



CULTIVARES DE *PISUM SATIVUM* L. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SEMINALES TOTALES

PISUM SATIVUM L. CULTIVARS CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION BY ELECTROPHORESIS OF TOTAL SEED PROTEINS

Alicia M. L. Cevedo
Alberto A. Galussi
Lino M. Lui

Originales
Recepción: 03/02/2003
Aceptación: 10/09/2003

RESUMEN

Se realizó el estudio electroforético de proteínas seminales totales de 13 cultivares de arveja (*Pisum sativum* L.) en geles de poliacrilamida con Sodio Dodecil Sulfato. Se logró fraccionar 53 bandas proteicas, de las cuales 36 mostraron diferencias en sus movilidades. De esta manera se obtuvieron modelos electroforéticos diferentes para cada cultivar y mediante análisis de conglomerados (método UPGMA) se obtuvo un dendrograma que mostró la distinción entre cultivares en dicho carácter, permitiendo expresar las diferencias entre ellos.

SUMMARY

Electrophoretic study of reduced total seed proteins of 13 pea cultivars has been carried on polyacrylamide gels in the presence of Sodium Dodecyl Sulphate. The pea seed storage proteins were electrophoretically separated in 53 bands; 36 of them showed qualitative differences and allowed the characterization of the cultivars. Standard reference patterns of each cultivar were obtained on this basis. UPGMA analysis was performed on the gels and in the resulting dendrogram 12 clusters of different orders have been determined. Intervarietal differences were clearly expressed.

Palabras clave

Pisum sativum • cultivares • caracterización • electroforesis • proteínas seminales

Key words

Pisum sativum • cultivars • characterization • electrophoresis • seed proteins

INTRODUCCIÓN

En la República Argentina, país tradicionalmente productor de arveja, existen cerca de 60 cultivares comerciales de *Pisum sativum* L. (arveja) inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares. Históricamente se han utilizado variedades importadas y adaptadas (22, 35). La producción de los últimos 50 años se efectuó en base a un reducido número de cultivares, entre los que se destaca *Cobri*, con el que actualmente se cubre más del 95 % de la superficie dedicada a dicho cultivo (27). En esta especie, los caracteres seminales descriptivos (color y textura del tegumento y cotiledones, color del hilo, peso de 1000 semillas) permiten agruparlos pero no diferenciarlos entre sí con precisión y rapidez. Además de descriptores morfológicos, sanitarios y agronómicos, en la caracterización de cultivares de arveja se han empleado a nivel de semillas, las proteínas e isoenzimas y actualmente marcadores genéticos

como RAPD's, estudios de variaciones de ADN (que implican en algunos casos digestión con enzimas de restricción), amplificación de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y otras. Estos últimos métodos, aún no estandarizados o normalizados a nivel internacional, se han orientado a estudios filogenéticos (12, 25, 28), así como para buscar relaciones (linkages) que vinculen genes con resistencia a patógenos (7, 8, 34).

El análisis de las proteínas en las semillas por electroforesis ofrece un recurso para caracterizar y distinguir los cultivares de diferentes especies. Específicamente el método conocido como SDS-PAGE (18) permite detectar el polimorfismo de proteínas seminales de diversas especies tales como avena, trigo, semillas de forrajeras, café y algodón, con lo cual se logra identificar y discriminar cultivares. La estandarización y difusión de estas técnicas han tenido una evolución muy rápida: grupos de investigación y asociaciones nacionales e internacionales han comunicado diversas técnicas y ensayos para la caracterización de cultivares en el estadio de semillas y plántulas, los que han podido adaptarse sin mayores variantes al estudio de los cultivares inscriptos en nuestro país (9, 10, 21). En arveja, la ISTA (International Seed Testing Association) propuso como método de referencia estandarizado para la verificación de cultivares la técnica de SDS PAGE (5, 15, 16). En Argentina no se conocen antecedentes del uso de este método para caracterizar e identificar los cultivares a fin de llegar a diferenciarlos y de esta forma ofrecer un recurso para verificar la identidad del material que se usa para la siembra.

