

Identificación de cultivares de *Lotus* spp. por análisis de proteínas seminales

A. A. GALUSSI, P. D. REINOSO, L. R. ZIMMERMANN, G. I. SOLDÁ & L. M. LUI

Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Entre Ríos
CC N° 24 (3.100) Paraná Entre Ríos República Argentina
cultivar@fca.uner.edu.ar

GALUSSI, A. A., P. D. REINOSO, L. R. ZIMMERMANN, G. I. SOLDÁ & L. M. LUI. 2006. Identificación de cultivares de *Lotus* spp. por análisis de proteínas seminales. *Rev. Fac. Agron.* 106 (1): 21-26.

El método de análisis electroforético de proteínas de reserva de las semillas ha sido aplicado para identificar especies y entradas del género *Lotus*. Los objetivos de este trabajo fueron validar el método electroforético de fraccionamiento de proteínas, establecer su confiabilidad y demostrar su utilidad para la diferenciación de 5 cultivares de 3 especies de *Lotus*. Para ello, se ensayaron diferentes tamaños muestrales de semillas y volúmenes de siembra. Se empleó electroforesis vertical en poliacrilamida desnaturalizante. Para cada cultivar se determinó el electroforegrama proteico característico. Se lograron fraccionar 39 bandas proteicas, de las cuales 24 mostraron diferencias en sus movilidades. Las bandas se registraron en una matriz de datos (presencia/ausencia), se realizó el análisis de agrupamiento usando el enlace promedio (1-Jaccard) como medida de disimilitud, representándose los datos a través de un dendrograma. Si bien a partir de 10 mg de semillas molidas y 10 µl de volumen de siembra se halló en cada cultivar un modelo electroforético típico, la cantidad de solución de extracción puede estar en el límite. Por ello resultó adecuada la diferenciación de los cultivares con un tamaño de muestra de 20 mg y 20 µl de volumen de siembra.

Palabras clave: *Lotus*, electroforesis, proteínas seminales, cultivares, identificación

GALUSSI, A. A., P. D. REINOSO, L. R. ZIMMERMANN, G. I. SOLDÁ & L. M. LUI. 2006. Cultivar identification in *Lotus* spp. by electrophoretic assessment of seed proteins. *Rev. Fac. Agron.* 106 (1): 21-26.

Electrophoresis of seed storage proteins has been applied to identify species and accessions of *Lotus*. The objectives of this work were to validate the electrophoresis method to discriminate total seed proteins, to establish its reliability and to demonstrate its effectiveness for the differentiation of 5 cultivars belonging to 3 species of *Lotus*. Diverse seed sample sizes and load volumes were essayed. Vertical electrophoresis was carried out at 45 mA/60 mA. Then the gels were treated with a water solution of ethanol/acetic acid /PAGE Blue. A pattern of protein bands for each cultivar was obtained (electrophoregram). The lotus seed storage proteins were electrophoretically separated in 39 bands; 24 of them showed qualitative differences. The protein bands were recorded on a data matrix according to their presence or absence, cluster analysis (1 – Jaccard) was carried out and finally a dendrogram was obtained. Though a typical electrophoretic model for each cultivar was found using samples of 10 mg of milled seeds and 10 µl of load volume, the amount of extraction solution may be in the limit. This is the reason why cultivar differentiation using samples whose sizes were 20 mg milled seeds and 20 µl load volume finally resulted the most adequate.

