

CHARACTERIZATION OF ONION (*Allium cepa* L.) VARIETIES BASED ON PHYSICAL PROPERTIES AND SEED PERFORMANCE

CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) BASADA EN CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y FUNCIONALES DE LA SEMILLA

Carlos Herrera-Corredor and Guillermo Carrillo-Castañeda

Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México. (herrera1@colpos.mx) (carrillo@colpos.mx)

ABSTRACT

Five cultivars (Cristal White Wax, Toro, Red Burgundy, Cojumatlán and Contessa) of onion (*Allium cepa* L.) were characterized according to: the weight of 100 seeds, germination kinetics, speed germination (T_{50}) and seed protein analysis. Seed of Crystal White Wax was differentiated from the other cultivars by its low weight (0.30 g), since the weight of the rest was 0.40 g. Crystal White Wax had low seed germination (56%) and the highest delay of germination (T_{50} values were 78 h), while T_{50} of the rest was 52 h. Protein was isolated from seeds at the precise moment of seed germination. All cultivars were differentiated by their pattern and number of proteins resolved by SDS-PAGE electrophoresis. Toro and Red Burgundy showed the greater difference in the number of proteins detected (27 and 14) whereas Cojumatlán, Contessa and Crystal White Wax had similar numbers. All cultivars shared 12 proteins (44%). According to the coefficient of similarity of Jaccard, Cojumatlán and Crystal White Wax had the greatest degree of relationship (0.95), while Red Burgundy was the least related.

Key words: *Allium cepa* L., germination kinetics, SDS-PAGE, T_{50} , vigor.

INTRODUCTION

Onion is the third most important vegetable crop in México. In 2006 the production was 169 990 t in a sowed area of approximately 23 185 ha (SIAP, 2007). In México, several varieties were introduced, and the cultivar Cojumatlán was generated later on. Due to its acceptable adaptability it is cultivated all around the country and has been involved in the generation of new varieties. The hybrids Contessa, Crystal White Wax and Toro sometimes show adaptation problems. The white bulb varieties are commonly available at the market but purple coloration cultivars have restricted availability, even though, they are quite important in traditional mexican kitchen recipes.

Recibido: Diciembre, 2006. Aprobado: Septiembre, 2007.
Publicado como NOTA en *Agrociencia* 41: 755-762. 2007.

RESUMEN

Cinco variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) (Crystal White Wax, Toro, Red Burgundy, Cojumatlán y Contessa) fueron caracterizadas de acuerdo a: peso de 100 semillas, cinética de la germinación, velocidad de germinación (T_{50}) y análisis de proteínas de las semillas. La semilla de Crystal White Wax se diferenció por su menor peso (0.30 g), mientras que el peso del resto de los cultivares fue de 0.40 g. Crystal White Wax tuvo baja germinación (56%) y fue la más tardía (su T_{50} fue 78 h), mientras que en el resto fue 52 h. La proteína se aisló de las semillas al momento justo de la germinación. Todos los cultivares se diferenciaron por su patrón y número de proteínas detectadas resueltas en geles de poliacrilamida-DSS. Toro y Red Burgundy tuvieron la mayor diferencia en número de proteínas detectadas (27 y 14) mientras que Cojumatlán, Contessa y Cristal White Wax tuvieron números similares. Todos los cultivares compartieron 12 proteínas (44%). De acuerdo con el coeficiente de similitud de Jaccard, Cojumatlán y Crystal White Wax tuvieron el mayor grado de relación (0.95), y Red Burgundy fue el cultivar menos relacionado a los demás.

Palabras clave: *Allium cepa* L., cinética de germinación, SDS-PAGE, T_{50} , vigor.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la cebolla es el tercero más importante de las hortalizas en México, con una producción de 169 990 t en el 2006 en un área sembrada aproximada de 23 185 ha (SIAP, 2007). Las variedades en México generalmente son de introducción, y la Cojumatlán se generó más tarde. Esta variedad, debido a su adaptabilidad aceptable se cultiva en todo el país y está involucrada en la generación de nuevas variedades. Los híbridos Contessa, Crystal White Wax y Toro algunas veces presentan problemas de adaptación. Las variedades de bulbo blancas son comunes en el mercado mientras que las de coloración púrpura, aunque importantes en recetas de la cocina tradicional mexicana, tienen una disponibilidad restringida.

