Rev. Fitotec. Mex. Vol. 23. 265-276. 2000

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) POR SUS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE GLIADINAS Y GLUTENINAS

WHEAT (*Triticum aestivum* L.) CULTIVARS IDENTIFICATION BY GLIADIN AND GLUTENIN ELECTROPHORETIC PATTERNS

Juan Legaria Solano[1], Georgina Ponce Romero[2] y Abel Muñoz Orozco[3]

RESUMEN

Se caracterizaron 10 variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) por sus patrones electroforéticos de gliadinas y gluteninas, mostrando cada una de ellas un perfil diferente. Los materiales presentaron mayor variación en su composición de gliadinas que en la de las subunidades de gluteninas. La caracterización electroforética de individuos integrantes de las diferentes variedades permitió determinar la pureza varietal en forma rápida y eficiente, empleando un tamaño de muestra pequeño. Detectándose para la Colección 1748 procedente de la Mixteca Oaxaqueña falta de pureza genética, tanto con gliadinas como con gluteninas y para la variedad Genaro T81 también con respecto a las gluteninas. Temporalera M87 y la Selección 10 mostraron una constitución de individuos homogéneos para ambas proteínas.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Triticum aestivum L., proteínas de reserva, variabilidad genética, pureza genética.

SUMMARY

The electrophoretic patterns of gliadins and gluteninswere used to identify and characterize ten varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.). The variability in composition was higher in gliadins than glutenin subunits. The electrophoretic characterization of individuals belonging to different varieties was used to assess varietal purity. This is a rapid and efficient methodology which takes advantage of requiring a very small sample. Glutenins and gliadins patterns showed that there is a lack of varietal purity for the Collection 1748, whereas variety Genaro T81 only showed differences for glutenins. Variety Temporalera M87 and Selection 10 had homogenity in both proteins electrophoretic patterns.

ADDITIONAL INDEX WORDS

Triticum aestivum L., storage proteins, genetic variability, genetic purity.

INTRODUCCIÓN

El proceso de producción de semillas se inicia con los programas de mejoramiento de plantas de interés económico emprendidos por las diferentes instituciones de investigación, cuyo objetivo ha sido la obtención de variedades mejoradas para su utilización por parte de los productores en las diferentes áreas del país.

La decisión más importante por parte de los agricultores en la adquisición de la semilla para su siembra consiste en la selección del cultivar más apropiado. Esta decisión

[1] Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5. Carretera México-Texcoco. CP.56230. Chapingo, México. Tel y Fax:01(595) 2-1500 y 2-1642.

[2] Instituto de Biotecnología. UNAM. Av. Universidad 2001, Chamilpa. CP. 62210. Cuernavaca, Morelos. Tel. y Fax: 01(73) 29-1658 y 17-2388.

[3] Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados. Km. 35.5. Carretera México-Texcoco. CP.56230. Montecillo, México. Tel. y Fax: 01(595) 20262

Fecha de Recepción: 2 de Septiembre de 1999.
Fecha de Aprobación: 14 de Agosto del 2000.

toma en cuenta varios factores: rendimiento, madurez, calidad, resistencia a plagas y enfermedades, respuesta a condiciones ecológicas, aplicación de fertilizantes, plaguicidas y prácticas culturales; así como otras características tan importantes como la pureza de la variedad.

Asegurar la pureza de los lotes de semilla implica establecer programas de certificación que permitan mantener semilla de alta calidad y genéticamente pura. Para satisfacer este objetivo y poder diferenciar entre sí los cultivares de trigo, tradicionalmente se evalúan características morfológicas y fisiológicas, sin embargo, algunas de ellas son altamente influenciadas por el ambiente, trayendo como consecuencia que varios de los nuevos cultivares liberados sean fenotípicamente similares o cerradamente relacionados. Además, el mejoramiento continuo de las variedades de trigo ha conducido a la obtención de un gran número de materiales con características de calidad de la harina diferente que son aprovechadas por la industria, sin embargo, estos genotipos presentan muchas veces características morfológicas semejantes o iguales, lo que imposibilita su diferenciación en base a dichas características. Es por esto que se hace necesario probar e implementar nuevas metodologías sencillas que aseguren la identidad y la pureza de cada variedad y que puedan ser útiles para diferenciar los materiales e incluso para proteger los derechos del obtentor sobre la misma.