Key words: *Lotus*, electrophoresis, seed proteins, cultivars, identification

INTRODUCCIÓN

La identificación de cultivares es muy difícil y bastante difícil la diferenciación de especies por caracteres morfológicos. En *Lolium*, *Festuca* y *Lotus* se ha empleado para tal fin el análisis de proteínas seminales con resultados favorables (Gardiner *et al.* 1986; Galussi *et al.*, 1997). Estas especies son de polinización cruzada y la uniformidad y estabilidad del electroforegrama proteico seminal, se obtiene mediante el análisis de la molienda de un grupo de semillas lo suficientemente grande que represente el polimorfismo proteico del cultivar (Gardiner *et al.*, 1986). En *Lotus* spp., la mayor proporción de las proteínas seminales son del tipo globulinas, denominadas leguminas (Sammour *et al.*, 1993), poseen un coeficiente de sedimentación de 11S, y son solubles en soluciones salinas (Osborne, 1924; Shewry, 1995). El fraccionamiento proteico masal en medio desnaturizante de semillas obtenido por SDS PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio), permitió diferenciar seis especies del género *Lotus* y 2 cultivares de *Lotus corniculatus* L. «trébol pata de pájaro» (Sammour, 1991). Ferrari *et al.* (1995) y Pallares *et al.* (2000), comunicaron diferencias a nivel de especies y entradas de *Lotus corniculatus* y *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Willd. (syn. *Lotus glaber* Mill.) «trébol pata de pájaro tenue». En estos últimos casos el peso de semillas molidas para obtener la muestra proteica fue de 40-80 mg y 2 g, respectivamente. En Argentina se cultivan *L. corniculatus* (tetraploide), *L. tenuis* (diploide) y *Lotus subbiflorus* Lag. (syn. *L. suaveolens* Pers.) (tetraploide), con un escaso número de cultivares y visualmente no es posible distinguirlos entre sí a nivel de semillas. Establecer el tamaño de muestra mínimo representativo de la variabilidad presente en un cultivar para su identificación mediante el electroforegrama de proteínas resulta fundamental para estandarizar una metodología y facilitar la repetibilidad de los resultados; por otro lado, conocer el perfil pro-

teico de cada cultivar permitiría reconocer las posibles diferencias entre ellos.

Por estas razones en este trabajo, se establecieron los siguientes objetivos: 1. validar el método de fraccionamiento proteico (SDS-PAGE) utilizado para diferenciar especies del género *Lotus*, entendiéndose por validación la utilidad de esta técnica, analizando diferentes tamaños muestrales y emplearla en cultivares sembrados en Argentina; 2. establecer la repetibilidad de los resultados y, 3. demostrar la posible diferenciación entre los cultivares ensayados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas provenientes de muestras globales de 450 g de lotes puros de 5 cultivares registrados del género *Lotus*: *L. corniculatus* cv. INIA Draco (peso de 1000 semillas = 1,24 g); *L. tenuis* cvs: Pampa INTA (peso de 1000 semillas = 0,95 g), Toba (peso de 1000 semillas = 0,95 g) y Tresur Chajá (peso de 1000 semillas = 1,26 g) y *L. subbiflorus*: cv. El Rincón (peso de 1000 semillas = 0,52 g).

Extracción de proteínas seminales

Para la extracción de las proteínas de almacenamiento de las semillas se usó una solución de buffer concentrado (Tris ClH pH 6,8, glicerol, SDS y Azul de bromofenol), mercaptoetanol, dimetilformamida y agua, en relación 17:6:10:17 (ISTA, 1999) coincidiendo ésta, con leves modificaciones, con la usada por Pallares *et al.* (2000) para *Lotus*. Las muestras se agitaron y se dejaron 1 hora a temperatura ambiente, luego se calentaron durante 10 minutos en baño de agua hirviendo. Se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 18000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se utilizó para la muestra de corrida.

Fraccionamiento por electroforesis en SDS PAGE

La electroforesis (Laemmli, 1970) se lle-

vó 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 3 g de TrisHCl, 14,1 g de glicina y 1 g de SDS por litro de solución. Se empleó una intensidad constante de 45 mA en el gel superior y 60 mA constantes en el gel inferior. La temperatura de corrida fue de 15 - 20°C, con una duración de la electroforesis de 4 - 5 horas.

Los geles se trataron con solución acuosa de fijación (etanol 40 % v/v y ácido acético al 15% v/v con PAGE blue al 1% p/v en solución metanólica, en una relación de volúmenes 200 ml/10 ml de las soluciones por gel). Posteriormente los geles se lavaron con agua destilada, se secaron y guardaron en heladera para su evaluación.

