

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES CHILENOS DE TRIGOS DE PAN (*Triticum aestivum* L.) Y TRIGOS CANDEALES (*Triticum durum* Def.) BASADA EN PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE GLIADINAS¹

Characterization of Chilean soft wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum durum* Def.) cultivars based on gliadin electrophoretic profiles

Patricio Hinrichsen R.², Ximena Opitz B.², Ignacio Ramírez A.² y Carlos Muñoz S.²

SUMMARY

It has been established A methodology for the varietal identification of bread and durum wheat has been established based on the electrophoretic pattern of the ethanol-extracted seed proteins, corresponding mainly to gliadins from the gluten. The gliadins were resolved in a 10% acid polyacrylamide (PAA) gel (A-PAGE, pH 3.1), preceded by a stacking gel at 4.5% in PAA. The electrophoretic patterns were reproducible among individual grains. Based on the comparison to a well-characterized variety (Marquis), the gliadin groups were separated and identified. Considering the 47 analyzed varieties, only a few showed the same protein pattern. In spite of these limitations, but considering its simplicity, this methodology is recommend as the way to differentiate wheat varieties, as well as to determine the uniformity in commercial seed stocks. Finally, the individual analysis of 12 seeds per variety showed some heterogeneity at the electrophoretic pattern for some of the analyzed varieties; this could be explained as a true case of heterozygosity, or could be the result of mixtures produced during the mechanical handling of the grains.

Key words: A-PAGE; protein electrophoresis; gliadin; wheat; *Triticum aestivum* L.; *Triticum durum*.

INTRODUCCIÓN

La identificación de variedades en especies cultivadas ha cobrado gran relevancia. Por una parte, existe la necesidad de identificar las nuevas variedades para defender los derechos del obtentor, a la vez que es necesario conocer el patrón de las variedades tradicionales. Por otra parte, el usuario necesita disponer de una herramienta que asegure la identidad del producto adquirido (Staub y Meglic, 1993). Asimismo, los estándares de calidad imperantes exigen tener un producto de una homogeneidad certificada, lo que implica determinar el grado de pureza de cada partida de semillas. Tradicionalmente esto se ha enfocado mediante ensayos de campo, donde se estudian descriptores botánicos y agronómicos, ensayos que por su naturaleza son costosos y lentos. Estos indicadores y métodos podrían estar influenciados por condiciones ambientales, como clima, enfermedades, estado nutricional de las plantas,

etc. Buscando aumentar la eficiencia de estas determinaciones, especialmente en términos de asertividad y tiempo requerido, en los últimos años se han desarrollado enfoques analíticos alternativos, basados en la obtención de un «perfil molecular» o «fingerprinting», el cual es característico para cada variedad, y no se vería modificado por las condiciones de crecimiento de las plantas (Morell *et al.*, 1995). El desarrollo de estos perfiles se basa en metodologías que analizan directamente el genoma de los individuos, o una expresión fenotípica representativa de este genoma, como son las proteínas de reserva de las semillas.

En el caso del trigo y de otras especies del género *Triticum*, se ha recurrido al análisis de las proteínas de la semilla para identificar variedades (Bushuk y Zillman, 1978; Werner *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1992; revisado por Lookhart y Bean, 1995a), para estudiar la diversidad genética del germoplasma (Damania y Somaroo, 1988; Ciaffi *et al.*, 1993; Graybosch *et al.*, 1994), o para definir las relaciones filogenéticas entre variedades (Cox *et al.*, 1985).

Las proteínas mayoritarias del grano de trigo son albúminas, globulinas y prolaminas (clasificación

¹Recepción de originales: 10 de junio de 1997.

Trabajo financiado por la Fundación Fondo de Investigaciones Agropecuarias (FIA), Proyecto N° 012-92.

²Centro Regional de Investigación La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

original de Osborne, revisado por Lookhart y Bean, 1995b). Las prolaminas conforman el gluten, y están constituidas por un 50% de gliadinas, un 40% de gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS) y un 10% de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) (Payne *et al.*, 1984). En conjunto, gliadinas y gluteninas son las proteínas más abundantes de la semilla, constituyendo la fuente de reserva de N del grano. Todas estas fracciones proteicas son extraídas diferencialmente, usando solventes orgánicos, o detergentes en solución acuosa. Por ejemplo, al usar etanol 70%, el extracto se enriquece en gliadinas, aunque se co-extraen algunas LMW-GS (Guiraud *et al.*, 1990), mientras que una extracción de gluteninas se logra en presencia de un agente reductor y detergentes no iónicos (Weegels *et al.*, 1994). Para separar e identificar las prolaminas presentes en el grano, se han optimizado numerosas tecnologías analíticas, entre las que se puede mencionar la electroforesis en geles de almidón (Woychik *et al.*, 1961), la electroforesis de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE; Du Cros *et al.*, 1980; Marchylo *et al.*, 1990) y la PAGE en medio ácido (A-PAGE; Bushuk y Zillman, 1978; Jones *et al.*, 1982). Aunque las técnicas más empleadas para el análisis de prolaminas han sido las de tipo electroforético (revisado por Guiraud *et al.*, 1990), más recientemente el isoelectroenfoque (Morel y Autran, 1990), la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) (Bietz, 1983) y la electroforesis capilar (EC) (Werner *et al.*, 1994) han cobrado gran relevancia, debido a su alta capacidad resolutive.