Con base a la legislación mexicana (SNICS, 2003) y las normas establecidas por organizaciones

According to local Mexican rules (SNICS, 2003) and agreements established by international organizations such as the International Office of Vine and Wine (OIV), International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV), in order to register any crop seed, to assure its quality, it is required to identify its genetic source. The accurate characterization of varieties is usually carried out using descriptors based on agronomic and morphologic traits and methods based on biochemistry, physiology, proteins, isozymes and DNA analysis. The environment, however, may modify some descriptors. With the DNA technology the most reliable results are obtained; however, it is the most expensive. Among current techniques, the electrophoretic protein patterns have been used to characterize multiple vegetal species such as wheat (*Triticum aestivum* L.), cotton (*Gossypium* L.), barley (*Hordeum* L.), soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.), sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.), horticultural crops, as well as in studies of phytopathogenic fungi (Chauhan *et al.*, 2002; Stonoyanova and Kolev, 2001; Wang *et al.*, 2000). A procedure based on the systematic integration of the data obtained from morphological and physiological descriptors in conjunction with molecular markers may allow a more reliable identification of important onion varieties.

The objective of this investigation was to establish a practical method to characterize cultivars of onion based on the integrated analysis of seed weight, speed (T_{50}) and uniformity of seed germination and the protein patterns utilizing protein isolated at the moment of seed germination.

MATERIALS AND METHODS

Biological materials

Five cultivars of onion: the variety Cojumatlán, the commercial hybrids Contessa, Crystal White Wax, and Toro (produce white bulbs) and the hybrid Red Burgundy (purple bulbs) were utilized in the present investigation. The seeds were obtained assuring that the date of packing corresponded to the year in which the investigation was carried out, with the exception of Red Burgundy seed, that was of the previous year. All seeds were packaged to vacuum, with the exception of Cojumatlán, which was obtained in bulk.

Weight of 100 seeds

The weight of seeds was obtained from four 100 seed samples per cultivar using a Sartorius® 1216 MP grain scale.

internacionales como International Office of Vine and Wine (OIV), International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) y la International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV), para registrar cualquier semilla de cultivo y asegurar su calidad, se requiere identificar la fuente genética. La adecuada identificación varietal se realiza usando generalmente descriptores con base en características agronómicas, morfológicas y métodos basados en el análisis bioquímico, fisiológico, de proteínas, isoenzimas y ADN. Sin embargo, el ambiente puede modificar algunos descriptores. Con la tecnología del ADN se obtienen resultados más confiables; sin embargo, es la más cara. Entre las técnicas actuales, los patrones electroforéticos de proteínas se han usado para caracterizar múltiples especies vegetales como: trigo (*Triticum aestivum* L.), algodón (*Gossypium* L.), cebada (*Hordeum* L.), soya (*Glycine max* (L.) Merr.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.), hortalizas, así como hongos fitopatógenos (Chauhan *et al.*, 2002; Stonoyanova y Kolev, 2001; Wang *et al.*, 2000). Un procedimiento basado en la integración sistemática de la información obtenida de los descriptores morfológicos, fisiológicos así como los marcadores moleculares, puede permitir una identificación más confiable de las variedades económicamente importantes de cebolla.

El objetivo de esta investigación fue establecer un método práctico para caracterizar cultivares de cebolla basado en el análisis integrado de el peso de la semilla, velocidad (T_{50}) y uniformidad de la germinación de la semilla y patrones de proteína usando proteína aislada en el momento de la germinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales biológicos

En la presente investigación se usaron cinco cultivares de cebolla: Cojumatlán (CJ) y los híbridos comerciales Contessa (CT), Crystal White Wax (CR), y el Toro (TR) (producen bulbos blancos) y el híbrido Red Burgundy (RB) (bulbos púrpuras). Las semillas se obtuvieron asegurando que la fecha de cosecha en el empaque correspondiera al año en el cual se hizo la investigación, a excepción de RB que fue del año anterior. Todas las semillas fueron envasadas al vacío, excepto de Cojumatlán que se obtuvo de venta a granel.

Peso de 100 semillas

El peso de las semillas se obtuvo de cuatro muestras de 100 semillas, usando una balanza granataria Sartorius® 1216 MP.

Germination tests

To determine the rate and uniformity of germination, tests were performed according to ISTA (1999) with the indicated modifications. Four replicates of 25 seeds per cultivar were imbibed on filter paper (Wisconsin Park Avenue®) soaked with 5 mL of distilled water placed in Petri dishes (9 cm diameter) and maintained at 28 ± 1 °C. A seed was considered germinated when the radicle protrusion was approximately 1 mm. Results were expressed as germination percentages. Germination rate was calculated as the period of time (h) to 50% germination (T_{50}). From cumulative germination curves (germination counts taken at 21, 31, 45, 55, 69, 79, 93 and 103 h) this percentage was graphically calculated by means of a fourth order polynomial regression, with the Microsoft® Excel 2000 program, and the tabulation was performed with the Curve Expert program version 1.38 (<http://curveexpert.webhop.net>). The percentage of germination for the statistical analysis was taken from the count at 103 h.