El contenido de proteínas totales en semillas de arveja representa entre 20 a 23 % de la materia seca (22, 35) porcentaje que se ha incrementado hasta 25 % en las nuevas arvejas proteicas (27). Dentro de las proteínas totales, las proteínas de almacenamiento extraíbles de la semilla son las albúminas y globulinas (6). Las primeras han resultado más adecuadas para investigaciones taxonómicas (1, 19, 26), en tanto que las segundas fueron clasificadas por Osborne (24) en dos fracciones: las *leguminas* con coeficiente de sedimentación de 11/12 S y M_r (masas moleculares) de 330000 a 450000 Dalton y las *vicilinas* de coeficiente de sedimentación 7/8 S y M_r menores (entre 150000 a 190000 Dalton). También se encontró una segunda proteína 7S denominada *convicilina* cuyo peso molecular excede los 200000 Dalton (2). La variabilidad de las proteínas seminales de arveja se estudió primero mediante electroforesis en geles de almidón¹ (13, 30, 33). El análisis y separación electroforética tienen en cuenta las diferencias en carga y tamaño molecular de las fracciones proteicas. Mediante la técnica SDS-PAGE se determinó que la variabilidad en la composición de proteínas seminales de *Pisum* spp. ocurre particularmente en el rango de pesos moleculares de 50 a 70 kD, que corresponde a subunidades de vicilina y convicilina (3, 4, 30).

En el caso de las globulinas presentes en *Pisum*, de la fracción 11S, hexamérica, correspondiente a las *leguminas*, se obtienen dos grupos de subunidades: las ácidas (α) y las básicas (β) cuyas masas moleculares relativas (M_r) son de 37.6 - 40.4 kD para las primeras y de 20.7-21.9 kD para las segundas (20). Predominan las subunidades ácidas y aparecen además pares no disociados ($\alpha + \beta$) de M_r aproximada a 60 kD. Las *vicilinas*, grupo 7S, típicamente triméricas y de menor M_r , manifiestan un amplio rango de subunidades polipeptídicas (12.5; 13.5; 16; 19; 33 y 50 kD) (11). Las *convicilinas*, también 7S y de M_r elevada (200000 Da) presentan fracciones de 68 kD (23).

Considerando finalmente que el polimorfismo de las proteínas en las semillas es de gran utilidad para la identificación genotípica y varietal en arveja, en el presente trabajo se planteó como objetivo caracterizar trece cultivares de *Pisum sativum* L. inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares, de acuerdo con las proteínas seminales determinadas por electroforesis (SDS PAGE).

MATERIALES Y MÉTODOS

• **Material biológico**

Se utilizó semillas de lotes puros de los 13 cultivares inscriptos de *Pisum sativum* L.:

- a. De cotiledones amarillos lisos: *Alfetta*, *Delta*, *Íntegra*, *Swing* y *Magnif Cuarentona* INTA (las cuatro primeras corresponden a las nuevas "arvejas proteicas")
- b. De cotiledones verdes lisos: *Cobri*, *Mikado*, *Espace* y *Viper* (las dos últimas son arvejas proteicas)

1 Geles de almidón, SGE (Starch Gel electrophoresis); geles de poliacrilamida, PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) y SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate en PAGE). También Isoelectroenfoque, IEF (Iso Electric Focusing)

- c. De cotiledones verdes rugosos: *Onward*, *Televisión* y *Utrillo*
- d. De cotiledones verdes y/o amarillos, rugosos: *Bolero*

- **Metodología**

Se realizó la extracción de proteínas totales de semillas individuales de acuerdo con el método estándar de referencia (SDS-PAGE) según Reglas ISTA (1999) para *Pisum* spp (16). Se introdujeron y evaluaron algunas modificaciones referidas a densidad en la preparación de los geles (relación acrilamida/ bisacrilamida), densidad de siembra (µlitros de extracto por calle de siembra) e intensidad de corriente utilizada durante la electroforesis, buscando en cada caso condiciones que condujeran a mejorar la calidad de los electroforegramas obtenidos.

