

T39 -PRUEBA DE BENZIDINA. UNA HERRAMIENTA EFICAZ PARA LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL EN SOJA

R. M. Craviotto^{1*}; M. R. Arango Perearnau¹; M. S. Montero¹; C. Gallo¹
M. Moreno²; A. Almoño²

¹ INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Oliveros. Ruta Nacional 11 KM 353. Oliveros. Te. (03476)498010.

² INASE. Instituto Nacional de Semillas. Laboratorio Central. Paseo Colon 922. Bs. As.
cgallo@correo.inta.gov.ar, rcraviotto@arnet.com.ar*, marango@correo.inta.gov.ar
mimore@inase.gov.ar

Palabras clave: soja, pureza varietal, peroxidasas, benzidina

INTRODUCCIÓN

Para la identificación de cultivares de soja utilizados en la Argentina se dispone de diferentes herramientas de laboratorio. Algunas de estas técnicas requieren de la utilización de caracteres morfológicos presentes en la semilla, plántula y/o planta adulta. De tal manera que caracteres tales como color de hilo, esfericidad, lustre de tegumento, coloración de hipocótilo, forma de hoja, grado de pilosidad, color de flor, coloración y grado de pubescencia de vainas, constituyen entre otros los más importantes descriptores utilizados en el mundo con el objeto de identificar cultivares de la especie (IPGRI, 1984). Algunos de estos métodos exigen laboriosidad y/o tiempo en su ejecución, por lo que la determinación rápida de la genuinidad de un determinado cultivar problema no es sencilla. En la actualidad existen métodos más sofisticados que hacen uso no solo de caracteres morfológicos sino de indicadores de naturaleza bioquímica, tales como técnicas de Electroforesis y PCR que permiten una mayor aproximación en la identificación a nivel genético de los cultivares (ISTA, 2003) Estas técnicas no son de uso masivo y su ejecución necesita de equipamientos sofisticados, insumos costosos y personal altamente entrenado en la realización de las mismas. En la actualidad y en la Argentina la posibilidad de un trabajo rutinario en las citadas técnicas por parte de la inmensa mayoría de los laboratorios acreditados es escasa, por lo que no es posible solucionar problemas urgentes referidos a la identificación de muestras puntuales de semillas de soja. No obstante es de uso común la utilización de otra prueba bioquímica denominada de peroxidasas, que permite separar a los cultivares existentes en el mercado en dos grandes grupos (Craviotto y Montero, 1992). Estos grupos responden a la mayor o menor actividad de enzimas peroxidasas presentes en el tegumento de la semilla que se activan dando una reacción de coloración característica (Buzzell y Buttery, 1969). Como tal esta prueba constituye un método rápido y eficiente para solucionar determinados casos en los que se generan dudas acerca de la identidad de lotes de semillas que corresponden a cultivares que tienen reacciones a la peroxidasa nítidamente diferentes. Esta prueba se conduce utilizando al compuesto químico denominado Guayacol como sustancia donadora de hidrógeno que se oxida generando la reacción de coloración. La ejecución de esta prueba tiene una etapa sumamente lenta debido a la necesidad de la extracción de los tegumentos individuales de cada semilla y además deben extremarse los cuidados para que no quede ningún resto de la estructura de la semilla que interfiera en la reacción.

Algunos investigadores (Sahota y Desormeaux, 1997) han realizado la prueba de peroxidasas utilizando drogas que no requieren de la extracción de los tegumentos de las semillas y de esta manera se agiliza en forma considerable la ejecución del análisis.

El objetivo del estudio fue evaluar una técnica alternativa para la prueba de peroxidasas utilizando un compuesto químico denominado dihidrocloruro de benzidina que ofrezca un claro patrón de coloración que permita identificar altas y bajas actividades de las enzimas peroxidasas en semilla de soja.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Instituto Nacional de Semillas (INASE) proveyó las muestras de semilla pura de 13 cultivares comerciales de soja empleados en Argentina. El material se dividió en dos

submuestras de igual tamaño y cada una de las submuestras se analizaron en forma paralela en el Laboratorio de Semillas de la EEA Oliveros del INTA y el Laboratorio Central de Análisis de Semillas del INASE, mediante la técnica de benzidina. Este último laboratorio tuvo a su cargo además la realización de la prueba de peroxidasa por la técnica de guayacol en las mismas variedades.