Protein analysis

Protein was isolated by grinding approximately 30 seeds (0.2 g) which were at the stage of seed germination together with two volumes of extraction buffer which contained 100 mM sodium phosphate; 1 mM, EDTA; 1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1%, polyvinilpirrolidone (PVP) -10 (Pinhero *et al.*, 1997; El-Bendary *et al.*, 1998). The protein content in the extracts was determined according to Lowry *et al.* (1951).

Proteins were separated by electrophoresis (SDS-PAGE), following the procedure described by Laemmly (1970) using 4% stacking gel and 8% running gel. In each slot a sample volume of 20 μ L was loaded, 12 μ L of protein extract, containing approximately 100 μ g of protein, 6 μ L of buffer (0.5 M Tris HCl pH 6.8, 50 μ L; glycerol, 50 μ L; 10% SDS (w/v), 50 μ L, and 2-mercaptoethanol, 10 μ L) and 2 μ L bromophenol blue (0.01% w/v). The separation was carried out using a vertical electrophoresis chamber (OWL®) of 14×12.5 cm and a power source (E-C Apparatus Corporation EC-105). The protein concentration was carried out at 88+1 V and when the samples reached the separating gel, the voltage was set to 110+1 V by 8 h approximately. The gel was dyed with a 0.1% Coomassie blue solution, where the gel was kept for 30 min, shaking constantly. The gel was bleached using 10% acetic acid v/v for 36 h, replacing the solution at least three times.

Analysis of results

The experiments for seed weight, germination and T_{50} , were carried out in completely randomized designs with four replications, and comparisons among treatment means were made with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

The gel was digitalized with a Hewlett Packard® ScanJet 3300C and with the images obtained the molecular weight of all defined proteins was calculated. All the bands in each pattern were scored, 1 the presence and 0 for absence, and a binary matrix was generated

Pruebas de germinación

Para determinar la tasa de uniformidad de la germinación, se hicieron pruebas de acuerdo con ISTA (1999) con las modificaciones indicadas. Cuatro repeticiones de 25 semillas por cultivar fueron embebidas en papel filtro (Wisconsin Park Avenue®), humedecido con 5 mL agua destilada en cajas Petri (9 cm diámetro) y mantenidas a 28 ± 1 °C. La semilla se consideró germinada cuando la protrusión de la radícula era 1 mm aproximadamente. Los resultados se expresaron en porcentaje de germinación. La tasa de germinación se calculó como el periodo de tiempo (h) al 50% germinación (T_{50}). De las curvas acumulativas de germinación (germinación evaluada a 21, 31, 45, 55, 69, 79, 93 y 103 h) el porcentaje se calculó gráficamente mediante un modelo de regresión lineal de cuarto orden con el programa Excel 2000 de Microsoft® y la tabulación se realizó con el programa Curve Expert versión 1.38 (<http://curveexpert.webhop.net>). El porcentaje de germinación para el análisis estadístico se obtuvo del conteo a 103 h.

Análisis de proteínas

La proteína se aisló al moler aproximadamente 30 semillas (0.2 g) que estaban en etapa de germinación, con dos volúmenes de amortiguador de extracción que contenía: 100 mM fosfato de sodio; 1 mM EDTA; 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) y 1% polivinilpirrolidona (PVP) -10 (Pinhero *et al.*, 1997; El-Bendary *et al.*, 1998). El contenido proteínico en los extractos se determinó según Lowry *et al.* (1951).

Las proteínas fueron separadas por electroforesis (SDS-PAGE), siguiendo el procedimiento descrito por Laemmly (1970) usando 4% y 8% para el gel concentrador y separador. En cada ranura se colocó una muestra de 20 μ L, 12 μ L del extracto de proteínas, que contenían aproximadamente 100 μ g de proteína, 6 μ L de amortiguador (0.5 M Tris HCl pH 6.8, 50 μ L; glicerol, 50 μ L; SDS 10% (p/v), 50 μ L, y 2-mercaptoetanol, 10 μ L) y 2 μ L de azul del bromofenol (0.01% p/v). La separación de proteínas se hizo usando una cámara vertical de electroforesis (OWL®) de 14×12.5 cm y una fuente de energía (E-C Apparatus Corporation EC-105). La concentración de la proteína se hizo a 88+1 V y cuando las muestras alcanzaron el gel de separación, el voltaje se ajustó a 110+1 V por 8 h aproximadamente. El gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie al 0.1%, donde permaneció 30 min con movimiento constante. El gel fue desteñido usando solución de ácido acético al 10% v/v por 36 h, cambiando la solución al menos tres veces.