El presente trabajo se propuso identificar y determinar la pureza de 10 cultivares de trigos mexicanos de origen diverso por sus patrones electroforéticos de gluteninas y gliadinas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Las proteínas de reserva gluteninas y gliadinas son los componentes principales del gluten del trigo, integradas por subunidades de diferente peso molecular. Las propiedades visco-elásticas de la harina se originan tanto de la estructura de estas proteínas como de las interacciones que se establecen entre las mismas. La mayoría de las gliadinas tienen pesos moleculares entre los 16 y los 50 kDa y contienen cadenas polipeptídicas únicas cuyas conformaciones son establecidas por enlaces disulfuro (Nielsen *et al.*, 1968; Beckwith *et al.*, 1966; Jones *et al.*, 1961; Huebner y Rothfus, 1968). Las gluteninas están constituidas por subunidades de peso molecular entre los 20 y 100 kDa, unidas entre sí por puentes disulfuro para conformar proteínas con masa de 50 a 2000 kDa o más (Woychick *et al.*, 1964; Bietz y Wall, 1972).

Las proteínas de reserva del gluten del trigo son insolubles en agua o en soluciones salinas diluidas, pero alrededor de la mitad (fracción de gliadinas) son solubles en soluciones conteniendo etanol al 70% o urea 2 M (Bietz y Wall, 1972). La electroforesis en gel ha mostrado que la fracción de gliadinas contiene al menos 40 especies de proteínas diferentes (Wrigley y Sheperd, 1973) que frecuentemente muestran variación entre cultivares (Zillman y Bushuk, 1979).

La fracción del gluten insoluble en etanol al 70% (gluteninas) puede ser de importancia para determinar la calidad de la harina dado que contiene agregados de proteínas de alto peso molecular que pueden ser disociados en sus constituyentes por la extracción con un amortiguador a base de 2-mercaptoetanol y el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) que rompen directa o indirectamente los enlaces disulfuro y de hidrógeno e interacciones hidrofóbi-

cas (Bietz y Wall, 1972). Luego de dichos tratamientos, las subunidades componentes pueden separarse por electroforesis en geles SDS-poliacrilamida y los patrones electroforéticos permiten identificar variedades de trigo (Wrigley *et al.*, 1982) e investigar la genética y la bioquímica del loci codificando para esas proteínas (Mechan *et al.*, 1978; Shewry *et al.*, 1978). Al respecto, Bushuk y Zillman (1978) clasificaron variedades de trigo de acuerdo con los patrones electroforéticos de gliadinas. Obtuvieron patrones únicos para la mayoría de los cultivares utilizados, excepto para los que provenían de los mismos progenitores, cuyo electroforegrama fue muy semejante. Por otro lado, Bietz *et al.* (1975) examinaron 80 cultivares de trigo hexaploide, encontrando que 75 de ellos tenían patrones de subunidades de gluteninas idénticos o muy similares. En contraste, Orth y Bushuk (1973) detectaron mayor variación luego de evaluar 26 variedades, también de trigo hexaploide.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético. Se evaluaron 10 cultivares de trigo de origen diferente y características morfológicas contrastantes. Las colecciones 1737, 1740, 1746 y 1748, mejor conocidas como "trigos ventureros" son originarias de la Mixteca Alta de Oaxaca (Legaria y Muñoz-Orozco, 1992). Genaro T81, Gálvez M87 y Temporalera M87 son variedades comerciales liberadas y las Selecciones 10, 11 y 12 provienen del Programa de Resistencia a Sequía del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados.