Procedimiento para la prueba con Guayacol

Se utilizaron 100 semillas secas de cada cultivar a las cuales se les extrajo el tegumento cuidando que no quedaran restos de semilla (Foto 1). Se colocaron en tubos de ensayo a los que se les agregó 1 ml. de solución de Guayacol al 0,5% y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se adicionó sobre el tegumento de las semillas, en cada tubo de ensayo, una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1% y se observó la reacción alcanzada entre los 30 y 60 segundos. En los tubos de ensayo se visualizó la reacción alcanzada por la coloración de la solución (Foto 2).

Procedimiento para la prueba de Benzidina

Para la nueva técnica de benzidina se utilizó una solución acuosa al 0.04 % de dihidrocloruro de benzidina y agua deionizada (0,4 gr de benzidina en 1 litro de agua) y se le agregó 1 ml de peróxido de hidrógeno.

Se sumergieron 100 semillas enteras y secas de cada cultivar en la solución de benzidina + peróxido de hidrógeno, y se incubaron durante 4 horas a 40 C° de temperatura. Se utilizaron recipientes con tapa para evitar evaporaciones y de un volumen adecuado para que las semillas quedaran sumergidas totalmente en la solución durante todo el periodo del análisis.

Una vez transcurridas las 4 horas de incubación las muestras de semillas se retiraron de la solución de benzidina y se lavaron con abundante agua corriente. Luego de este enjuague se procedió a la evaluación de la actividad de las enzimas peroxidasa sobre las semillas enteras sumergidas en agua. El análisis se realizó a simple vista observando la coloración que presentaron las cubiertas seminales de las semillas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La técnica de identificación varietal a través de la prueba de peroxidasa permite dividir a los cultivares en dos grupos según la alta o baja actividad de enzimas peroxidasa presentes en los tegumentos de las semillas de soja (Foto 1). La técnica de peroxidasa tradicional con el uso del guayacol diferencia los cultivares por el color que desarrolla la solución donde se encuentra inmerso el tegumento de cada semilla. Cuando las semillas presentan baja actividad o reacción negativa la solución y los tegumentos quedan transparentes, mientras que con alta actividad o reacción positiva la solución y tegumentos desarrollan un color marrón rojizo oscuro (Foto 2)

En la técnica ensayada que utiliza la droga benzidina, las cubiertas seminales de las semillas que mostraron alta actividad de enzimas peroxidasa se tiñeron de color negro y los cotiledones quedaron de color amarillo característico de la semilla de soja. Por otro lado, en los cultivares que mostraron baja actividad de enzimas peroxidasa, las cubiertas seminales quedaron de color gris claro. Si bien los tegumentos quedaron de color gris claro los cotiledones se tiñeron de color oscuro uniforme (Fotos 3 y 4).

Los resultados obtenidos por ambos laboratorios se contrastaron con los resultados de la Prueba de Peroxidasa con uso del guayacol y se observó una alta correspondencia en los resultados (Cuadro 1). Esto permite la realización de la prueba de peroxidasa a través de la utilización de la benzidina con una muy buena posibilidad de diagnóstico de diferenciación de variedades a la vez que aporta ventajas relativas a la facilidad operativa, la rapidez de su realización y la elevado número de cultivares que pueden ser probados en un mismo período de tiempo.

Cuadro 1. Reacción de los cultivares ensayados por la Prueba de Peroxidasas mediante el uso de solución de guayacol y benzidina.

CULTIVAR	PRUEBA DE PEROXIDASAS	
	GUAYACOL	BENZIDINA
INTA PARANA 629	100 % (-)	100 % (-)
INTA PARANA 661	100 % (-)	100 % (-)
DON MARIO 4870	100 % (+)	100 % (+)
CHAMPAQUI 5.90	100 % (-)	100 % (-)
CHAMPAQUI 5.80	100 % (-)	100 % (-)
PIONEER 93B36	100 % (+)	100 % (+)
PIONEER 93B09	100 % (+)	100 % (+)
CHAMPAQUI 5.70	100 % (+)	100 % (+)
FN 3.60	30 % (-) 70 % (+)	50 % (-) 50 % (+)
DON MARIO RR 4-5-78-00	20 % (-) 80 % (+)	30 % (-) 70 % (+)
DON MARIO 4200	100 % (+)	100 % (+)
TJS 2139	100 % (+)	100 % (+)
A 6355	100 % (+)	100 % (+)