La molienda de los cotiledones se realizó, previa remoción de la cubierta seminal, en mortero de porcelana. La harina de semillas, finamente molida, se sometió a extracción en relación 40 mg de material/1.0 ml de buffer de extracción diluida (17 partes de buffer extracción concentrada - 3 partes de mercaptoetanol - 40 partes de agua destilada) utilizando tubos para micro centrífuga de 1.5 ml de capacidad. Las muestras se agitaron utilizando un vórtex y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente. Luego se calentaron durante 10 minutos en baño de agua hirviendo. Una vez enfriadas a temperatura ambiente se centrifugaron a 18000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se trasvasó y guardó durante la noche, en heladera a 4 °C o bien se utilizó inmediatamente para la electroforesis.

La electroforesis 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)² y buffer de cubas conteniendo 3 g de TrisHCl, 14.1 g de glicina y 1g de SDS por litro de solución.

Se sembraron 12 µl del sobrenadante de cada muestra por calle. La electroforesis procedió con intensidad de 40/50 mA (poco más de 1.5 mA / calle) mientras el frente atravesaba el gel superior o gel de posicionamiento y luego a 80 mA hasta que el frente, señalado por la presencia de Bromofenol azul, llegaba al límite inferior del gel. El voltaje se mantuvo en 700 V durante el primer tramo, y se elevó a 750/800 Voltios (constante) al incrementar la intensidad de corriente. Durante la corrida electroforética se refrigeró con conexión a equipo Multitemp, manteniendo la temperatura en el rango de 15° a 20 °C (± 1.1 °C). La electroforesis cursó normalmente en no menos de 4.5 horas.

Una vez desarmadas las cassetes, los geles se trataron con solución acuosa de fijación (etanol 40 % v/v y ácido acético glacial 10 % v/v) y agitación mecánica durante una hora. Luego se lavaron con agua destilada agitando durante 5 minutos. Para la tinción se utilizó una mezcla de solución acuosa de ácido acético al 15 % v/v con PAGE Blue al 1 % p/v en solución etanólica, en una relación de volúmenes 200 ml / 10 ml de cada una de las soluciones por gel.

2 % T: considera [(masa de Acrylamida + masa de bisacrilamida) / volumen solución] x 100.
Indica total del polímero en %p/v.

% C: considera [(masa bisacrilamida)/ masa de Acrylamida + bisacrilamida] x 100.
Indica total de bisacrilamida ("crosslinker") en relación al total del polímero en % p/p.

Posteriormente los geles se lavaron varias veces con agua destilada hasta observar las calles nítidas sobre el fondo claro. En caso de obtener geles con fondo muy oscuro, se los trató con solución de destinción (ácido acético glacial 10 % v/v y etanol 35 % v/v en agua) durante 30 a 60 minutos. Luego de secar los geles se los guardó entre hojas de papel celofán, en heladera, para su lectura y posterior evaluación.

ANÁLISIS DE DATOS

Se analizaron noventa semillas por cultivar y finalmente en tres geles se evaluaron los trece cultivares en forma conjunta. A fin de calibrar los geles se sembró la calle media de cada uno con proteínas marcadoras (Calibration Kit LMW for Electrophoresis, de Amersham Biosciences Argentina S.A) de pesos moleculares conocidos (Fosforilasa b - 97 kD, Albúmina - 66 kD, Ovoalbúmina - 45 kD, Anhidrasa carbónica - 30 kD, Inhibidor de tripsina - 20.1 kD y α -lactoalbúmina - 14.4 kD).

Todos los geles fueron registrados, digitalizados y guardados en archivo electrónico. Las imágenes fueron examinadas a fin de verificar la reproducibilidad, entre réplicas, del electroforegrama obtenido para cada cultivar, considerando fundamentalmente número y movilidad de los componentes proteicos. A partir de la mejor réplica de las imágenes obtenidas en los geles de comparación de los trece cultivares se construyó una matriz de datos originales asignando 1 a las bandas visibles y 0 a las ausentes. Los datos se procesaron utilizando el software Infostat (14) mediante análisis de conglomerados con el método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) o de "encadenamiento promedio" (29). La estimación de similitud genética se calculó de acuerdo con Jaccard (17) evaluando las distancias entre cultivares según (1 - J).