Extracción de proteínas. Se realizó según el método propuesto por Lawrence y Sheperd (1980). Las gluteninas se extrajeron con un amortiguador a base de Tris 0.125 M, SDS al 8% (p/v), glicerol al 20% (v/v), azul de bromofenol al 0.002% (p/v) y 30 µL de 2-mercaptoetanol a pH 6.8. La solución de extracción de las gliadinas consistió de 2-propanol al 50% (v/v), ácido acético al 1% (v/v) y 2-mercaptoetanol al 1% (v/v).

Los patrones electroforéticos entre cultivares se determinaron en muestras de 10 semillas de cada variedad, mismas que se disectaron a la mitad, desechándose la parte que contiene el embrión. La mitad restante (correspondiente al endospermo) se incubó en el amortiguador de extracción (100 µL por unidad de grano), a temperatura ambiente durante toda la noche.

La pureza varietal se evaluó en muestras de 4 ó 5 granos individuales por cultivar, purificándose las proteínas según el protocolo antes descrito. Los experimentos y patrones electroforéticos se realizaron por triplicado.

Preparación de la muestra. Para las gliadinas se tomaron 15 µL del extracto y se mezclaron con 15 µL de solución amortiguadora compuesta por: Tris 1.5 M, pH 6.8; SDS al 20 % (p/v); 2-mercaptoetanol al 10 % (v/v), azul de bromofenol al 2% (p/v) y glicerol al 20% (v/v). Para las gluteninas, se tomaron 30 µL del extracto y se cargaron directamente en el gel.

Electroforesis unidimensional. Se realizó en geles de 10 x 8 cm y 0.75 mm de espesor con poliacrilamida al 10% (p/v), preparados de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). El gel se introdujo en una cámara de electroforesis vertical marca Hoefer, conteniendo solución amortiguadora de corrida: Tris base 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS al 0.10% (p/v).

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 3 horas a temperatura ambiente. Terminada la electroforesis, el gel se tiñó

durante una hora en una solución de azul de Coomassie al 0.1% (p/v), metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). Una vez teñido, el gel se destiñó con una solución de metanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) hasta eliminar el fondo azul del gel.

Análisis de los patrones de proteínas. El índice de similitud entre los patrones de proteínas de los diferentes cultivares se calculó utilizando la fórmula propuesta por Nei y Li (1979), expresada en porcentaje: $S= 2\eta xy/(\eta x + \eta y)$, donde ηx y ηy son el número de bandas en cada cultivar y ηxy es el número de bandas similares en ambos cultivares. Las distancias genéticas para la elaboración de los dendogramas se calcularon según la fórmula $d= -\ln S$ (Nei, 1978; Swofford y Olsen, 1990); donde d, es la distancia genética entre cultivares y S es el índice de similitud.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica de electroforesis en geles SDS-poliacrilamida permitió la identificación de 10 variedades de trigo por su variación en los perfiles de proteínas de reserva gliadinas y gluteninas.

En la Figura 1 se muestran los patrones electroforéticos de gliadinas en 10 cultivares de trigo. El número de bandas presentes en cada cultivar varió en un intervalo de 12 a 20, detectándose 10 patrones diferentes, cada uno correspondiendo a cada variedad. El

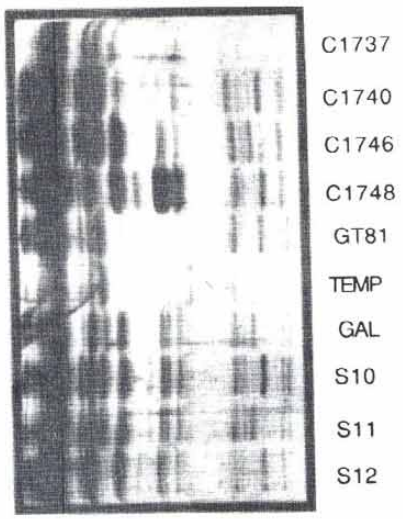


Figura 1. Patrones electroforéticos de gliadinas en 10 cultivares de trigo.

