

# Caracterización de cultivares de *Lolium perenne* L. y *Lolium multiflorum* Lam. por electroforesis de las proteínas de las semillas

Galussi, A. A., A. Cevedo, P. D Reinoso y M. E. Moya

## RESUMEN

Se evaluaron cultivares de *Lolium multiflorum* Lam. y *Lolium perenne* L. mediante la técnica de SDS-PAGE de las proteínas de las semillas. Por cultivar se analizaron 60 muestras provenientes de un mismo lote de semillas remitidas por los criaderos. El fraccionamiento de las proteínas fue nítido, con un total de 77 componentes proteicos de diferente movilidad, muchos de ellos comunes a todos los cultivares pero presentando cada cultivar un modelo electroforético determinado. Para la comparación de los patrones proteicos, se registró la presencia o ausencia de bandas y no la intensidad de ellas, lo que permitió la discriminación de los cultivares estudiados.

**Palabras clave.** Semillas, *Lolium multiflorum* Lam., *Lolium perenne* L., SDS-PAGE, cultivares argentinos.

Galussi, A. A., A. Cevedo, P. D Reinoso y M. E. Moya, 1998. Characterization of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam. cultivars by electrophoresis of seed proteins. Agriscientia XIV : 25-29.

## SUMMARY

Seed proteins of *Lolium multiflorum* and *Lolium perenne* cultivars have been evaluated by means of SDS-PAGE technique (Sodium dodecyl sulphate-poliacrylamide gel electrophoresis). Sixty samples from each original plot were analyzed. Protein banding was sharp, seventy-seven protein compounds with different mobilities have been found. Every cultivar showed a well characterized electrophoretic pattern. The cultivars under evaluation were differentiated using the comparison among the different electrophoretic patterns regarding bands presence or absence, but not their respective intensities.

**Keywords.** Seeds, *Lolium multiflorum* Lam., *Lolium perenne* L., SDS-PAGE, Argentinean cultivars.

Galussi, A. A., A. Cevedo, P. D Reinoso y M. E. Moya. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. CC.24 (3100) Paraná, Entre Ríos, República Argentina. e-mail: cultivar@fca.uner.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

*Lolium* es un género con varias especies cultivadas y naturalizadas en regiones templadas de todo el mundo (Burkart, 1969). Las especies *Lolium multiflorum* Lam. (raigrás anual) y *Lolium perenne* L. (raigrás perenne) y sus cultivares están ampliamente difundidos por su excelencia forrajera invernal y primaveral, pero su alogamia y la coincidencia de sus períodos de floración permiten el cruzamiento entre ambas. Esto, sumado a las mezclas mecánicas y a la semejanza morfológica de sus antecios ocasionan problemas cuando se desea realizar la verificación de las especies y sus cultivares a nivel de semilla, siendo necesaria su caracterización.

De las técnicas que se han investigado para distinguir cultivares de raigrás anual y raigrás perenne y sus cultivares, aquellas que son poco influenciadas por el ambiente como las bioquímicas han mostrado ciertas ventajas, tales como el enfoque isoelectrónico y la electroforesis en geles de almidón y de poli(acrilamida), ya sea de enzimas foliares o proteínas de las semillas (Kranski & Bula, 1970; Nakamura, 1979; Gilliland *et al.*, 1982; De Prins & Van De Weghe, 1983; Cooke, 1984; Ferguson & Grabe, 1984, 1986; Gardiner *et al.*, 1986; Gardiner & Forde, 1987; Greneche *et al.*, 1991; Lallemand *et al.*, 1991; Moller & Spoor, 1993; Galussi *et al.*, 1996).

Cabe señalar que no se conocen antecedentes en nuestro país sobre el uso de técnicas bioquímicas en semillas que caractericen los cultivares de raigrás inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares.

La técnica electroforética que la International Seed Testing Association propone en sus Reglas (ISTA, 1993) para la verificación de la especie y/o cultivar de lotes de semillas de *Lolium* spp es la de sodium dodecyl sulphate - electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS - PAGE). El objetivo de este trabajo fue el de obtener mediante dicha técnica los patrones de proteínas característicos de cultivares de *Lolium multiflorum* Lam. y *Lolium perenne* L. registrados en la República Argentina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron antecios de nueve cultivares de raigrás, tres anuales: Progrow, Concord y El Resero MAG, y seis perennes: Ceciliol, El Cencerro, Lindor, Droughtmaster, Marathon y Quichua, provenientes todos de lotes puros.