Según movilidad creciente de los componentes proteicos se diferenciaron seis zonas en cada gel. Las bandas correspondientes a las proteínas marcadoras se consideraron límite inferior de cada zona (32).

Se midieron y calcularon los coeficientes de variabilidad porcentuales (relación porcentual entre el desvío standard y la media) referentes a las movilidades relativas de cinco bandas por gel a fin de calcular las variabilidades intragel e intergel (corresponden a las bandas números 4, 10, 14, 27 y 40, ubicadas a los 14.3; 36.1; 47.0; 75.9 y 120.0 mm respectivamente, en el gel en que se compararon los cultivares).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de los componentes proteicos permitió caracterizar los cultivares, lográndose un electroforegrama típico para cada uno. Se obtuvo un total de 53 componentes proteicos, cuya distribución en las seis zonas en que quedaron calibrados los geles se muestra en la tabla 1 (pág. 115).

Tabla 1. Distribución y tipo de componentes proteicos seminales hallados en 13 cultivares de *P. sativum* determinados por SDS PAGE.

Zona	M _r en kD	Nº componentes		Tipo de proteína (32)
		totales	discriminantes	
I	Hasta 97	2	1	convicilina
II	97 - 66	3	1	convicilina
III	66 - 45	5	1	vicilinas
IV	45 - 30	20	17	α-leguminas (40 kD) y vicilinas de 30 Kd
V	30 – 20.1	11	7	β leguminas y vicilinas de menor M _r
VI	20.1- 14.4	12	9	vicilinas de bajo M _r
Total		53	36	

Si bien hay componentes proteicos discriminantes entre cultivares en las seis zonas del gel, se advierte mayor proporción de los mismos en las zonas IV, V y VI, correspondientes a las localizaciones de α y β leguminas (fracciones polipeptídicas ácidas y básicas respectivamente) y vicilinas de bajo peso molecular, lo que coincide y amplía anteriores investigaciones (4, 20, 31, 33).

En la tabla 2 se registra la distribución de componentes proteicos de cada cultivar, según zonas demarcadas en los electroforegramas.

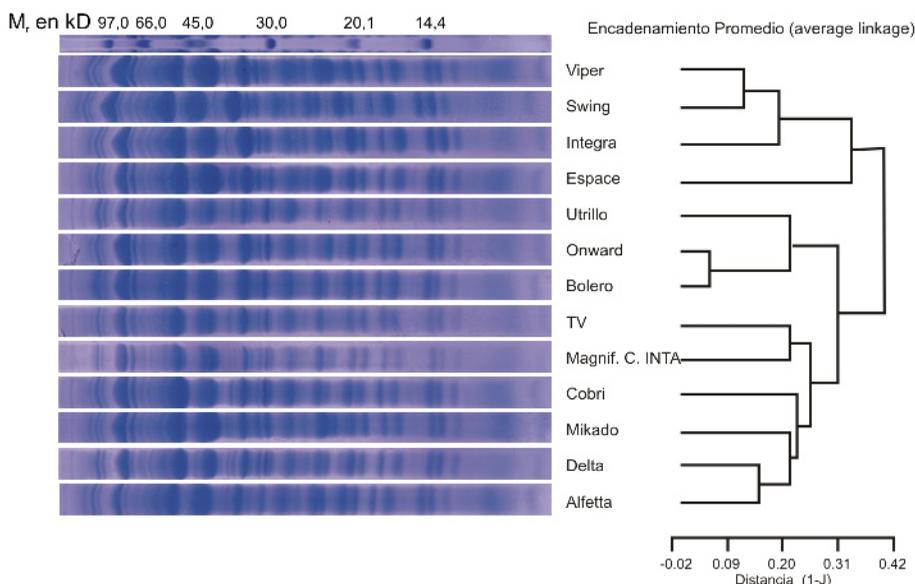
Los cultivares *Alfetta*, *Cobri* y *Mikado* evidenciaron polimorfismo proteico intravarietal dado por la presencia de una sola variante diferente por cultivar, y de escasa frecuencia (4, 3 y 6 %, respectivamente). Las variantes diferentes se presentaron en bandas tenues, por lo que algunas de ellas pueden considerarse problemas de umbral en la detección del componente proteico.