Las gliadinas son monómeros de 20 a 40 kDa, de las cuales existe una gran diversidad. La variabilidad entre genotipos estaría en parte determinada por la existencia de familias de genes de alta homología, cuya expresión estaría controlada a nivel transcripcional (Greene *et al.*, 1985; Payne, 1987). Esta alta variabilidad las convierte en buenos candidatos para ser usadas en fingerprinting de variedades. La diversidad molecular que se observa entre las gliadinas no está afectada por las condiciones agroclimáticas en que ha crecido la planta (Zillman y Bushuk, 1979; Marchylo *et al.*, 1990); sin embargo, pueden existir cambios menores en la intensidad de las bandas, lo que podría complicar la identificación varietal (Marchylo *et al.*, 1990; revisado por Peltonen y Virtanen, 1994).

El objetivo de este trabajo fue el de optimizar una metodología electroforética para separar e identificar las gliadinas presentes en algunas de las variedades de trigo más usadas en Chile en los últimos 10 años, con el propósito de establecer un catálogo que permita identificarlas y/o diferenciarlas. Un trabajo similar fue realizado por Barriga *et al.* (1983, 1985),

quienes caracterizaron las 52 variedades de trigo que hace 20 años eran las más comunes en Chile. El presente trabajo complementa y actualiza la mencionada información.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variedades analizadas

Se analizaron 47 variedades de trigo de pan y trigo candeal (38 y 9 variedades, respectivamente; ver Cuadro 1). Como patrón de referencia se incluyó la variedad Marquis, obtenida de Argentina (gentileza de la Ing. Agrónomo Julia Lúquez) y multiplicada en Chile.

Extracción de las gliadinas

Las gliadinas se extrajeron del endosperma de la semilla, modificando el protocolo de Bushuk y Zillman (1978), como se indica a continuación. Se pulverizaron algunos granos de trigo en un mortero, separándose el pericarpio de la harina. En un microtubo de 1,5 ml, se agregaron 240 µl de etanol al 70% a 60 mg de esta harina, se agitó ocasionalmente manteniéndose durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se dejó extrayendo durante la noche, y la mezcla resultante se centrifugó a 15.000xg durante 25 min. Después de separar el sobrenadante, cuidando de no arrastrar harina, se agregó un volumen igual de sacarosa al 60% en lactato de aluminio 0,25% (solución llevada a pH 3,1 con ácido láctico), conteniendo un 1% (v/v) del indicador de migración Rojo de Pironina B (solución patrón de 20 mg de colorante en 1 ml de agua destilada).

Para determinar el grado de homogeneidad intravarietal, se analizó el patrón de gliadinas extraídas individualmente de 12 granos. Para ello, se realizó la extracción igualmente en medio alcohólico, conservando las proporciones para 20 mg de harina, o en presencia de dimetilformamida (DMF) (Lafiandra y Kasarda, 1985). De acuerdo a este último método, se pesó cada grano, se pulverizó en mortero y se agregó 10 volúmenes de DMF 1,5 M (proporción 1:10, p/v). Esta mezcla se maceró dos veces, dejando reposar durante 5 minutos entre ambas. Luego se traspasó a un tubo limpio, se centrifugó a 15.000xg durante 15 min y se separó el sobrenadante cuidando de no arrastrar polvo de harina. Se midió el volumen extraído y se agregó sacarosa sólida hasta alcanzar una concentración de 30%, se disolvió y se agregó el indicador de migración Rojo de pironina B.

Los extractos se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis.