### Electroforesis de las proteínas

Para caracterizar cada cultivar se analizaron 60 muestras provenientes de un mismo lote, observándose el número de componentes proteicos y su movilidad. Ésta se determinó midiendo con una escala milimétrica la distancia desde el inicio del gel inferior hasta el lugar donde migró y fijó el componente. Se determinó la desviación standard de las bandas ubicadas a 25, 102 y 145 mm sobre 60 calles de un mismo cultivar (Droughtmaster).

Para la comparación entre cultivares se los analizó conjuntamente contrastando los proteinogramas de cada cultivar en un mismo gel en el que se incluyeron proteínas marcadoras LMW (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, BIO-RAD, 161-0304).

El método sodium dodecyl sulphate - electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) se llevó a cabo con un equipo vertical Bio-Rad "Protean II", con un gel superior de poli(acrilamida) al 5 %C, pH 6,8 y un gel inferior al 12,5 %C, pH 8,8 (ISTA, 1993).

Las muestras (0,2 g de antecios/muestra/cultivar) se molieron en mortero de porcelana. Para la extracción de proteínas el material de molienda se colocó en tubos Eppendorf a los que se añadieron 2,5 ml de buffer de extracción por tubo (buffer de extracción: a) buffer de extracción concentrado (Tris-HCl pH 6,8; glicerol, SDS y Azul de Bromofenol según metodología ISTA (1993), b) mercaptoetanol; c) dimetilformamida y d) agua, en relación 17 : 6 : 10 : 17). Se taparon los tubos y luego de una breve agitación mecánica para lograr la homogeneización, se dejaron las muestras con el buffer de extracción, en reposo, a temperatura ambiente, durante 1 hora. La extracción se completó colocando los tubos en baño María (95°C) durante 10 minutos.

Una vez llegadas a temperatura ambiente, se centrifugaron a 9000 r.p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante fue trasvasado pudiendo ser almacenado a 4 °C durante no más de 48 hs hasta el momento de la siembra (Ferguson & Grabe, 1986).

Se sembraron 15 µl de extracto de la muestra por calle. La electroforesis se realizó con una intensidad de corriente total de 60 mA y un voltaje total de 700 voltios y el tiempo de corrida aproximado fue de 5 horas.

Para la fijación de las proteínas se utilizó una solución acuosa de metanol (40% v/v) y ácido acético glacial (10% v/v), agitando durante una hora. Luego se lavaron los geles con agua agitando durante 5 minutos y se procedió a la tinción con áci-

do acético al 15 % v/v, solución acuosa y PAGE Blue al 1% p/v en metanol durante 24-48 horas (200 ml solución de ácido acético, 10 ml de solución de Page Blue por gel)