examen de los perfiles reveló que algunas bandas o combinaciones de las mismas, son mutuamente excluyentes. Los resultados indican que existe diferencia en el número, posición e intensidad de las bandas en los patrones electroforéticos de las variedades, lo que sugiere que existe polimorfismo y que la metodología empleada es adecuada para su identificación y caracterización. En el Cuadro 1 se muestra la matriz de los índices de similitud en porciento entre las variedades de trigo por sus patrones de gliadinas. Los cultivares más emparentados fueron los "trigos ventureros" Colección 1746 y 1740, originarios de la Mixteca Alta Oaxaqueña, con un índice de similitud de 96%, lo que significa que tienen un genotipo idéntico o que provienen de progenitores afines. Los materiales más distantes fueron Temporalera M87 y la Colección 1748, de orígenes diferentes, con una similitud del 45%. Esta matriz permitió el cálculo de las distancias genéticas para construir el dendograma que se muestra en la Figura 2, donde se representa el agrupamiento de las variedades.

El primer agrupamiento se dio entre las Colecciones 1740 y 1746 a una distancia genética de 0.04 y el último ocurrió a una distancia de 0.40. En el dendograma se aprecia la formación de 3 grupos. El grupo I, integrado por las Colecciones 1740, 1746, S11 y Gálvez M87 presentó patrones electroforéticos con más bandas afines entre sí que con las otras variedades (Figuras 1 y 2). El grupo II se formó con la Colección 1748 y las Selecciones 10 y 12 y el grupo III quedó constituido por las variedades Temporalera M87, Genaro T81 y la Colección 1737.

No se detectó correlación entre el patrón de proteínas y las características del ambiente donde las variedades se cultivan normalmente o las condiciones para las que fueron liberadas. Por ejemplo, las variedades Gálvez M87 y Temporalera M87 son apropiadas para ambientes de secano, provienen del mismo programa de fitomejoramiento y muestran una similitud de sólo un 67%; mientras que Genaro T81, una variedad de riego tuvo un 80% de similitud con Temporalera M87 (Figuras 1 y 2, Cuadro 1).

Cuadro 1. Índices de similitud (%) de gliadinas en 10 cultivares de trigo. La matriz se generó asignando el valor numérico de 0 al evento ausencia de banda proteica y de 1 a la presencia de la misma. Los valores presentados se calcularon mediante la fórmula de Nei y Li (1979).

Cultivar	C1740	C1746	C1748	GT81	TEMP	GAL	S10	S11	S12
C1737	69	67	67	74	84	64	64	67	57
C1740		96	83	64	67	77	92	89	57
C1746			80	61	64	81	89	93	80
C1748				60	45	75	75	72	91
GT81					80	54	82	69	60
TEMP						67	75	80	54
GAL							77	89	75
S10								89	83
S11									72