CUADRO 1. Variedades de trigos de pan y candeal analizadas, y su correspondiente pedigree**TABLE 1. Bread and durum wheat varieties analyzed, and their respective pedigrees**

Código ^a	Variedad ^b	Pedigree
751	ANTILHUE INIA	T-19236-T-1T-4T
33	AURIFÉN	CH7817-3P-4P-1P-2P-1P
752	CANDELA INIA	N-2432-8C-1C-2C-1C-3C
460	CANELO INIA	T 3044-1T-4T-12T-500H-500H
62	CARAHUE INIA	T12371-T-2P-5T
307	CHACAY INIA	76-645H-6H-5H-4H-2H, H80
104	CHASQUI INIA	CM 4264-23Y-2M-0Y
P002/97	CIKO INIA	CM39424-1Y-1M-5Y-2M-1Y-0B
41	CISNE INIA	SWM 1430-4Y-3Y-0M
2064	COYÁN INIA	H-847-9h-1h-1h
749	CUNCO INIA	T 13003-T-2T-8T
61	DALCAHUE INIA	T 12815-T-1P-1T
2841	DOMO INIA	CM62661-D-1M-1Y-3M-2Y-0M
2285	HUAYÚN INIA	CM.67458.4Y.2M.1Y.1M.3Y.0B.12M.0Y
677	KONA	T-19538-0T-1T-1T
68	LANCERO INIA	N-2989-4C-3C-3C-1C
1714	LANCO INIA	T-12990-T-1T-1T
692	LAUREL INIA	SWO73117-3A-1P-5H-S-0C
471	LAUTARO INIA	NS 2699
284	LILÉN INIA	CM 40038-6M-4Y-2M-1Y-2M-1Y-0B
748	LUMACO INIA	T-18598-T-2P-1T
57	MALIHUE INIA	T 12535-T-3P-2T
64	MAQUI INIA	H-908-0H-1H-0H
48	MILLALEU INIA	CM 33027-F-12M-1Y-6M-0Y
49	NAOFÉN	T-2494-14T-4T-1V
58	NOBO INIA	CM 33027-F-15M-500Y-0M-107B-0M
59	ONDA INIA	CM 8399-D-4M-3Y-1M-1Y-0M
687	PANKUL INIA	T-23238-T-1T-3T
P001/97	PATAGUA INIA	T6001-T-T-1T-500H-500H
747	PERQUENCO INIA	T-12200-T-16T-7T
65	PEUMO INIA	H-938-0H-11H-0H
682	PUKÉM INIA	T-20908-2T-2T-4T
3135	QUELÉN INIA	SWM-7035-6Y-4C-1C-0C
348	QUILLAY INIA	T 5996-T-T-3T-500H-500H
159	REIHUE INIA	A-18378-5P-3P-2P
472	SAETA INIA	CM69560-1M-2Y-1M-1Y-1M-0Y
274	* ALIFÉN	CH-3268-5P-3P-1P
210	* AROMO INIA	A 13979-3P-2P-3P
276	* CANDEALFEN 4	---
277	* CANDEALFEN 5	---
279	* CAPPELLI	---
144	* CHAGUAL INIA	CM 9799-126M-1M-5Y-0M
168	* CHONTA INIA	CD-39620-10P-1P-3P
167	* LICÁN INIA	CD 22344-A-8M-1Y-1M-1Y-2Y-1M-0Y
C487/95	* QUILAFÉN INIA	D.14540-1C-1Y-1C

^aClasificación usada por el Programa de Fitomejoramiento de Trigo de La Platina.

^bLas últimas nueve variedades, marcadas con un asterisco, corresponden a trigos candeales. Las restantes variedades son trigos de pan.

Electroforesis vertical de poliacrilamida en medio ácido (A-PAGE)

Las proteínas extraídas se separaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (PAA) en medio ácido (A-PAGE), compuestos de una fase superior (concentradora) y una fase inferior (resolutiva o separadora). En este tipo de geles, la migración de

las bandas a través del gel resolutivo es proporcional al tamaño y carga de cada polipéptido. El gel resolutivo estuvo compuesto de acrilamida 9,5%, N,N'-metilen-bisacrilamida 0,5%, ácido ascórbico 0,024% y sulfato ferroso 0,0002%, tamponados con lactato de aluminio 0,25% llevado a pH 3,1 con ácido láctico (Clements, 1987). Como catalizador de la reacción de polimerización se usó peróxido de hidró-

geno de 30 vols. (11 μ l para 100 ml de gel). Para la parte concentradora del gel, se preparó una matriz de PAA al 4,5%, en las mismas condiciones del gel separador. El amortiguador de corrida fue también lactato de aluminio 0,25% llevado a pH 3,1 con ácido láctico. Los tampones anódico y catódico fueron idénticos, aunque también se probó usar un tampón catódico ajustado a pH 2,6 con ácido láctico (Clements, 1987).

Para analizar la homogeneidad intravarietal (12 semillas), se usó un sistema de mini-geles de 9 x 6,5 x 0,1 cm. Estos geles se corrieron entre 10 y 15 mA (amperaje constante) por 2 a 3 horas. El volumen de muestra cargado fue de 8 μ l. Para definir los patrones de gliadinas propiamente tales, se prefirieron geles de 11 x 14 x 0,15 cm. En este caso, se cargaron entre 15 y 20 μ l de muestra por cada pocillo. Este tipo de gel se corrió a amperaje constante de 30 mA durante 3 a 4 horas. Estos geles fueron corridos por menos tiempo para incluir las gliadinas de mayor velocidad de migración, albúminas y globulinas, las que en los mini-geles no alcanzaron a ser incluidas.

