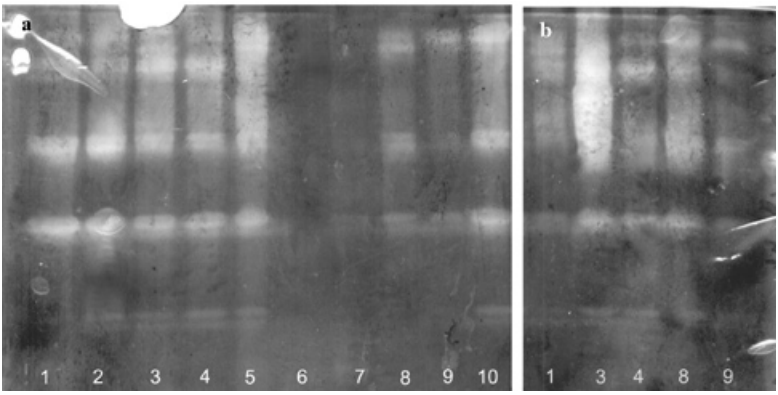

FIGURA 6. Patrones isoenzimáticos de ADH. (a): Semillas en estado de protrusión; (b): En cotiledones de plántulas de 5 días

CULTIVARES: (1) Sirivier; (2) 5909 T; (3) Baralfa 85; (4) Baralfa 9242; (5) P 30; (6) Monarca ISP; (7) Bárbara ISP; (8) Dual; (9) 5808 E; (10) 5606 T.

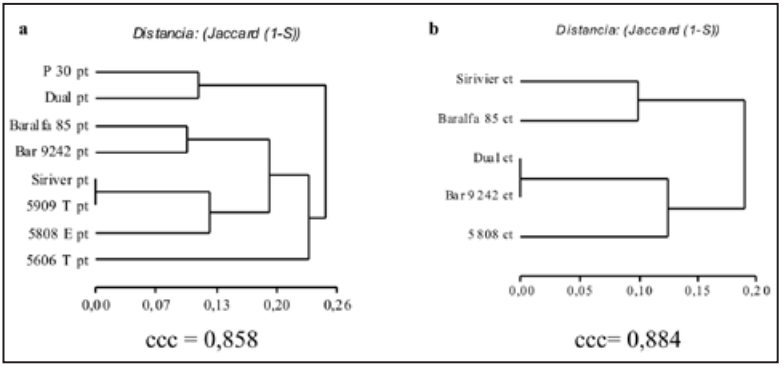

FIGURA 7. Dendrograma de isoenzimas ADH en cultivares de *Medicago sativa* (a) Semillas en estado de protrusión y (b) en cotiledones de plántulas de 5 días. (ccc): Correlación cofenética

IV. Conclusiones

Las proteínas de reservas de las semillas de alfalfa no expresan polimorfismo entre cultivares, y si bien se logra claramente el fraccionamiento de los componentes proteicos, el mismo no resultó estable, lográndose

similitud en los patrones electroforéticos sin clara diferenciación entre genotipos.

Las proteínas específicas (sistema ADH) permiten, por sus diferentes modelos isoenzimáticos, diferenciar los cultivares analizados.

Referencias bibliográficas

[1] MENKE, J.F.; SINGH, R.S.; QALSET, C.O.; JAIN, S.K. Protein electrophoresis aids cereal variety identification. 1973. En: ALMGARD, G.; CHAPMAN, D. *Swedish wheat cultivars distinguished by content of gliadins and isozymes J. Swedish Agric. Res*. 1977; 7: 137-142.

[2] AUTRAN, J.C. ; BOURDET, A. Identification de varietás de blé; establissement dün tablean general de determination fondé su le diagramme electrophoretigne des gliadines du grain. *Annales de l´Amelioration des Plantes.* 1975; 25: 277-301.

[3] BUSHUK, K.W.; ZILLMAN, R.R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. Apparatus, method and nomenclature. *Can J. Plant Sci.* 1978; 58: 505-515.

[4] COOKE, R.J. The characterisation and identification of crop cultivars by electrophoresis. Review. *Electrophoresis.* 1984; 5: 59-72.

[5] COOKE, R.J. Gel electrophoresis; role in agriculture. *Electrophoresis.* 1986; 203-217.