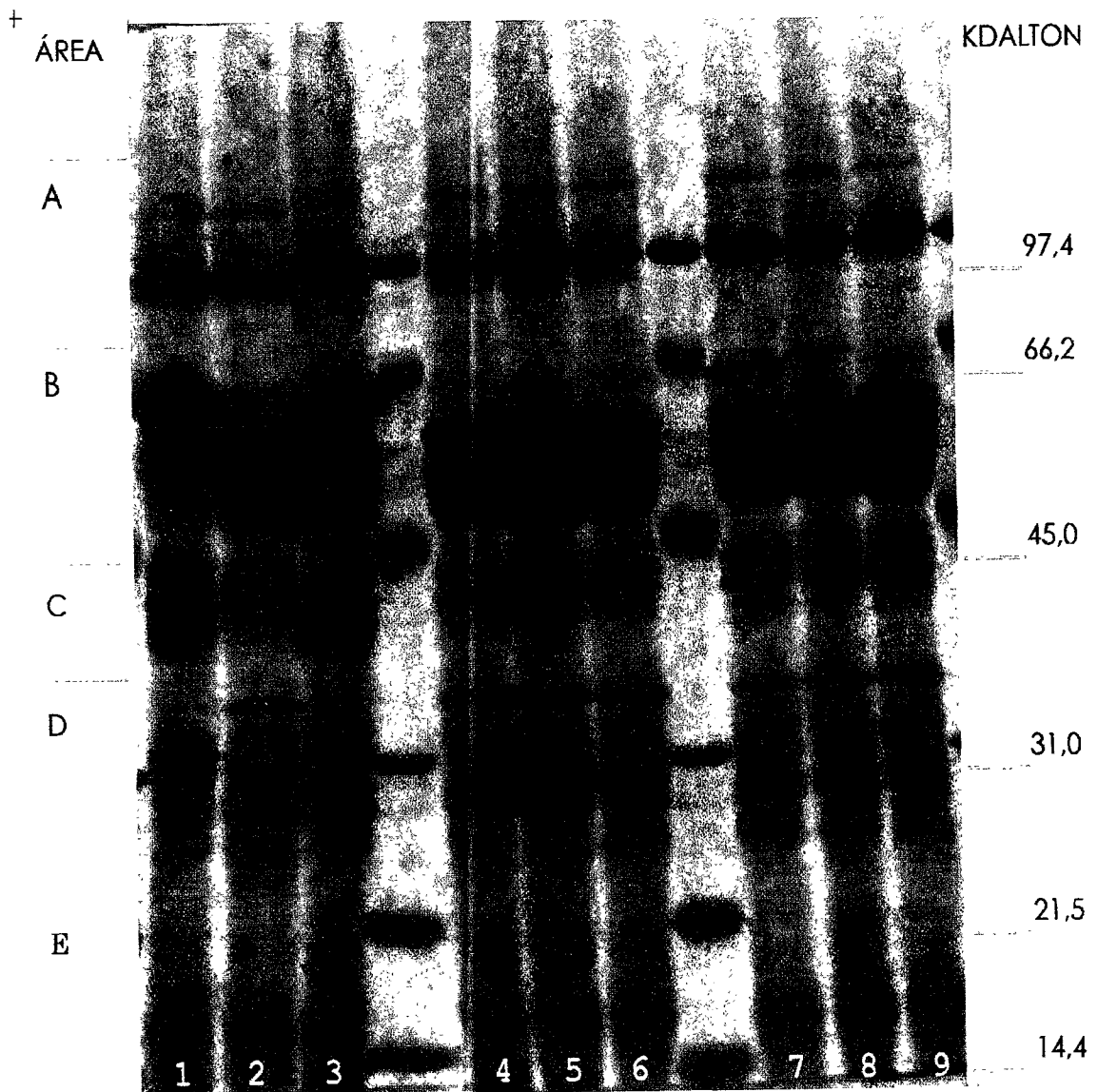
Posteriormente fueron lavados con agua destilada durante 2 o 3 horas quedando listos para su lectura.

No se consideró a la intensidad de las bandas con la misma movilidad como un carácter discrimi-

natorio entre cultivares, dado que la observación fue visual y no por densitometría

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los patrones proteicos discriminaron los nueve cultivares estudiados, lo que indica la utilidad de ésta técnica para el material evaluado. Esto coincide con lo demostrado por otros investigadores que ana-



**Figura 1.** Electroforegrama de proteínas totales de *Lolium* spp. Método SDS-PAGE ISTA (1993) Cultivares de *L. multiflorum* 1) Progrow, 2) Concord, 3) El Resero MAG Cultivares de *L. perenne* 4) Ceciliol, 5) El Cencerro, 6) Lindor, 7) Droughtmaster, 8) Marathon, 9) Quichua Se incluyen, para comparación LMW standard (phosphorylase b, 97,4, Bovine serum albumin, 66,2, Ovalbumin, 45,0, Carbonic anhydrase, 31,0, Soybean trypsin inhibitor, 21,5 y Lysozyme, 14,4 kilodalton)

lizaron cultivares de la misma especie (Nakamura, 1979; Ferguson & Grabe, 1984, 1986; Gardiner *et al.*, 1986; Gardiner & Forde, 1987; Moller & Spoor, 1993)

En las 60 muestras analizadas por cultivar se obtuvo un mismo patrón electroforético, encontrándose leves variantes manifestadas por la presencia o ausencia de bandas débiles, variabilidad que podría atribuirse a la alogamia del género y/o al método de extracción.

En el cultivar Droughtmaster la banda ubicada a 25 mm tuvo un desvío standard de 0,44; en tanto las bandas ubicadas a 102 mm y a 145 mm presentaron un desvío standard de 0,45 y 0,48, valores éstos que manifiestan escasa variabilidad intra e intergeles de la movilidad proteica.

En la Figura 1 se puede observar el electroforegrama de las proteínas totales de los cultivares anuales y perennes de raigrás evaluados. Para un mejor análisis se establecieron 5 áreas (A, B, C, D y E) y su correlación con las bandas de las proteínas marcadoras.

La cantidad total de componentes proteicos separados fue de 77. El cultivar anual El Resero presentó el mínimo de componentes, 34 en total, y los cultivares Progrow (anual) y Droughtmaster (perenne) el máximo, con 48.