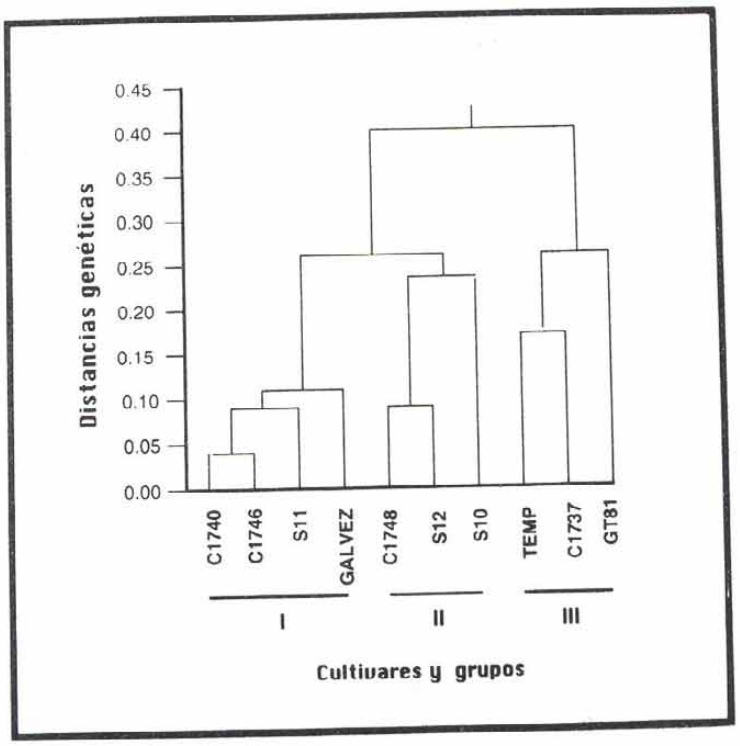


Figura 2. Agrupamiento de 10 cultivares de trigo por la similitud de sus gliadinas.

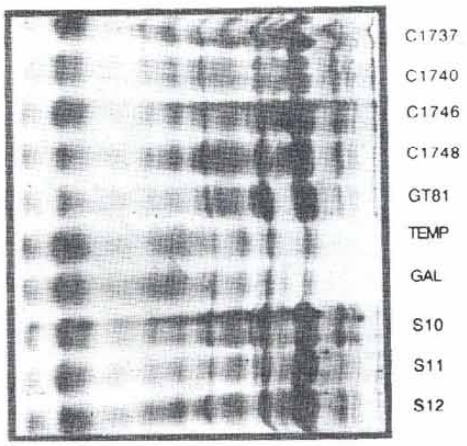


Figura 3. Patrones electroforéticos de gluteninas en 10 cultivares de trigo.

Cuadro 2. Índices de similitud (%) de gluteninas en 10 cultivares de trigo. La matriz se generó asignando el valor numérico de 0 al evento ausencia de banda proteica y de 1 a la presencia de la misma. Los valores presentados se calcularon mediante la fórmula de Nei y Li (1979).

Cultivar	C1740	C1746	C1748	GT81	TMP	GAL	S10	S11	S12
C1737	81	88	88	82	70	74	88	82	87
C1740		**90**	**90**	84	61	65	88	76	89
C1746			**95**	**95**	76	79	**98**	87	79
C1748				**90**	76	79	**95**	88	**98**
GT81					80	78	**93**	82	88
TEMP						**97**	79	70	78
GAL							82	74	81
S10								**90**	**95**
S11									**90**

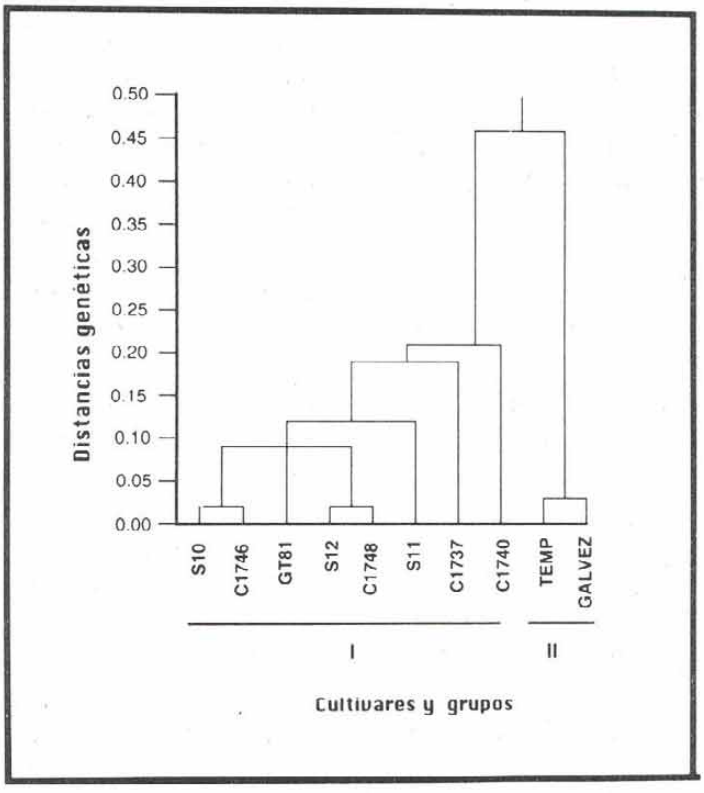


Figura 4. Agrupamiento de 10 cultivares de trigo por la similitud de sus gluteninas.