Análisis de resultados

Los experimentos para peso de semilla, germinación y T_{50} se hicieron con diseños experimentales completamente al azar con cuatro repeticiones y las comparaciones entre medias de tratamientos se realizaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El gel fue digitalizado con un scanner Hewlett Packard® ScanJet 3300C y con las imágenes obtenidas se calcularon los pesos moleculares de las proteínas definidas. Todas las bandas en cada patrón fueron

to analyze them by hierarchic classification (cluster analysis) with the program NTSYSpc version 2.01 and the method of group UPGMA, that synthesizes the information of all the samples (Morales *et al.*, 2004). With the coefficient of similarity of Jaccard a dendrogram was obtained that showed the relations between cultivars.

RESULTS

Physical and physiological characteristics

Based on the seed weight it was possible to differentiate Crystal White Wax from the other cultivars, which presented the smallest weight (0.30 g) in comparison with the seed weight of the other cultivars which was 0.40 g (Table 1). Regarding seed germination Contessa expressed the greatest percentage (79%) and Crystal White Wax the least (56%). Based on the rate of seed germination (T_{50}) Crystal White Wax exhibited the highest value of delayed germination (78 h).

Protein analysis

It was possible to distinguish each one of the cultivars based on its specific protein pattern which implicates the number of total proteins, differences with respect to the presence or absence of bands, and by their relative staining intensities (Figure 1). Toro presented 27 proteins; five of them, proteins 1, 3, 4, 9 and 21 (18.5%) are exclusively found in Toro (Figure 1B). The highest number of proteins found in Toro contrasted with 14 bands detected in Red burgundy.

Cojumatlán, Crystal White Wax and Contessa, expressed similar number of bands, 21, 20 and 18 (Table 1). All varieties expressed 12 protein bands in common, with the following molecular weights: 39.86, 37.16, 34.64, 32.67, 29.07, 22.48, 21.20, 19.53, 17.79, 15.82, 13.43 and 11.95 kDa.

According to the distribution of the cultivars in the dendrogram (Figure 2) Cojumatlán and Crystal White Wax constituted a group closely related to Contessa,

codificadas, 1 para la presencia y 0 para ausencia, y se generó una matriz binaria para analizarlas por clasificación jerárquica (análisis de cluster) con el programa NTSYSpc versión 2.01 y el método de agrupamiento UPGMA, que sintetiza la información de todas las muestras (Morales *et al.*, 2004). Con el coeficiente de similitud de Jaccard se obtuvo un dendrograma que mostró la relaciones entre los cultivares.

RESULTADOS

Características físicas y funcionales de la semilla

Con base en el peso de semillas fue posible diferenciar Crystal White Wax de los otros cultivares, el cual presentó el menor peso (0.30 g) en comparación con la semilla de los otros cultivares que fue 0.40 g (Cuadro 1). Respecto a la germinación de las semillas, Contessa expresó el mayor porcentaje (79%) y Crystal White Wax el menor (56%). Mediante la tasa de germinación T_{50} , Crystal White Wax presentó el mayor valor de germinación retrasada (78 h).

Análisis de proteínas

Fue posible diferenciar cada uno de los cultivares con base en el patrón específico de proteínas, el cual implicó el número total de proteínas, diferencias con respecto a la presencia o ausencia de bandas e intensidad relativa (Figura 1). Toro presentó 27 proteínas; cinco de ellas, las proteínas 1, 3, 4, 9 y 21 (18.5%) se encuentran exclusivamente en Toro (Figura 1B). El mayor número de proteínas encontradas en Toro contrastó con 14 bandas detectadas en Red Burgundy.

Cojumatlán, Crystal White Wax y Contessa, presentaron un número similar de bandas, 21, 20 y 18 respectivamente (Cuadro 1). Todas los cultivares presentaron 12 bandas de proteínas en común, de pesos moleculares: 39.86, 37.16, 34.64, 32.67, 29.07, 22.48, 21.20, 19.53, 17.79, 15.82, 13.43 y 11.95 kDa.

De acuerdo a la distribución de los cultivares en el dendrograma (Figura 2) Cojumatlán y Crystal White Wax constituyen un grupo cercanamente relacionado

Table 1. Differentiation of the studied cultivars by the indicated criteria.

Cuadro 1. Diferenciación de los cultivares estudiados con los criterios indicados.

Cultivar [†]	Seed weight (g)	T_{50} (h)	Germination (%)	Total proteins bands and (%)	Useful bands to differentiate cultivars	Coefficient of similarity
CJ	0.40 a [‡]	66	66 ab	21 (78)	7, 8, 9, 10, 16	0.95
CT	0.40 a	52	79 a	18 (67)	7	0.83
CR	0.30 b	78	56 b	20 (74)	8, 9, 10, 16	0.95
RB	0.40 a	52	73 ab	14 (52)	1 to 10 and 25 [§]	0.56
TR	0.40 a	52	71 ab	27 (100)	1, 3, 4, 9, 21	0.721

[†] CJ, Cojumatlán; CT, Contessa; CR, Crystal White Wax; RB, Red Burgundy; TR, Toro.