A fin de comparar los cultivares para la diferenciación varietal se consideró como electroforegrama típico el de mayor reproducibilidad o frecuencia.

Tabla 2. Número de componentes proteicos (bandas) seminales de cultivares de *P. sativum* determinados por SDS-PAGE.

Cultivar	Bandas		Zona del gel				Total
	I	II	III	IV	V	VI	
<i>Alfetta</i>	2	2	4	9	8	5	30
<i>Bolero</i>	2	3	4	10	9	7	35
<i>Cobri</i>	2	3	4	8	10	7	34
<i>Delta</i>	1	2	4	8	9	7	31
<i>Espace</i>	2	3	4	10	8	8	35
<i>Magnif Cuarentona</i>	1	2	4	9	8	5	29
<i>Mikado</i>	2	3	4	9	7	7	32
<i>Onward</i>	2	3	4	10	7	7	33
<i>Televisión</i>	2	2	5	8	8	5	30
<i>Utrillo</i>	2	2	4	10	9	6	33
<i>Integra</i>	2	3	4	9	9	8	35
<i>Viper</i>	2	3	4	9	7	7	32
<i>Swing</i>	2	3	4	9	7	5	30

La siguiente figura muestra el dendrograma obtenido según el análisis de datos (coeficiente de correlación cofenética = 0.639) indicado precedentemente. En él se observan doce agrupamientos totales, integrados por dos conjuntos bien diferenciados que separan los cultivares *Alfetta*, *Delta*, *Mikado*, *Cobri*, *Magnif Cuarentona* INTA y *Televisión*, de los restantes: *Bolero*, *Onward*, *Utrillo*, *Espace*, *Íntegra*, *Swing* y *Viper*.



Electroforegrama de proteínas seminales de 13 cultivares de *Pisum sativum* determinados por SDS-PAGE y su dendrograma.

En el primer conjunto se advierte la mayor similitud de los cultivares *Alfetta* y *Delta* (arvejas proteicas, de cotiledones amarillos) que se unen a una distancia de 0.15 (número de bandas distintas entre ellos: cinco). Continúan *Mikado* y *Cobri* (arvejas pequeñas, cotiledones verdes) con distancias 0.22 - 0.23. Un tercer agrupamiento de este conjunto muestra similitud entre los cultivares *Magnif Cuarentona* INTA y *Televisión* que guardan entre sí una distancia de 0.21.

El segundo conjunto presenta dos cultivares muy similares: *Bolero* y *Onward* (distancia 0.06) que se integran seguidamente a *Utrillo* (distancia 0.21). Estos tres cultivares presentan semillas rugosas. Finalmente aparecen los cuatro cultivares de reciente inscripción, de arvejas proteicas: *Espace*, *Íntegra*, *Swing* y *Viper*. Del dendrograma surge mayor similitud entre *Viper* y *Swing* (distancia 0.12); esta disimilitud corresponde a dos bandas diferentes entre ellos, y una diferenciación que va aumentando con respecto a *Íntegra* y *Espace* (distancias 0.19 y 0.33). La diferenciación entre ambos conjuntos indica diferencia (distancia) cuyo valor alcanza 0.40.

Con respecto a la variabilidad de las bandas, se obtuvieron los siguientes valores al aplicar cálculos de coeficiente de variabilidad porcentual:

- a. variabilidad intragel: valores de 3.05; 1.30; 1.34; 1.21 y 0.47 % para las bandas números 4, 10, 14, 27 y 40, respectivamente
- b. variabilidad intergel: valores de 20.73; 3.84; 2.91; 2.31 y 1.02 %, respectivamente para las mencionadas bandas.