Los cultivares anuales Progrow, Concord y El Resero MAG, pudieron diferenciarse claramente uno de otro y del resto de los cultivares, presentando el primero de los citados un mayor número de bandas en el área A. El Concord presentó mayor número de componentes proteicos que lo asemejan a los proteinogramas de los cultivares perennes. El mismo cultivar, evaluado por el test de fluorescencia, dio un elevado porcentaje de plantas no fluorescentes (99 %) coincidiendo también con el comportamiento de los cultivares perennes (Galussi *et al.* 1998). Casos similares a este comportamiento fueron citados por Ferguson & Grabe (1984) y Gardiner *et al.* (1986).

Los cultivares perennes Droughtmaster, Marathon y Quichua muestran diferencias principalmente en la zona B, mientras que Ceciliol, El Cencerro y Lindor, se diferencian por la presencia o ausencia de algunas bandas en la zona del gel comprendida entre los 66,2 y 31 kdalton.

## CONCLUSIONES

A través de la técnica de electroforesis en gel de poliácridamida con SDS los cultivares estudiados manifestaron clara diferenciación entre los modelos

electroforéticos hallados, permitiendo su caracterización. Los cultivares con mayor similitud en sus electroforegramas fueron Concord y Droughtmaster, en tanto los cultivares Progrow y El Resero MAG fueron los que presentaron mayores diferencias en la configuración de los electroforegramas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo surge del PID-UNER 2037 subvencionado por la Universidad Nacional de Entre Ríos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Burkart, A., 1969. Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Parte II: Gramíneas. La Familia Botánica de los Pastos. Colección Científica del I.N.T.A., Tomo VI, II. 551 pp.
- Cooke, R.J., 1984. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. *Electrophoresis*, 5, 59-72.
- De Prins, H.C. and L. Van De Weghe, 1983. Ryegrass cultivar identification using electrofocusing on polyacrylamide gels. *Seed Science and Technology*, 11, 257-266.
- Ferguson, J.M. and D.F. Grabe, 1984. Separation of annual and perennial species of ryegrass by gel electrophoresis of seed proteins. *Journal of seed technology*. Volume 9, number 2, 137-149.
- Ferguson, J.M. and D.F. Grabe, 1986. Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. *Crop Science*, vol. 26, 170 - 176.
- Galussi, A.A., R. Solari, P.D. Reinoso, J.A. Argüello, L.R. Zimmermann, S. Pereyra, M.E. Moya, R.D. Montesino, A.M.L. Cevedo, F.G. Marchese y C.E. Romero, 1996. Manual de caracterización de cultivares de trigo y arroz. Análisis de semillas y plántulas. FCA. UNER. ISBN 950-698-031-4.
- Galussi, A.A., L.R. Zimmermann, F. Marchese, A. Cevedo, 1998. Characterization of *Lolium multiflorum* Lam. and *Lolium perenne* L. cultivars by the fluorescence test. Abstract of ISTA Seed Symposium. Pretoria. South Africa. 25th Seed Testing Congress. p.81
- Gardiner, S.E., M.B. Forde and C.R. Slack, 1986. Grass cultivar identification by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 29, 193-206.
- Gardiner, S.E. and M.B. Forde, 1987. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of grass seed proteins: a method for cultivar identification of pasture grasses. *Seed Science and Technology*, 15, 663 - 674.
- Gilliland, T.J., M.S. Camli, and C.E. Wright, 1982. Evaluation of phosphoglucoisomerase allozyme electrophoresis for the identification and registration of cultivars of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) *Seed Science and Technology*, 10, 415 - 430.

- Greneche, M., J. Lallemand and O. Michaud, 1991. Comparison of different enzyme loci as a means of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. *Seed Science and Technology*, 19, 147 - 158.
- International Seed Testing Association (1993). International Rules for Seed Testing Rules 1993. *Seed Science and Technology*, 21, Supplement.
- Kranski, B. and R.J. Bula, 1970. Identification of Diploid and Tetraploid *Lolium* Cultivars Grown Under Controlled Environmental Conditions. *Crop Science*, Vol., 10
- Lallemand, J., O. Michaud and M. Greneche, 1991. Electrophoretic description of ryegrass varieties: a catalogue. *Plant Varieties and Seeds*, 4, 11 - 16.
- Moller, M. and W. Spoor, 1993. Discrimination and identification of *Lolium* species and cultivars by rapid SDS - PAG electrophoresis of seed storage. *Seed Science and Technology*, 21, 213 - 223
- Nakamura, S., 1979. Separation of ryegrass species using electrophoretic patterns of seed proteins and enzymes. *Seed Science and Technology*, 7, 161 - 168.