Ensayo de validación

Para la validez de la técnica se analizaron los cultivares de *Lotus tenuis*: Pampa INTA y Tresur Chajá. De cada cultivar se molieron 3, 2, 1, 0,5 y 0,25 g de semillas, realizándose la extracción de proteínas totales sobre alícuotas en cada muestra de trabajo de 60, 40, 20 y 10 mg de harina; por otro lado, se molieron 60, 40, 20, 10 mg de semillas (muestras de trabajo). En ambos casos se utilizó un buffer de extracción en una relación de 1 ml por cada 80 mg de molienda. La electroforesis de las muestras de trabajo se efectuó sobre 20, 15 y 10 µl del extracto de proteínas, con 20 repeticiones dispuestas en 4 geles; para la evaluación comparativa de los electroforegramas se consideró el número, posición e intensidad de las bandas presentes.

Ensayo de confiabilidad y diferenciación

Para determinar la confiabilidad de la técnica y su capacidad de diferenciación de los cultivares se analizaron 60 muestras de trabajo de los cinco cultivares, de acuerdo al tamaño muestral definido en el ensayo de validación, sembrándose en la calle media de

cada gel proteínas marcadoras de pesos moleculares conocidos (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).

Para la comparación entre los perfiles proteicos de los cultivares, se analizaron en un mismo gel todos los cultivares, repitiendo el ensayo tres veces, registrándose en cada cultivar el número y posición de las bandas en el gel y el electroforegrama proteico típico. Finalmente, con los proteinogramas obtenidos a partir de los geles de comparación entre cultivares, se construyó una matriz de datos, asignando 1 a las bandas presentes y 0 a las ausentes. Tales datos se procesaron con el programa Infostat (2002) mediante análisis de asociación con el método de encadenamiento promedio (UPGMA). El coeficiente de disimilitud entre cultivares se calculó de acuerdo a Jaccard (1908).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de validación

Se halló uniformidad de los componentes proteicos en las distintos tamaños de muestras de trabajo analizados para los dos cultivares ensayados (Pampa INTA y Tresur Chajá). A modo de ejemplo, en la Figura 1 se presentan los perfiles proteicos del cultivar Tresur Chajá, obtenidos por la electroforesis de 10 µl de muestra. En éste, similar a los otros cultivares, no se evidenciaron diferencias entre los proteinogramas de iguales alícuotas de harina, provenientes de diferentes tamaños de muestras de semillas. El menor tamaño de muestra para la extracción proteica (10 mg de semillas o harina, en 0,125 ml de solución de extracción y electroforesis de 10 µl de muestra) manifestó todas las bandas proteicas que se hallaron en los mayores tamaños. Sin embargo, considerando el volumen de la solución de extracción, la posibilidad de almacenamiento de la misma para posibles repeticiones y el

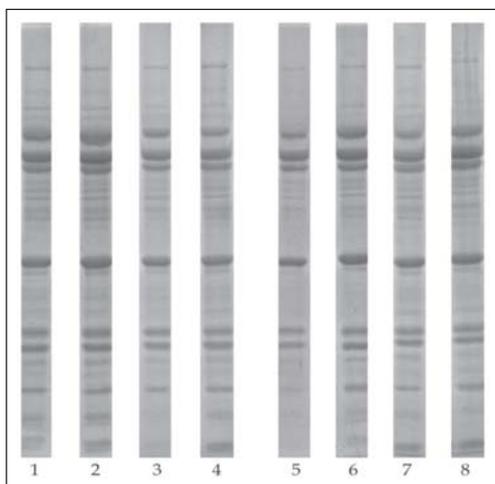


Figura 1. Electroforegrama de proteínas seminales de semillas de *Lotus tenuis* cv. *Tresur Chajá* determinados por SDS PAGE en alícuotas de harina provenientes de la molienda de 1 g de semillas (calles 1: 60 mg, 2: 40 mg, 3: 20 mg, 4: 10 mg) y las molendos de harina de semillas de 60 mg, 40mg, 20 mg y 10 mg (calles 5, 6, 7 y 8)