Adicionalmente, se examinó la ocurrencia de variación en los patrones de bandeo de las subunidades de gluteninas entre las mismas variedades (Figura 3). El número de bandas presentes varió entre 15 y 23, mostrando cada cultivar un patrón único. Por el análisis de estos perfiles se determinó que las variedades Temporalera M87 y Gálvez M87 están muy emparentadas, con un coeficiente de similitud del 97% y las menos relacionadas fueron Temporalera M87 y la Colección 1740 con un índice de 61% (Cuadro 2).

Con los valores de las distancias genéticas se conformaron 2 grupos, el grupo I quedó integrado por la mayoría de los cultivares evaluados: Selección 10, Colección 1748, Genaro T81, Selección 12, Colección 1746, Selección 11, y las Colecciones 1737 y 1740. Dentro de este agrupamiento se observó un subgrupo con más bandas afines entre sí, constituido por los cultivares Genaro T81, las Colecciones 1746 y 1748 y las Selecciones 10 y 12. El grupo II quedó compuesto por las variedades Gálvez M87 y Temporalera M87 (Figura 4).

Del análisis conjunto de los resultados se infiere que la caracterización de los cultivares de trigo por sus patrones electroforéticos de gliadinas permitió la detección de mayor polimorfismo que la evaluación de los perfiles de gluteninas.

Por otro lado, los porcentajes de similitud, las distancias genéticas y los agrupamientos son diferentes para los materiales, según si se analiza el patrón de gliadinas o el de gluteninas (Figuras 1, 2, 3 y 4; Cuadros 1 y 2). Estas diferencias son comprensibles si se considera que ambas proteínas son codificadas por conjuntos genéticos diferentes y que la tasa de evolución de los mismos en cada cultivar pudo ocurrir también en grados y direcciones diferentes (Galili y Feldman, 1983; Lawrence y Sheperd, 1980; Masci *et al.*, 1998).

Se evaluó la pureza genética a través del análisis del patrón de proteínas gliadinas y gluteninas de individuos de las variedades Genaro T81, Colección 1748, Temporalera M87 y Selección 10 (Figuras 5 (B y C) y 6 (B y C). Los resultados del análisis indicaron que las muestras correspondientes a la Colección 1748 y a la variedad Genaro T81 son genéticamente impuras, aún cuando por sus características morfo-fisiológicas parecieran estar constituidas por individuos idénticos u homogéneos. Los individuos 1, 3 y 5 de la Colección 1748 mostraron un perfil electroforético diferente al de los individuos 2 y 4 tanto en el patrón de gliadinas como de gluteninas (Figuras 5B y 6B). Para la variedad Genaro T81, el patrón de gliadinas de la muestra de 5 individuos tomados al azar indicó que la variedad es genéticamente pura, sin embargo, el patrón electroforético de gluteninas del individuo número 5 difirió del resto de los individuos analizados (Figuras 5B y 6B). La Colección 1748, procedente de la Mixteca Alta Oaxaqueña, parece estar conformada por una mezcla de dos variedades, mientras que la Genaro T81, posiblemente pura al momento de su liberación, pudo contaminarse durante manipulaciones sucesivas. Este encuentro sugiere que durante las pruebas de pureza deben evaluarse al menos dos marcadores con el fin de detectar posible polimorfismo y asegurar así la pureza de las muestras.

Temporalera M87 y la Selección 10 mostraron estar constituidos por individuos homogéneos en sus patrones de gliadinas y gluteninas por lo que pueden considerarse genéticamente puros (Figuras 5C y 6C).