[‡] Values with different letter within each column are statistically different ($p \leq 0.05$).

[§] Not displayed.

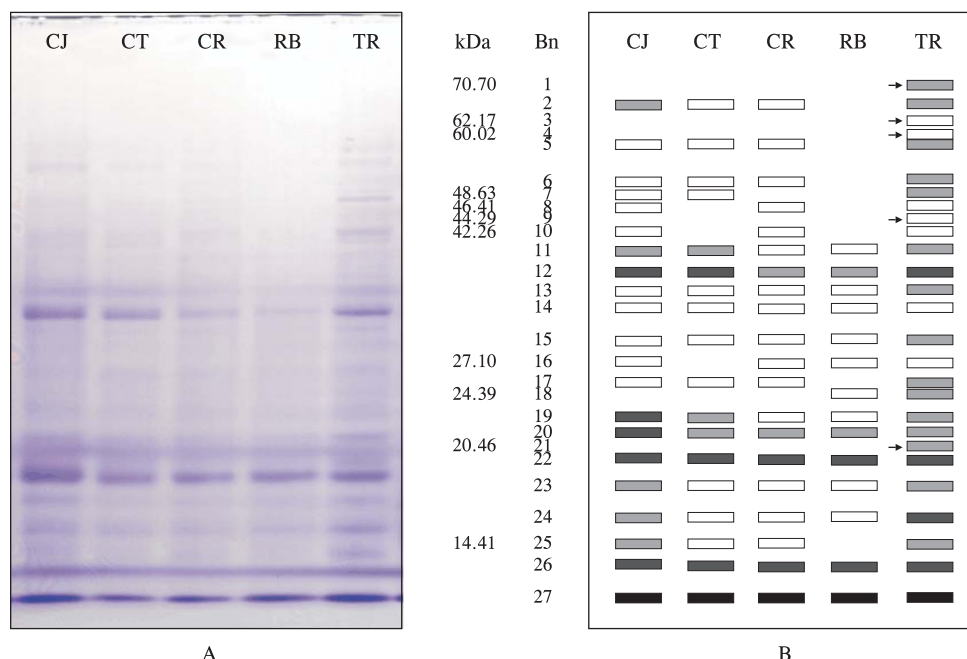


Figure 1. Protein bands pattern (A) and diagrammatic representation (B) of: CJ, Cojumatlán; CT, Contessa; CR, Crystal White Wax; RB, Red Burgundy; TR, Toro; Bn, band number; kDa, marker of molecular weights.
Figura 1. Patrón de bandas proteínicas (A) y representación diagramática (B) de: CJ, Cojumatlán; CT, Contessa; CR, Crystal White Wax; RB, Red Burgundy; TR, Toro; Bn, número de banda; kDa, marcador de pesos moleculares.

and Red Burgundy was the least related cultivar (Table 1; Figure 2).

DISCUSSION

Only Crystal White Wax was differentiated from the other seeds based on seed weight, because in these cultivars the weight of seeds was quite constant, which agrees with the results of Moroto (1989) who indicates that, in general, 250 seeds of onion weigh approximately 1 g. Cadger and Hall (2004) reported that, in barley, the weight of seeds among varieties can vary by more than 100%. They indicate that seed weight is an important characteristic in commercialization because it determines the approximate number of seeds per unit of weight, which allows the calculation of the amount of the required seed to sow. They did not find any relation between seed weight and germination and seed vigor. Considering the stability of the physical characteristics in onion crops, Cook (1995) quotes two researchs in which, by means of the analysis of digitalized images of the shape of onion bulbs (Draper and Keefe, 1989) and the bean pods (van de Vooren and van der Heijden, 1993) a reliable identification of varieties was achieved. McDonald *et al.* (2005) developed a software to measure the length of seedlings from digital images to determine a vigor index, with the advantages of greater speed in the evaluation and the elimination of errors of evaluator.

con Contessa, y Red Burgundy fue el cultivar menos relacionado (Cuadro 1; Figura 2).