[6] GALUSSI, A. A. Contribución a la identificación de cultivares en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Aspectos morfofisiológicos. 1992. Tesis Ms.Sc. FCA UNCórdoba [inédita].

[7] GALUSSI, A.A.; SOLARI, R.M.; REINOSO, P.D.; ARGÜELLO, J.A.; ZIMMERMANN, L.R.; PEREIRA, E. *et al*. *Manual de caracterización de cultivares de trigo y arroz. Análisis de semillas y plántulas.* Paraná: Universidad Nacional de Entre Ríos; 1996.

[8] DU CROS, D.L.; WRIGLEY, C.W. Improved electrophoretic methods for identifying cereal varieties. *J. Sci. Food Agric.* 1979; 30: 785-794.

[9] BHOWMIK, A.; OMURA, T.; KUMAMARU, T. Screening of rice varieties for endosperm storage proteins. *Plant Breeding.* 1990; 105: 101-105.

[10] DE PRINS, H. C.; VAN DE WEGHE, L. Ryegrass cultivar identification using electrofocusing on polyacrilamide gels. *Seed Sci. and Tech*. 1983; 11: 257-266.

[11] GALUSSI, A.A.; REINOSO, P. D., CEVEDO, A.M.L.; MOYA, M.E. Caracterización de cultivares de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum* Lam. por electroforesis de las proteínas. *AgriSciencia.* 1997; XIV: 25-29.

[12] GARDINER, S.E.; FORDE, M.B.; SLACK, C.R. Grass cultivar identification by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. New Zealand. *J. Agric. Research.* 1986; 29: 193–206.

[13] GRENECHE, M.; LALLEMAND, J.; MICHAUD, O. Comparison of different enzyme loci as a mans of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. *Seed Sci. and Tech*. 1991; 19: 147-158.

[14] LALLEMAND, J.; MICHAUD, O.; GREENECHE, M. Electrophoretical description of ryegrass varieties: a catalogue. *Plant Varieties and Seeds.* 1991 ; 4: 11-16.

[15] MOYA, M.E; GALUSSI, A.A.; REINOSO, D.P. y SOLDÁ, G.I. Caracterización varietal de *Avena sativa* L. y *Avena byzantina* C. Koch. por electroforesis de aveninas y proteínas totales en semillas. *Revista Científica Agropecuaria.* 2002; 6: 41 - 47.

[16] ISTA-International Seed Testing Association. *Handbook of Variety Testing. Electrophoresis testing*. Zurich ; 1992.

[17] MORALES, M.R.; CRESPO, M.C. Variation of PGM and IDH isozimes for identification of alfalfa varieties. *Euphytica.* 1999; 112:137-143.

[18] TIGIER, H. A.; DE FORCHETTI, S. M.; MEDINA, M. I.; VALPUESTA, V.; QUESADA, M. A. Isoperoxidases from soybean and alfalfa to

peach and tomato. *Plant Peroxidase Newsletter,* 3; 1994. Disponible en: <http://www.unige.ch/LABPV/newsletters/newslet3.html> [febrero 1994].

[19] VALIZADEH, M. storage protein profile of grain legumes grown in Iran, using SDS-PAGE. *J. Agric. Sci. Technol*. Seed. 2001; 3: 287-292.

[20] ISTA International Seed Testing Association International Rules for Seed Testing. *Seed Sci. and Tech*. 1999; 27 Supplement.

[21] INFOSTAT. InfoStat, versión 1.1. *Manual del Usuario*, Grupo Infostat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, 1ra edición. Córdoba: Ed.Brujas; 2002.

[22] JACCARD (1908). Nouvelles recherches sur ls distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci*. Nat.44 223-270. En: SAMEC, P.; POŠVEC. Z.; STEKJASKAL, J.; NAŠINEC, V.; GRIGA, M. Cultivar identification and relattionships in *Pisum sativum* L. Based on RAPD and isoenzime. *Biologia Plantarum.* 1998*;* 41 (1): 39 – 48.

[23] AOSA-Association of Official Seed Analysts. *Cultivar Purity Testing Handbook*. Itahaca: Ed. AOSA; 1991.