La corrida electroforética se realizó a temperatura ambiente, por el tiempo necesario para que el indicador de migración (Rojo de pironina B) recorriera entre dos y tres veces el largo del gel. Dado que a pH 3,1 la mayoría de las gliadinas presentan una carga neta positiva, los electrodos se conectaron con la polaridad invertida (positivo a negativo).

Posteriormente, se fijó y tiñó en una solución de ácido tricloroacético 12% y azul de Coomassie R-250 0,05% (preparado al 1% en etanol 95%). Finalmente, el gel fue lavado en metanol 20% y ácido acético 5%, para eliminar el exceso de tinción.

Para conservar los geles, éstos fueron lavados abundantemente en agua, y luego sumergidos durante 30 minutos en una solución de 10% glicerol y 5% de etanol, antes de ser secados a temperatura ambiente entre dos hojas de papel celofán sujetas por marcos de acrílico.

Los geles fueron fotografiados con película B/N de 100 asa sobre un transiluminador.

RESULTADOS

Condiciones electroforéticas óptimas para resolver las gliadinas mediante A-PAGE

Para obtener los perfiles proteicos de gliadinas, fue necesario determinar las condiciones óptimas para resolver las bandas, de manera que se obtuvieran patrones claros y reproducibles. El mejor resultado

se obtuvo al usar un gel resolutivo al 10% de PAA, precedido de una porción de gel concentrador de PAA al 4,5%; esta combinación aumentó la compresión (resolución) de las bandas en el gel separador, haciéndolas menos anchas y disminuyendo su superposición. Aunque usando otros sistemas de tampones, las ventajas de usar un gel concentrador habían sido discutidas por Brzezinski *et al.* (1989). Por el contrario, el sistema de gradiente de pH entre 3,1 (tampón superior) y 2,6 (tampón inferior) descrito por Clements (1987) no dio buenos resultados, ya que para algunas variedades se produjo una precipitación de proteínas durante la corrida (resultados no mostrados). Además, se probó una serie de condiciones, que en resumen se traducen en lo siguiente: (i) es conveniente usar tampones de corrida preparados al momento de usarse; (ii) antes de cargar el gel, es conveniente descartar sedimentos presentes en las muestras (probablemente agregados proteicos) por centrifugación; (iii) la fuerza iónica de las muestras puede variar entre 25 y 100 mM de KCl, sin afectar el patrón electroforético; y (iv) la corrida electroforética no cambia si se realiza bajo refrigeración (4-6 °C) o a temperatura ambiente.

La reproducibilidad de la extracción y de la separación electroforética se ilustra en la Figura 1 (a y b), donde se han separado los extractos provenientes de granos individuales de las variedades Quelén y Huayún, respectivamente. En general, los patrones obtenidos fueron equivalentes usando minigeles o geles de 11 x 14 cm; eventuales diferencias, como la aparición de algunas bandas débiles, se debieron a una mayor cantidad de proteína (mayor volumen de muestra) cargada en los geles.

Patrones electroforéticos de gliadinas de variedades chilenas de trigo

Se obtuvo el patrón electroforético de gliadinas para cada una de las variedades estudiadas. En la Figura 2 se muestran los patrones de las variedades de trigo de pan, mientras que en la Figura 3 se muestran los patrones correspondientes a las variedades de trigo candeal. Al agrupar las muestras de acuerdo a la similitud de sus patrones, se ha facilitado la diferenciación entre variedades. Entre los trigos de pan se encontraron algunas variedades con un cierto grado de heterogeneidad en las bandas cuando se analizaron semillas individuales (Cuadro 2); los patrones electroforéticos de estas variedades se muestran en la Figura 4 (a y b).

Diferenciación de variedades basada en perfiles de gliadinas

De las 47 muestras analizadas, casi todas fueron diferenciables, salvo algunos grupos de muestras