DISCUSIÓN

Sólo Crystal White Wax se diferenció de los otros cultivares con base en el peso de la semilla, porque en estos cultivares el peso se mantuvo constante, lo cual

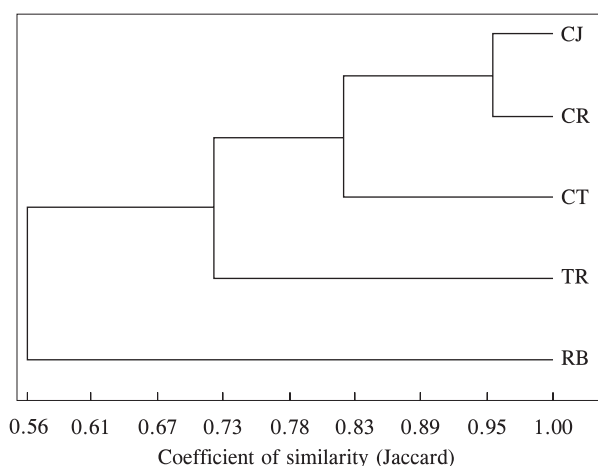


Figure 2. Dendrogram generated from patterns of proteins analyzed by means of UPGMA group method and Jaccard's coefficient.
Figura 2. Dendrograma generado de los patrones de proteínas analizadas mediante el método de grupo UPGMA y el coeficiente de Jaccard.

Seed germination, a physiological variable, allowed to differentiate the cultivar Contessa from Crystal White Wax as they presented contrasting values. Crystal White Wax presented the lowest germination (56%) and it was differentiated from the other seeds based on its lowest seed weight. Katepa-Mupondwa *et al.* (1996) and TeKrony (2003) demonstrated that seed weight is related to seedling vigor based on the fact that maximum seed weights represent maximum amount of reserves available for the embryo, condition reached at the stage of physiological maturity. According to these results, Crystal White Wax exhibited the lowest speed of germination (T_{50}) contrasting with Toro, Contessa and Red burgundy which presented the fastest germination rate (52 h) (Table 1). The cultivars Crystal White Wax and Contessa could be differentiated from each other. Cojumatlán, Toro and Red Burgundy are in a separated group of cultivars, based on these variables. The seed of Red Burgundy stored for more than a year in comparison with the fresh seed of the rest of the other cultivars, presented high (73%) and fast germination (52 h).

The success of protein analysis to clearly differentiate the five onion cultivars depended on the extent of polymorphism of seed proteins or protein variation and a high sensitive method than does the standard procedures. Precision is an essential component of the methodology performed in this study: 1) proteins were isolated from seeds selected at the moment of germination, when the radicle protrusion was ≤ 1 mm long; 2) under this condition, only the proteins from viable seeds are involved in our study, avoiding all those protein that may be present in abnormal non-viable seeds; 3) the methodological process and manipulation of the materials was carried out with high precision to assure the confidence of the results.

The protein analysis performed to the onion cultivars demonstrated that each one of them has been clearly differentiated. Low protein polymorphism is commonly observed (Becerra y Paredes, 2000; Wang *et al.*, 2000); accordingly, a relatively small number of proteins (27 maximum) were detected in this study. Of these proteins, 55.55% and 14.28% became polymorphic in the case of cultivars Toro and Red Burgundy. It is now accepted that each organism commonly undergo significant modifications of its genome either through a series of progressive punctual mutations, mechanism that accounts for the generation of numerous alleles at a single gene or by replacement of one or more genes by the corresponding genes derived from another organism (genetic recombination). The protein analysis of seeds has allowed to detect the intraspecific genetic variability present in these cultivars and based on it differentiate each one from the rest.

concuere con los resultados de Moroto (1989) quien indica que, en general, 250 semillas de cebolla pesan aproximadamente 1 g. Según Cadger y Hall (2004), en cebada el peso de la semilla puede variar más de 100% entre cultivares. Ellos indican que el peso de la semilla es una característica importante en la comercialización porque determina el número aproximado de semillas por unidad de peso, lo cual permite calcular la cantidad de semillas requeridas para sembrar. Ellos no encontraron relación entre el peso de la semilla, la germinación y el vigor. Considerando que los rasgos físicos son estables en el cultivo de cebolla, Cook (1995) menciona dos investigaciones donde mediante el análisis de imágenes digitales de la forma del bulbo de cebolla (Draper y Keefe, 1989) y las vainas de frijol (van de Vooren y van der Heijden, 1993) lograron una identificación confiable de variedades. McDonald *et al.* (2005) desarrollaron un programa para medir la longitud de la plántulas a partir de imágenes digitales para determinar un índice de vigor, con la ventaja de mayor velocidad en la evaluación y la eliminación de errores del evaluador.