La técnica de SDS PAGE en proteínas totales de las semillas permitió caracterizar y diferenciar los cultivares en estudio, coincidentemente con lo logrado por investigaciones previas en otros cultivares de *Pisum spp.* (4, 30, 32). Los patrones electroforéticos obtenidos permiten aseverar que la técnica empleada resulta un indicador idóneo, de tipo analítico, ya que permitió evidenciar la diferenciación varietal buscada.

Agradecimiento

Este trabajo se realizó con el subsidio de UNER otorgado al PID UNER N° 2068 y la beca de cuarto nivel otorgada a la primera autora para el estudio del Magister Scientiae en Metodología de la Investigación FCE UNER (Facultad de Ciencias Económicas - Universidad Nacional de Entre Ríos).

Bibliografía

1. Bewley, J. and Black, M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Springer-Verlag, Berlin - Heilderberg - New York. pp.20-26.
2. Casey, R. and Sanger, E. 1980. Purification and some properties of a 7S seed storage protein from *Pisum* (pea), *Biochemical Society Trans.* 8, 658. En: Shwery, P. 1995. Plant storage Proteins, *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 70, 3: 375 - 426.
3. Casey, R. and Domoney, C. 1985. Variation in pea seed storage proteins. En: Hebblethwaite, D.; Heath, M. and Dawkins, T. (eds) 1985. "The pea crop. A basis for improvement", Butterworths, London. pp. 359-368.
4. Cooke, R. 1983. The characteristics of *Pisum sativum* L. (field peas) cultivars by SDS- PAGE. *J.Nat.Inst.Agric.Bot.*, 16. pp. 213-220.
5. _____. 1995. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties, *Journal of chromatography A*, 698. pp 281- 299.
6. Crevieu, I.; Berot, S.; Gueguen, J. 1996. Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea sedes. *Nahrung - Food*, lss. 5. pp.237-244.
7. Dirlwanger, E.; Isaac, P.; Cousin, R. et al. 1992. Molecular markers linked to the resistance genes to main pea diseases. En: *Proc.1st Eur.Conf.Grain. Legumes*. Angers. pp. 129-130.
8. Dirlwanger, E.; Isaac, P.; Ranade, P. et al. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and development traits in *Pisum sativum*, *Theor.Appl.Genet.*, 88. pp. 17-27.
9. Galussi, A.; Reinoso, P.; Argüello, J. y otros. 1996. Manual de caracterización de cultivares de trigo y arroz. *Análisis de Semillas y Plántulas*. Fac. Cs. Agropecuarias. U.N.E.R. 83 pp.
10. Galussi, A.; Cevedo, A.; Reinoso, P. et al. 1997. Caracterización de cultivares de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum* Lam. por electroforesis de las proteínas. *Agrisciencia*, XIV. Pp. 25-29.
11. Gatehouse, J.; Croy, R. and Boulter, D. 1984. The synthesis and structure of pea storage proteins. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1. pp. 287-314.
12. Hoey, B.; Crowe, K.; Jones, V. et al. 1996. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.*, 92. pp. 92-100.
13. Hynes, M. J. 1968, Genetically controlled electrophoretic variants of a storage protein in *Pisum sativum*, *Aust.J.Biol.Sci.*, 21. pp. 827-829.
14. INFOSTAT. 2002. InfoStat, versión 1.1. Manual del Usuario, Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Primera Edición, Editorial Brujas, Argentina, 266 p.
15. ISTA, International Seed Testing Association. 1992. Handbook of Variety Testing, Electrophoresis Testing, Zurich, Switzerland.
16. _____. 1999. International Rules for Seed Testing, *Seed Science and Technology*, 27.

17. Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale, Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., 44. pp. 223-270. En: SAMEC, P., POŠVEC, Z., STEKJSKAL, J. NAŠINEC, V. and GRIGA, M. 1998. Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isoenzymes, *Biologia Plantarum*, 41 (1): 39-48.
18. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. London, 227. pp. 680-685.
19. Manteuffel, R.; Helbing, D. and Przybylska, J. 1987. Western blotting and enzyme-immunochemical analysis of antigenic similarities of the S2 albumin fraction in Pisum; Biochemical identification of cultivars. Materials of the Third International Symposium ISTA. Leningrad, USSR. pp. 220-225.
20. Matta, N.; Gatehouse, J. and Boulter, D. 1981a. Molecular and subunit heterogeneity of legumin of *Pisum sativum* - a multidimensional gel electrophoretic study. *Journal of Experimental Botany*, 32. pp. 1295- 1307. In: SHWERY, P. 1995. Plant storage Proteins, *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 70, 3. pp. 375-426.
21. Moya, M.; Galussi, A.; Reinoso, P. et al. 2002. Caracterización varietal de *Avena sativa* L. y *Avena byzantina* Koch. por electroforesis de aveninas y proteínas totales en semillas. *Revista Científica Agropecuaria. Fac. Ciencias Agropecuarias, UNER*. 6. pp 41-47
22. Mundt, C. 1991. Leguminosas - Arveja, 12.6. pp. 133-144. En: Vignola, M. I. et al. *Manual de Horticultura*, 1991, Hemisferio Sur, Buenos Aires. 2ª reimpresión, 1993.
23. Newbigin, E.; Delumen, B.; Chandler, P. et al. 1990. Pea convicilin: structure and primary sequence of the protein and expression of a gene in the seeds of transgenic tobacco, *Planta* 180. pp. 461-470. En: Shwery, P. 1995. Plant storage Proteins, *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 70, 3: 375-426.
24. Osborne, T. 1924. *The Vegetable Proteins*. Longmans Green, London. In: Cooke, R. 1995. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties, *Journal of Chromatography A*, 698. pp. 281-299.
25. Przybylska, J. 1986. Identification and classification of the Pisum genetic resources with the use of electrophoretic protein analysis, *Seed Science and Tech.*, 14. pp 529-543.
26. _____ 1995. Some examples of the use of electrophoretic protein analysis in taxonomic investigations of leguminous plants. *Journal of Applied Genetics*. 36-3. pp. 255-271.
27. Riva, E. 1997. Arveja proteica (forrajera). Un nuevo uso para un viejo cultivo. (3 páginas) (on line) <http://www.coltrinari.com.ar/eldoriva.htm> (Consulta: 21/08/02).
28. Samec, P.; Pošvec, Z.; Stekjskal, J. et al. 1998. Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isoenzymes, *Biologia Plantarum*, 41 (1) pp. 39-48.
29. Sokal, R. and Michener, C. 1958. *A Statistical Methods for Evaluating Systematic Relationships*. University of Kansas Science Bulletin, 38. pp. 1409-1438.
30. Suška, M. and Stejskal, J. 1992. The electrophoretic identification of pea (*Pisum sativum* L.) cultivars by seed protein análisis. *Rostlinna-Vyroba*, 38, 2. pp. 203-207.
31. Tanksley, S.; Young, N.; Paterson, A. et al. 1989. RFLP mapping in Plant Breeding: New Tools For An Old Science, *Bio/Technology* 7: 257-264. En: Samec, P., Pošvec, Z., Stekjskal, J. et al. 1998. Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isoenzymes, *Biologia Plantarum*, 41 (1) pp. 39-48.
32. Tarlakovskaya, A. 1987. Identification of pea varieties by means of electrophoretic patterns of globulins. Biochemical identification of varieties. Materials of the III International Symposium ISTA. Leningrad, USSR. pp.217-220.
33. Thomson, J.; Schroeder, H.; Dudman, W. 1978. Cotyledonary storage proteins in *Pisum sativum*. I. Molecular heterogeneity, *Aust.J.Plant Physiol.*, 5. pp. 263-279. En: Samec, P.; Pošvec, Z.; Stekjskal, J. et al. 1998. Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isoenzymes, *Biologia Plantarum*, 41 (1) pp. 39-48.
34. Timmerman, G.; Russel, A.; Frew, T. et al. 2002. DNA Markers for disease resistance breeding in peas (*Pisum sativum* L.), Abstract (2 páginas, on line) <http://www.hortnet.co.nz> (Consulta 11/09/2002).
35. Vignola, M. I. et al. 1991. *Manual de Horticultura*. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 2ª reimpresión, 1993.