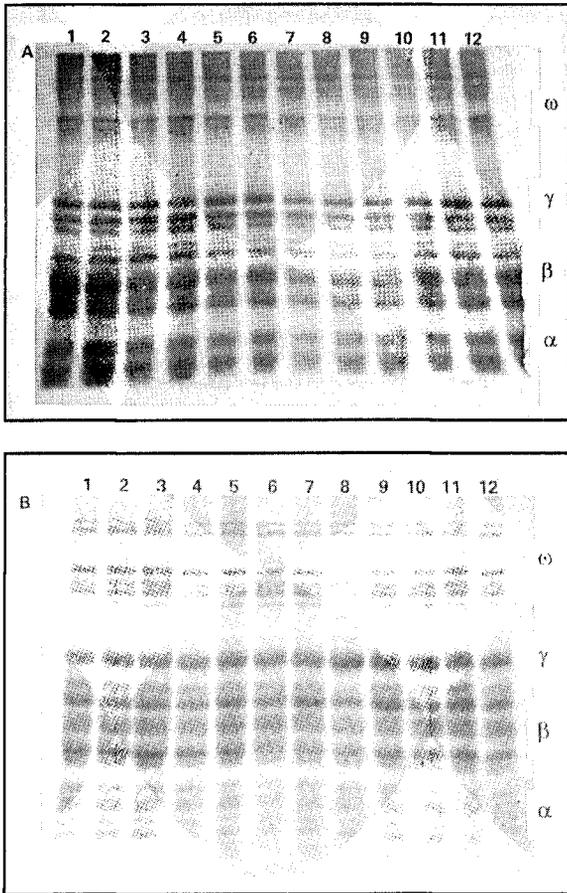


FIGURA 1. Separación electroforética en gels de A-PAGE al 10% de las proteínas extraídas de 12 semillas. Los perfiles electroforéticos corresponden a las variedades Quelén (gel superior) y Huayún (gel inferior). Al costado del gel se indica la ubicación de las familias de bandas α , β , γ y ω .

FIGURE 1. Electrophoretic separation of proteins extracted from 12 seeds on 10% A-PAGE gels. Electrophoretic profiles correspond to Quelén (upper gel) and Huayún (lower gel) varieties. α , β , γ and ω band groups are indicated at the right side.

indistinguibles, entre los que se cuentan un grupo conteniendo 3 de las 9 variedades de trigos candeales (33,3%), y un grupo de trigos de pan compuesto por 5 variedades de un total de 38 (13,1%). Estos grupos fueron:

- a) Alifén, Cappelli y Quilafén (trigos candeales);
- b) Huayún, Lilén, Millaleu, Reihue y Talhuén (trigos de pan).

El análisis del pedigrí de estas variedades permite explicar en parte estas homologías. En el grupo de trigos candeales (a), tanto Alifén [Cappelli/S.T. 464] como Quilafén [YT54/N10.B//LD357/3/2*TC] tienen a Cappelli entre sus progenitores (TC es [Caravaca

1 - LD357 x Cappelli]). Respecto de las variedades de pan (b), el estudio de pedigrí es menos claro, aunque, por ejemplo, tanto Huayún [JUP/BJY//URES] como Lilén [BJY "S" X JUP] y Reihue [(CNO-INIA//KREND/SON 64-INIA) CIANO X Sonka-INIA/JUP] tienen a JUP como uno de sus progenitores. La relación de Millaleu [KVZ/Buho//KAL-BB] y Talhuén [PCH/4/KT54 - NOR 10B/3/KT54/5/Nariño 59/Veery "S"] con las otras tres variedades no es clara, aunque estas dos últimas son ambas líneas "Veery".

Otras variedades presentaron mínimas diferencias. Entre éstas, los candeales Candealfén-4 y Candealfén-5 se diferenciaron entre sí por una banda de la región α (ambas variedades provienen de la misma cruce, [3*Cappelli x Giza]), mientras que una banda en la zona de albúminas/globulinas las diferenció de otros candeales. Por su parte, Licán y Chonta presentaron leves diferencias en las regiones α y ω . De las variedades de pan, Malihue tiene una banda γ débil y Saeta una banda α , únicas diferencias con el mencionado grupo (b) de variedades indistinguibles.

Para diferenciar las variedades dentro de los grupos (a) y (b), así como nuevas variedades de las cuales se requiera conocer su fingerprinting, existen varias alternativas analíticas. En nuestras condiciones, la primera aproximación es el análisis de los patrones de HMW-GS, dado que recientemente se ha completado su determinación en numerosas variedades chilenas (Hewstone e Hinrichsen, 1994). Sin embargo, las HMW-GS de estas variedades también son homólogas. En otras palabras, bajo las condiciones experimentales descritas, ni los perfiles electroforéticos de gliadinas ni los de gluteninas son una herramienta de fingerprinting eficaz. Sin embargo, existen otras formas más sensibles de separar y detectar las distintas formas moleculares de las proteínas del gluten, como la cromatografía líquida de alta resolución (Bietz, 1983; Lookhart *et al.*, 1986) o la electroforesis capilar (Werner *et al.*, 1994), que podrían ser usadas para lograr la discriminación intervarietal de estos grupos de variedades idénticas.