La germinación de la semilla, una variable fisiológica, permitió diferenciar el cultivar Contessa de Crystal White Wax porque presentaron valores contrastantes. Crystal White Wax presentó la germinación más baja (56%) y se diferenció de los demás cultivares porque presentó el menor peso de semilla. Katepa-Mupondwa *et al.* (1996) y TeKrony (2003) demostraron que el peso de la semilla se relaciona con el vigor de la plántula considerando que los pesos máximos de semilla representan la máxima cantidad de reservas disponibles para el embrión, condición alcanzada en el estado de madurez fisiológica. De acuerdo a estos resultados, Crystal White Wax presentó la más baja velocidad de germinación (T_{50}) en contraste con Toro, Contessa y Red Burgundy que exhibieron la germinación más rápida, 52 h (Cuadro 1). Los cultivares Crystal White Wax y Contessa se pudieron diferenciar entre ellos. Cojumatlán, Toro y Red Burgundy con base a estas variables están en un grupo aparte. La semilla de Red Burgundy almacenada por más de un año en comparación con la semilla fresca de los otros cultivares, presentó alto porcentaje (73%) y rápida germinación (52 h).

El éxito del análisis de proteínas para diferenciar claramente los cinco cultivares se basó en la amplitud del polimorfismo o variación proteínica y un método de alta sensibilidad que conforma los procedimientos estándares. La precisión es un componente esencial de la metodología usada en este estudio: 1) las proteínas se aislaron de semillas seleccionadas en el momento de la germinación, cuando la longitud de la radícula fue ≤ 1 mm; 2) bajo esta condición sólo las proteínas de

Most reserve proteins of seeds lack enzymatic activity, are chemically stable and have been widely utilized to identify genotypes (Hahn and Schöberlein, 1999; Pallares *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000).

Chauhan *et al.* (2003) and Drzewiecki (2001) performed studies to characterize by means of single seed proteins varieties of *Sorghum* and *Amaranthus*; however, they may be involving in such results the protein from nonviable seeds. This may impact in some extent their results, since the nonviable seeds present in any commercial seed lot may vary from 0 to 20% (Rodo and Marcos-Filho, 2003).

CONCLUSIONS

The results revealed great differences based in the physical and physiological traits of the onion seed cultivars under study. Based on these variables the cultivars Crystal White Wax and Contessa could be differentiated from each other. Cojumatlán, Toro and Red Burgundy were gathered in a separated group of cultivars. It was demonstrated that based on their specific patterns of seed proteins, each cultivar was characterized. Precision was an essential component of the methodology performed in this study to assure the confidence of the results obtained.

ACKNOWLEDGMENTS

The author wishes to thank to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, for providing a Doctoral fellowship (70459).

CITED LITERATURE

- Becerra, V., y M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc. (Chile)* 60(3): 270-281.
- Cadger, C., and J. Hall. 2004. Thousand seed weight of barley seed and its relationships to germination. *In: Memories of 27th ISTA Congress, Budapest, Hungary*. May 13-24.
- Chauhan, P., C. Ram, A. Mann, and V. P. Sangwan. 2002. Molecular weight analysis of seed proteins of forage sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Seed Sci. Tech.* 30: 11-16.
- Cook, R. J. 1995. Varietal identification of crop plants. *In: New Diagnostics in Crop Science*. Skerrit I. H., and R. Apples (eds). CAB international. UK. pp: 33-63.
- Draper, S. R., and P. D. Keefe. 1989. Machine vision for the characterization and identification of cultivars. *Plant Varieties and Seeds* 2: 53-62.
- Drzewiecki, J. 2001. Similarities and differences between *Amaranthus* species and cultivars and estimation of outcrossing rate on the basis of electrophoretic separations of urea-soluble seeds proteins. *Euphytica*. 119: 279-287.
- El-Bendary, A. A., Y. Mabrouk, and A. El-Metainy. 1998. Peroxidase isozyme variants as genetic markers for early evaluation of Fe-efficiency and Fe-nutritional status in maize lines. *Field Crops Res.* 59: 181-185.

las semillas viables son involucradas en este estudio, evitando las proteínas que pueden estar presentes en semilla anormales no viables; 3) el proceso metodológico y manipulación de los materiales se llevaron a cabo con alta precisión para asegurar la confiabilidad de los resultados.

El análisis de proteínas efectuado demostró que cada cultivar de cebolla se diferenció claramente. Es común encontrar bajo polimorfismo (Becerra y Paredes, 2000; Wang *et al.*, 2000); por tanto, se detectó un número relativamente bajo de proteínas (27 máximo) en este estudio. De estas proteínas, 55.55% y 14.28% llegaron a ser polimórficas en el caso de los cultivares Toro y Red Burgundy. Ahora se acepta que cada organismo comúnmente experimenta modificaciones significativas en su genoma mediante una serie de mutaciones puntuales progresivas, mecanismo que explica la generación de numerosos alelos de un único gen o por el emplazamiento de uno o más por los correspondientes derivados de otros organismos (recombinación genética). Este análisis de proteínas de semillas ha permitido detectar la variabilidad genética interespecífica presente en estos cultivares y con base en ello diferenciar cada uno de los demás.