Seed protein electrophoretic profile of *Lotus tenuis* cv. *Tresur Chajá* determined using SDS PAGE in aliquot samples of meal obtained from 1 gram seed milling (tracks 1: 60 mg, 2: 40 mg, 3: 20 mg, 4: 10 mg) and seeds meal of 60 mg, 40mg, 20 mg y 10 mg (tracks 5, 6, 7 and 8)

fraccionamiento obtenido, se optó por ensayar la confiabilidad de la técnica y la diferenciación de los cinco cultivares utilizando un tamaño muestral de 20 mg, que incluyó 13 a 42 semillas (según el peso de las semillas de cada cultivar), en 0,25 ml de buffer de extracción. Considerando la nitidez de las bandas presentes, el volumen de siembra seleccionado fue de 20 µl.

Ensayo de confiabilidad y diferenciación

Analizando los electroforegramas en los cinco cultivares se detectaron 39 componentes proteicos de los cuales 24 son discriminantes entre cultivares (Tabla 1). El número de componentes hallados fue para *L. corniculatus* cv. INIA Draco: 29, en *L. glaber* cvs.: Pampa INTA: 26, Toba: 24 y Tresur Chajá: 25 y en *L. subbiflorus* cv. Rincón: 25 bandas. En tanto Pallares *et al.* (2000) comunica 18 bandas en *L. corniculatus* y 22 en *L. glaber* con SDS PAGE utilizando minigeles.

La mayor proporción de componentes proteicos discriminantes entre cultivares se observó en la zona entre 66 kDa y 45 kDa. Las

Tabla 1. Registro de bandas observadas en los perfiles proteicos (SDS PAGE) de semillas de cinco cultivares de *Lotus* spp.

Record of the bands observed in the protein profiles (SDS PAGE) of seeds of five *Lotus* spp. cultivars.

N° banda	97								66										45					30					20		14.6															
	1	2	3	4	5	kDa	6	7	8	9	10	kDa	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	kDa	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	kDa	33	34	35	36	37	38	kDa	kDa	39	
Cultivares																																														
INIA Draco	1	1	1	1	1	P.M.	1	1	1	1	1	P.M.	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1																								
Pampa INTA	0	1	1	0	1		1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	1	0	0	0	0																								
Tresur Chajá	0	1	1	0	1		1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	0	1	0	0																								
Toba	0	1	1	0	1		1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	0	1	0	0																								
Rincón	1	0	1	0	1		1	0	1	1	1		1	0	0	0	1	0	0	1	0	0																								
Ancho de banda (mm)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5		0,5	0,5	0,5	0,5	0,3		2,0	4,0	4,0	3,0	0,5	2,0	0,5	1,2	2,0	0,5																								

1: Presencia. 0: Ausencia. P.M.: Proteína Marcadora.
1: Presence, 0: Absence. P.M.: Protein Marker

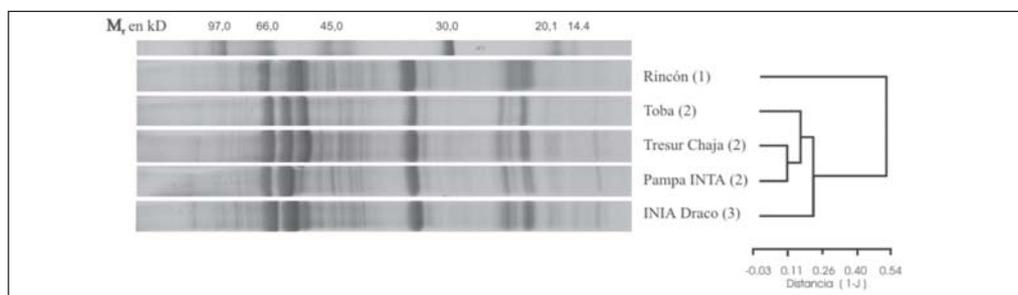


Figura 2. Electroforegrama de proteínas seminales de 5 cultivares de *Lotus* spp. determinados por SDS PAGE y su dendrograma obtenido por encadenamiento promedio (ccc: 0,982) (1: *Lotus subbiflorus*; 2: *L. otus glaber*; 3: *Lotus corniculatus*).