En otros cultivos anuales (variedades chilenas de arroz) los perfiles electroforéticos de las proteínas del grano han resultado idénticos, mientras que mediante el análisis de fragmentos de ADN amplificados por PCR se logró una rápida diferenciación de las variedades (Hinrichsen *et al.*, 1996). Existen antecedentes de la aplicación de estas metodologías en trigo, tanto para fingerprinting (Joshi y Nguyen, 1993a y b; Penner y Bezte, 1994) como para el estudio de genes específicos de gliadinas y gluteninas (D'Ovidio *et al.*, 1992, 1995; Van Campenhout *et al.*, 1995) por lo que *a posteriori* debiera implementarse una aproximación de este tipo para diferenciar estos grupos de variedades, aunque el gran tamaño del

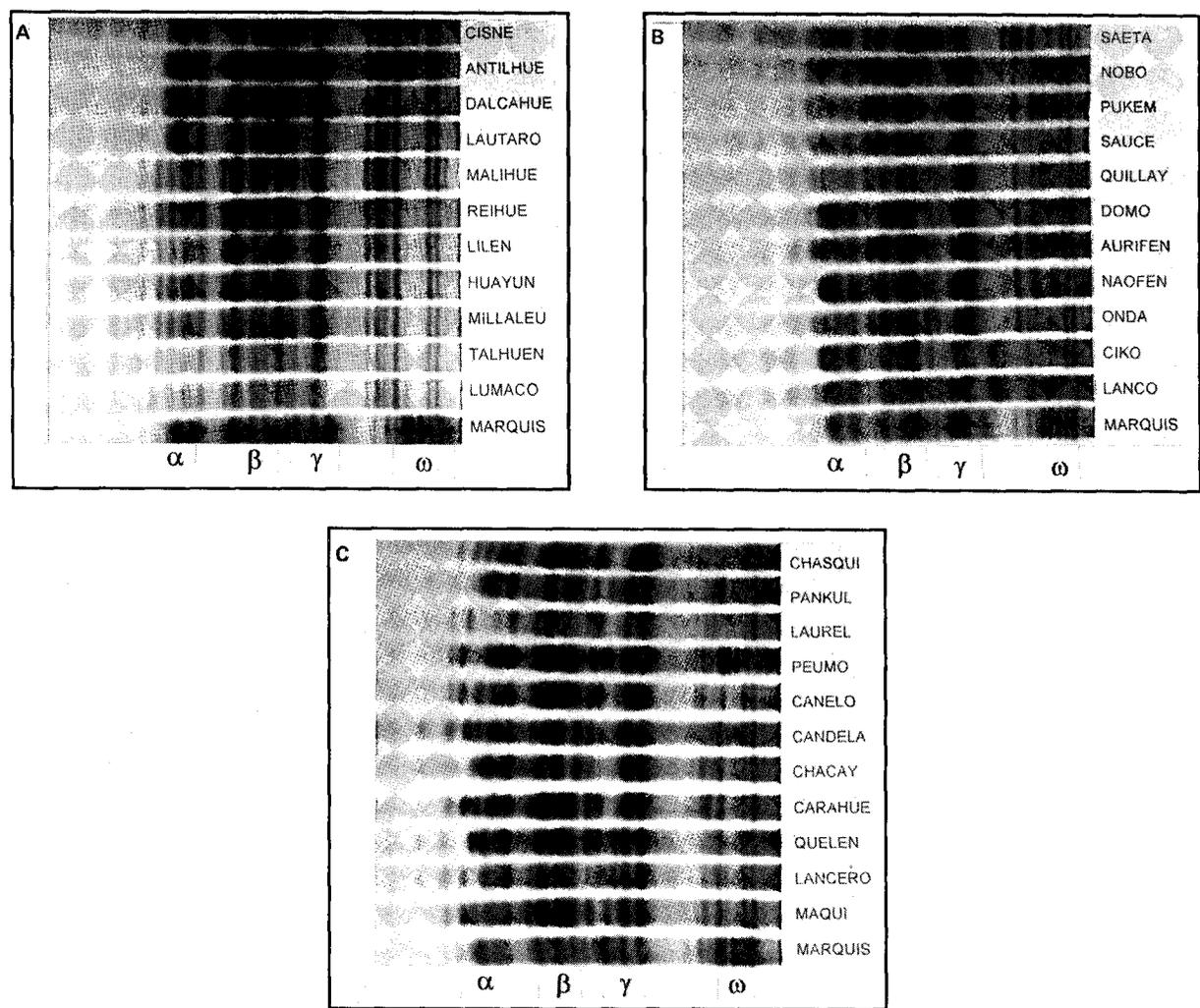


FIGURA 2 (a, b, c). Electroforesis en gel de A-PAGE al 10% de las gliadinas de trigos de pan. Las muestras fueron extraídas y separadas como se indica en el texto. Los nombres de las variedades están indicados en el margen derecho de la figura. Los grupos de bandas α , β , γ y ω se indican en el costado inferior de cada gel.