La mayoría de las proteínas de reserva no tienen actividad enzimática, son químicamente estables y se han usado ampliamente para identificar genotipos (Hahn y Schöberlein, 1999; Pallares *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000).

Chauhan *et al.* (2003) y Drzewiecki (2001) realizaron estudios para caracterizar variedades de *Sorghum* y *Amaranthus* mediante proteínas de semillas solas; sin embargo, ellos pueden haber involucrado en sus resultados a las proteínas de semillas no viables. Esto puede impactar sus resultados, ya que las semillas no viables presentes en un lote comercial pueden variar de 0 a 20% (Rodo y Marcos-Filho, 2003).

CONCLUSIONES

Los resultados revelan grandes diferencias basadas en características físicas y fisiológicas de la semilla de los cultivares de cebolla estudiados. Basado en estas variables los cultivares Crystal White Wax y Contessa se pueden diferenciar entre sí. Cojumatlán, Toro y Red Burgundy fueron asociados en un grupo separado de cultivares. Pudo demostrarse que basado en sus patrones específicos de proteínas, cada cultivar fue identificado. La precisión fue un componente esencial de la metodología utilizada en este estudio para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

—Fin de la versión en Español—



- Ferreira, J. J., E. Alvarez, M. A. Fuelleo, A. Roca, and R. Giradez. 2000. Determination of outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. Using seed protein markers. *Euphytica*. 113: 259-263.
- Hahn H., and W. Schöberlein. 1999. Characterization and identification of *Festulolium* hybrids by electrophoresis of seed proteins. *Seed Sci. Tech.* 27: 525-542.
- ISTA. (International Seed Testing Association). 1999. International Rules for Seed Testing. *Seed Sci. and Tech.* 27 supplement.
- Katepa-Mupondwa, F. M., D. K. Barnes, and S. R. Smith Jr. 1996. Influence of parent and temperature during pollination on alfalfa seed weight and number of seeds per pod. *Can. J. Plant Sci.* 76: 259-262.
- Laemmly, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lowry, L. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measure with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Morales A., D. L. Medina M., y B. D. Yaguache C. 2004. Diversidad genética, filogenética y distribución geográfica del genero *Vasconcellea* en el Sur de Ecuador. *Lyonia*. 7(2): 15-27. Disponible en: <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.241.1>
- Moroto B., J. V. 1989. *Horticultura Herbácea Especial*. Ed. Mundi prensa. Madrid, España. 568 p.
- McDonald M. B., A. L. Hoffmaster, K. Fujimura, and M. A. Bennett. 2005. Computer imaging of soybean seedlings for vigor testing. *Seed News* 9(1):8-9.
- Pallares, I., L. Ferrari, and M. Ritta. 2000. Discrimination between seed storage proteins of *Lotus tenuis* and *Lotus corniculatus* by P.A.G.E. *Seed Sci. Tech.* 28: 769-777.
- Pinhero, R. G., M. V. Rao, G. Paliyath, D. P. Murr, and A. Feltcher. 1997. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationships to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Phys.* 114: 95-704.
- Rodo, A. B., and J. Marcos-Filho. 2003. Onion seed vigor in relation to plant growth and yield. *Horticultura Brasileira*. 21(2): 220-226.
- SAS. 1999. *Statistical Analysis System for Windows*. Release 8.01. SAS Institute Inc., Cary, N. C. USA.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2007. Avance de siembras y cosechas ciclo otoño-invierno 2006-2007. Disponible en http://www.siea.sagarpa.gob.mx/integral/Agricola/Avance/cebo_oi.pdf (verificado 3 de octubre de 2007).
- SNICS (Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). 2003. Lineamientos normativos para la inscripción en el catálogo de variedades factibles de certificación. SNICS/SAGARPA. México. pp: 1-7. disponible en: www.sagarpa.gob.mx/snics/archivos/11-c-i.pdf (verificado 22 de febrero de 2006).
- Stonoyanova, S. D., and K. D. Kolev. 2001. Electroforesis de gliadina en la evaluación del germoplasma de trigo búlgaro. Disponible en http://www.Ipgri.cgiar.org/publications/pgnewsletter/08glia_es.htm (verificado: 30 de abril de 2001).
- TeKrony, D. M. 2003. Precision is an essential component in seed vigour testing. *Seed Sci. Tech.* 31: 435-447.
- van de Vooren, J. G., and G. W. A. M. van der Heijden. 1993. Measuring the size of french beans with image analysis. *Plant Varieties and Seeds*. 6: 47-53.
- Wang, X. F., R. Knoblauch, and N. Leist. 2000. Varietal discrimination of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. *Seed Sci. Tech.* 28: 521-526.