Seed protein electrophoretic profile of five *Lotus* spp. cultivars determined using SDS PAGE and its dendrogram obtained by the average linkage method (UPGMA; ccc: 0,982) (1: *Lotus subbiflorus*; 2: *L. otus glaber*; 3: *Lotus corniculatus*).

bandas 16, 18, 23, 33 y 34 fueron discriminantes en los cultivares Pampa INTA, Toba y Tresur Chajá (Tabla 1). Las bandas 17 y 20 (Tabla 1) manifestaron con nitidez la diferencia entre los cultivares analizados de *L. glaber* y *L. corniculatus*.

L. subbiflorus (cv Rincón) manifestó en su perfil proteico 7 bandas presentes y 7 ausentes que lo diferencia de los cultivares de las otras dos especies.

El dendrograma logrado por el encadenamiento promedio (coeficiente de correlación cofenética: ccc: 0,982) mostró la disimilitud entre cultivares (Figura 2). En él se observa un primer agrupamiento representado por dos cultivares muy similares: Tresur Chajá y Pampa INTA (distancia: 0,11) que se integra seguidamente a Toba (distancia: 0,22). Estos tres cultivares pertenecen a *Lotus glaber*. INIA Draco (*Lotus corniculatus*) se integra a una distancia de 0,16. Finalmente Rincón (*Lotus subbiflorus*) fue el cultivar con mayor número de bandas distintas (1-J = 0,54). Si la línea de corte en el dendrograma se traza a nivel de una magnitud de distancia del 50 % de la distancia máxima (criterio frecuentemente utilizado), todos los genotipos se habrían clasificado (excepto Rincón) en un mismo grupo. Aún así, las bandas discriminantes entre cultiva-

res fueron observadas en las repeticiones efectuadas.

La discriminación potencial en esta especie y sus cultivares podría mejorarse si se aplicara más de una clase de métodos de separación por electroforesis y/o por el estudio de diferentes fracciones de proteínas o por el análisis de isoenzimas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ferrari, L. & I. Pallares.** 1995. P.A.G.E. of storage proteins to identify seeds of *Lotus tenuis* and *Lotus corniculatus*. Lotus Newsletter 26: 21-23.
- Galussi, A. A.; A. Cevedo; P. D. Reinoso & M. E. Moya.** 1997. Caracterización de cultivares de *Lolium perenne* L. y *Lolium multiflorum* Lam. por electroforesis de las proteínas de las semillas. AgriSciencia, 14: 25-29.
- Gardiner, S. E., M. B. Forde & C. R. Slack.** 1986. Grass cultivar identification by sodium dodecylsulphate polyacrilamide gel electrophoresis. New Zeland Journal of Agricultural Research, 29: 193-206.
- Infostat.** 2002. Infostat Version 1.1. FCA Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- ISTA** 1999. Seed Science and Technology, 27, Supplement, International Rules for Seed Testing.
- Jaccard, P.** 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles. Lausanne. 44: 223-

- 270.
- Laemmli, U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. London, 227: 680-685.
- Osborne, T. B.** 1924. *The vegetable proteins*. Longmans, Green & Co., London.
- Pallares, I. N., L. Ferrari & M. N. Ritta.** 2000. Storage proteins in *Lotus tenuis* and *Lotus corniculatus* seeds by P.A.G.E. *Seed Science and Technology*, 28 (3): 769-792.
- Sammour, R. H.** 1991. Using electrophoretic techniques in varietal identification, biosystematic analysis, phylogenetic relation and genetic resources management. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 4: 221-226.
- Sammour, R. H., M. A. Hamoud, A. S. Haidar & A. Badr.** 1993. Electrophoretic analysis of the seed proteins of some species in Genus *Lotus*. *Feddes Repertorium*: 104: 251-257.
- Shewry, P. R.** 1995. Plant storage proteins. *Biological Reviews*. Cambridge Philosophical Society (London) 70: 375-426.