FIGURE 2 (a, b, c). A-PAGE electrophoresis (10%) of bread wheat gliadins. The samples were extracted and separated as shown in the text. Varietal denominations are indicated at the right side of the figure. α , β , γ and ω band groups are indicated at the bottom of each gel.

genoma de estas especies, dado por su dosaje génico en multicopias (hexaploide en *T. aestivum*; tetraploide en *T. durum*) tienda a minimizar los polimorfismos detectables (Devos y Gale, 1992).

Finalmente, existen otros factores bioquímicos, como algunos lípidos e hidratos de carbono, asociados a las proteínas del gluten. Estas moléculas podrían eventualmente ser utilizables para la diferenciación de variedades, además de ser interesantes como marcadores para fitomejoramiento, como probables determinantes de las características farinológicas de la harina (para una revisión, ver a Zawistowska *et al.*, 1985).

El conocimiento de estos perfiles, tanto de las variedades de trigos de pan como de los candeales, correlacionado a sus características reológicas y otros factores de calidad, debiera conducir a la identificación de aquellos factores proteicos que determinen, positiva o negativamente, la calidad industrial del pan. De esta forma, determinadas bandas de gliadinas podrían usarse como marcadores para la selección de segregantes de un programa de fitomejoramiento.

Identificación de bandas de gliadinas específicas

Para poder comparar los patrones electroforéticos con los de otras variedades, se usó como referencia

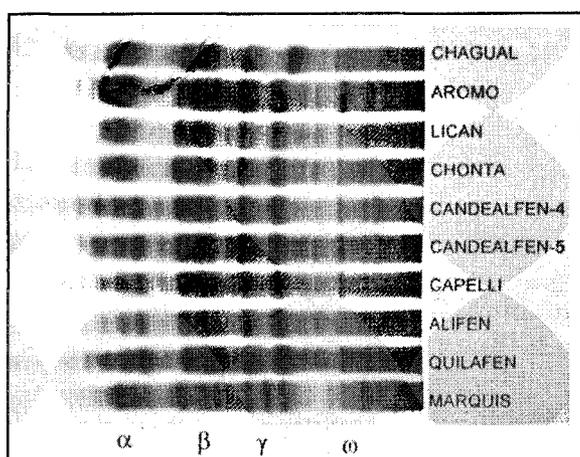


FIGURA 3. Electroforesis en gel de A-PAGE al 10% de las gliadinas de trigos candeales. Las muestras fueron extraídas y separadas como se indica en el texto. Sus nombres están indicados en el margen derecho de la figura. Los grupos de gliadinas se indican al costado inferior del gel.

FIGURE 3. A-PAGE electrophoresis (10%) of durum wheat gliadins. The samples were extracted and separated as shown in the text. Varietal denominations are indicated at the right side of the figure. The gliadin groups are indicated at the bottom.

el perfil de la variedad Marquis, con lo que se pudo estandarizar los grupos de bandas presentes en los trigos chilenos. Estos grupos de gliadinas son (de mayor a menor movilidad electroforética) α , β , γ y ω (Jones *et al.*, 1959; Kasarda *et al.*, 1976; Bushuk y Zillman, 1978). Las bandas tuvieron un adecuado nivel de resolución, incluso en las zonas denominadas β y γ , tradicionalmente difíciles de resolver. Además de identificar estos grupos de bandas, la identificación de bandas específicas es relevante, ya que se ha sugerido que la presencia de algunas gliadinas se correlacionaría con calidad panadera (Sozinov y Poperelya, 1980; D'Ovidio *et al.*, 1992; Nieto-Taladriz *et al.*, 1994), como ha sido descrito para las HMW-GS (Payne, 1987). De esta forma, se pudo confirmar la ubicación de bandas como la γ -42 o la γ -45, denominadas así por su ubicación relativa en el gel (Arango *et al.*, 1989).

El número de bandas determinado para cada variedad es estimativo (Cuadro 2), ya que hay bandas muy débiles que no se han contabilizado; estas bandas se aprecian mejor si se incrementa el volumen de muestra cargado en los geles (resultado no mostrado), pero esto conllevaría una pérdida de resolución de las bandas de mayor intensidad. Esto hace que el número de bandas sea un índice poco informativo, y más bien debiera prepararse un catastro indicando el número de bandas por grupo (α , β , γ y ω), así como sus características (bandas fuertes o débiles, anchas o discretas, etc.). En términos gene-

CUADRO 2. Análisis de pureza de variedades de trigo obtenidas de dos fuentes diferentes

TABLE 2. Analysis of mixtures in wheat varieties obtained from two different sources