Los resultados de esta investigación sugieren que la conjunción futura de marcadores morfológico-fisiológicos y moleculares co-

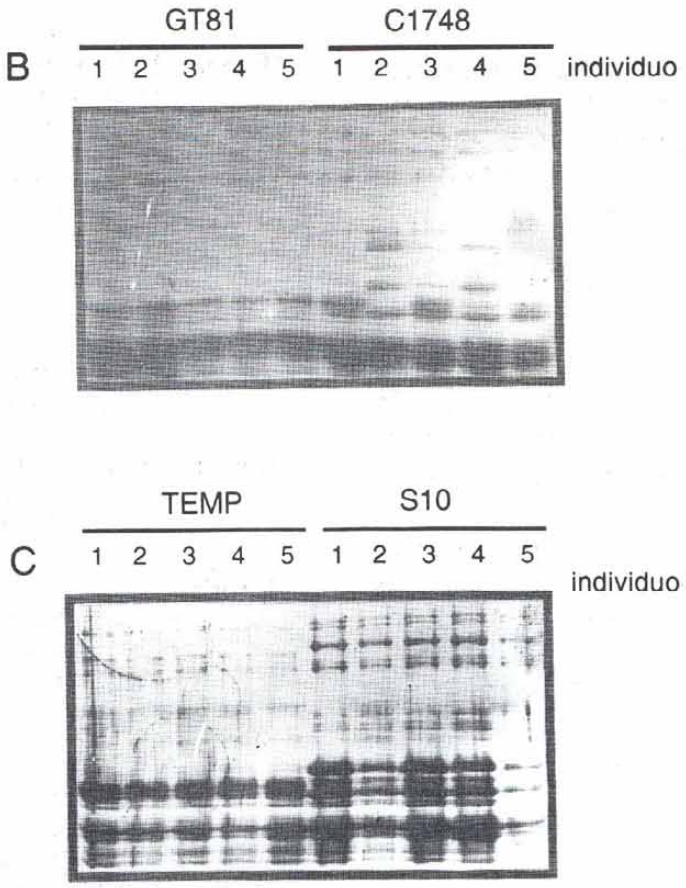


Figura 5. Comparación del patrón de gliadinas de individuos de las variedades Genaro T81, Colección 1748, Temporalera y Selección 10.

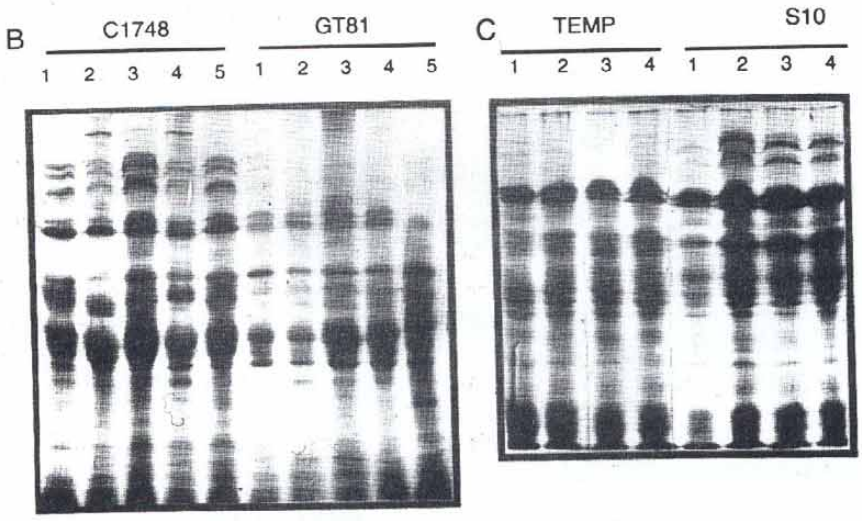


Figura 6. Comparación del patrón de gluteninas de individuos de las variedades Colección 1748, Genaro T81, Temporalera y la Selección 10.

mo las proteínas de reserva puede constituir una herramienta integral y objetiva para asegurar la identidad y la pureza de las variedades de trigo, utilizando un tamaño de muestra pequeño.