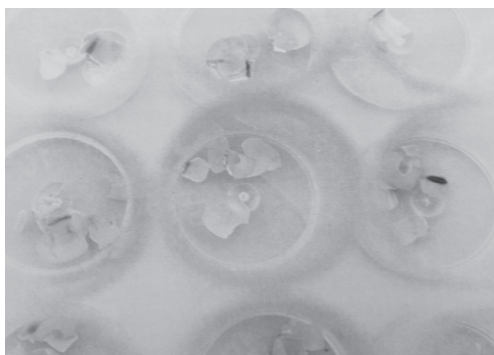


Foto 1. Tegumentos de semillas individuales

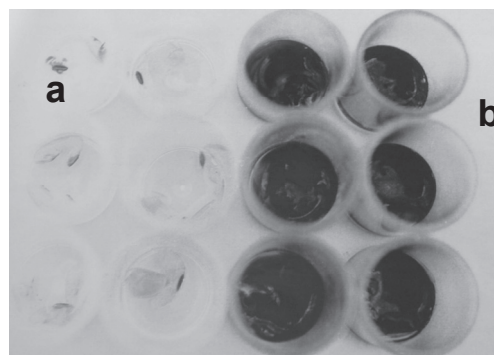


Foto 2 . Reacción con Guayacol.
a-Negativa. b- Positiva

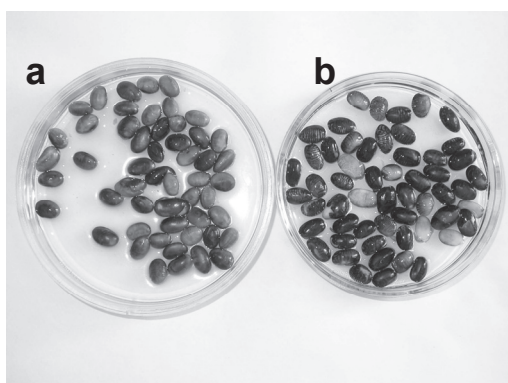


Foto 3. Prueba con Benzidina. a- Reacción
b- Reacción Positiva

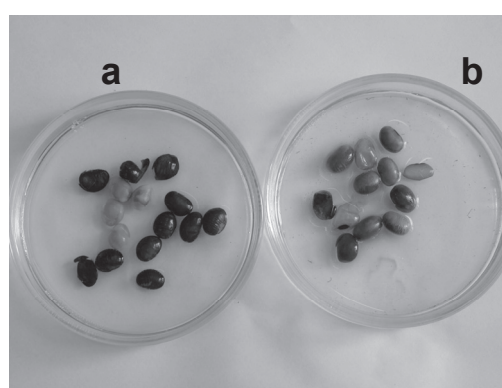


Foto 4. a- Tegumentos coloreados de Negativa.
negro. b- Tegumentos incoloros y cotiledones
teñidos

AGRADECIMIENTOS

A los auxiliares y analistas del Laboratorio de Semillas de la Estación Experimental Agropecuaria Oliveros y Laboratorio Central del INASE que contribuyeron a la realización del ensayo

BIBLIOGRAFÍA

- Craviotto, R. M.; Montero, M.S. 1992. XXIII ISTA Congress Symposium. Bs. As. Argentina. Abstracts N° 29. pag 58.
- Buzzell, R.I.; Buttery, B.R. 1969. Inheritance of peroxidasa activity in soybean seed coats. *Crop Science*, 9:387-388
- International Plant Genetic Resources Institute. IPGRI. 1884. Descriptors for soybean. Rome. Pag 50
- International Seed Testing Association (ISTA) . 2003. International Rules for Seed Testing. ISBN 3-906549-38-0 P.O. BOX 308, 8303 Basserdorf, CH- Switzerland, Suiza. 500 pp.
- Sahota, A.S.; Desormeaux, R.W. 1990. Soybean seed coat peroxidase activity test for cultivar purity determinations. *Newsletter of the Association of Official Seed Analysts*, Vol. 64, N° 2.