CONCLUSIONES

La metodología empleada permitió identificar las variedades de trigo. A cada una le asoció un patrón electroforético diferente, tanto para gliadinas como para gluteninas.

Los materiales mostraron mayor polimorfismo en la composición de gliadinas que en la de las subunidades de gluteninas.

La caracterización electroforética de los individuos integrantes de las variedades, permitió determinar pureza varietal de manera rápida y eficiente, empleando un tamaño de muestra pequeño.

BIBLIOGRAFÍA

Beckwith, A.C., H.C. Nielsen., J.S. Wall., and F.R. Huebner. 1966. Isolation and characterization of a high-molecular-weight protein from wheat gliadin. Cereal Chem. 44:221.

Bietz, J.A., and J.S. Wall. 1972. Wheat gluten subunits: molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. Cereal Chem. 49: 416-430.

Bietz, J.A., K.W. Sheperd., and J.S. Wall. 1975. Single-kernel analysis of glutenin use in wheat genetics and breeding. Cereal Chem. 52: 513-532.

Bushuk, W., and R.R. Zillman. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. Can. J. Plant. Sci. 58: 505-513.

Galili, G., and M. Feldman. 1983. Genetic control of endosperm proteins in wheat. Theor. Appl. Genet. 64: 97-101.

Huebner, F.R., and J.A. Rothfus. 1968. Gliadin proteins from different varieties of wheats. Cereal Chem. 45: 242.

Jones, R.W., G.E. Babcock., N.W. Taylor., and F.R. Senti. 1961. Molecular weights of wheat gluten fractions. Arch. Biochem. Biophys. 94: 483.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lawrence, G.J., and K.W. Sheperd. 1980. Variation in glutenin protein subunits of wheat. Aust. J. Biol. Sci. 33: 221-233.

Legaria, S.J.P., y A. Muñoz-Orozco. 1992. Interacción de variedades de trigo con ambientes secos de la Mixteca Alta Oaxaqueña. Rev. Fitotec. Mex. 15: 40-50.

Masci, S., R. D'Ovidio., D. Lafiandra., and D.D. Kasarda. 1998. Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. Plant Physiol. 118: 1147-1158.

Mechan, D.K., D.D. Kasarda., and C.O. Qualset. 1978. Gene aspects of wheat gliadin proteins. Biochem. Genet. 11: 831-853.

Nielsen, H.C., A.C. Beckwith., and J.S. Wall. 1968. Effect of disulfide-bond cleavage on wheat gliadin fractions obtained by gel filtration. Cereal. Chem. 45:37.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 5269-5273.

Orth, R.A., and W. Bushuk. 1973. Studies of glutenin. II. Relation of variety, location of growth, and baking quality to molecular weight distribution of subunits. Cereal Chem. 50: 191-197.

Shewry, P.R., H.M. Pratt., R.A. Finch., and B.J. Miflin. 1978. Genetic analysis of hordein

polypeptides from single seeds of barley. Heredity 40: 463-466.

Swofford, D.L., and G.J. Olsen. 1990. Phylogeny reconstruction. *In*: Molecular Systematics. David M. Hillis and Craig Moritz (eds.). Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA. Pp. 411-501.

Woychik, J.H., F.R. Huebner., and R.J. Dimler. 1964. Reduction and starch gel electrophoresis of wheat gliadin and glutenin. Arch. Biochem. Biophys. 105: 151.

Wrigley, C.W., J.C. Autran., and W. Boshuk. 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grains proteins. *In*: Advances in cereal science and technology. Vol. 5. Y. Pomeranz (ed.). Amm. Assoc. Cereal. Chem. St. Paul, M.N. USA. p. 211.

Wrigley, C.W., and K.W. Sheperd. 1973. Electrofocusing of grain proteins from wheat genotypes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 209: 154-162.

Zillman, R.R., and W. Bushuk. 1979. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. III. Catalogue of electrophoregram formulas of Canadian wheat cultivars. Can. J. Plant. Sci. 59: 287-298.