Varietal ^a	N° de Bandas ^b	Uniformidad ^c (proporción de cada variante)
Alifén*	17	P
Antilhue	17	P
Aromo*	16-18	P
Aurifén	20	P
Candalfén-4*	19	P
Candalfén-5*	20	P
Candela	20	P
Canelo	20-22	P
Cappelli*	17-18	P
Carahue	19	P
Ciko	17	P
Cisne	21	P
Coyan	17-19	M (10:1:1)
Cunco	18-19	M (6:3:2:1)
Chacay	15-17	M (6:4:2)
Chagual*	19	P
Chasqui	20	P
Chonta*	14-16	P
Dalcahue	16-18	M (11:1)
Domo	19-20	M (11:1)
Huayún	20	P
Kona	20-21	M (6:6)
Lancero	19-20	P
Lanco	23	P
Laurel	18-20	P
Lautaro	15	P
Licán*	18-19	P
Lilén	20	P
Lumaco	21	P
Malihue	21	P
Maqui	21	P
Millaleu	20	P
Naofén	20	P
Nobo	20	P
Onda	20-21	M (11:1)
Pankul	18-19	P
Patagua	19	M (6:6)
Perquenco	17-18	M (4:4:4)
Peumo	23	P
Pukem	20	P
Quelén	15	P
Quilafén*	18	P
Quillay	22	P
Reihue	20	P
Saeta	22	P
Sauce	22	P
Taihuén	20	P

Las variedades de trigo candeal están indicadas con un asterisco ().

^bEl número de bandas fue determinado en geles de 11 x 14 cm.

^cLa Pureza fue determinada usando 12 granos extraídos separadamente. Las abreviaturas usadas son: M: Mezcla o Heterocigocidad. P: Puro (patrones electroforéticos uniformes).

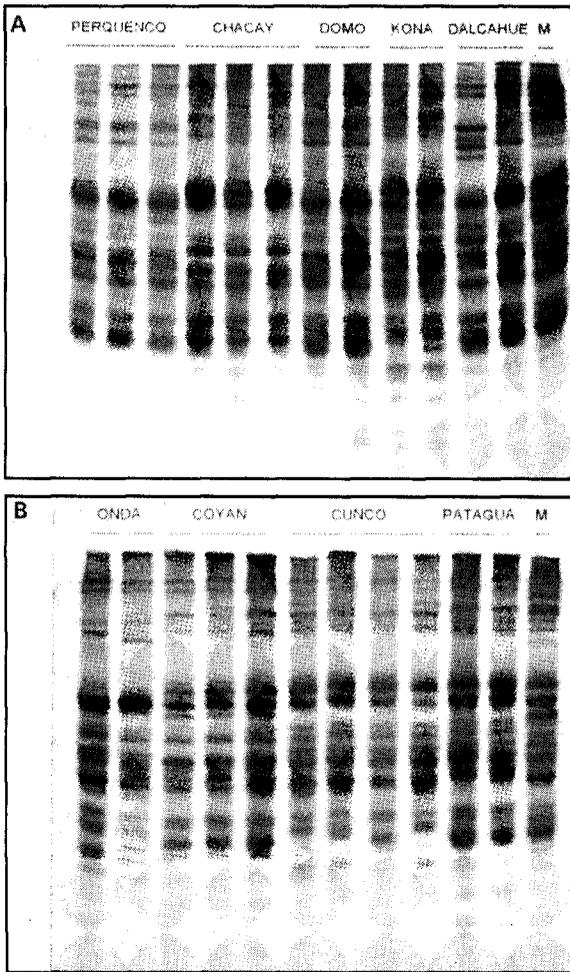


FIGURA 4 (a, b). Variedades que muestran distinto grado de mezcla o heterocigocidad. Cada carril contiene un patrón representativo de las distintas combinaciones alélicas encontradas.

FIGURE 4 (a, b). Varieties showing different level of mixture or heterozygosity. Each lane contains a representative pattern for each allelic combination.

rales, se encontró una buena correlación con los resultados obtenidos por Barriga *et al.* (1983), especialmente en lo referente a la variedad Marquis, usada como estándar, y que muestra un patrón idéntico al determinado en este trabajo. Otras variedades analizadas por Barriga *et al.* (1995), como Alifén, Quilafén, Aurifén, Chasqui, Lancero, Millaleu, Naofén y Onda, también estudiadas en este trabajo, son difícilmente comparables, dado que allí no se mostraron los resultados directos (geles), sino una representación de tipo código de barras (Lookhart *et al.*, 1983).

Nivel de heterocigocidad o mezcla en variedades establecidas

El análisis de extractos preparados de semillas individuales de una misma variedad mostró que en

algunos casos existen dos o más patrones electroforéticos de gliadinas. Este es un fenómeno documentado con anterioridad; por ejemplo, Lookhart *et al.* (1986) encontraron una segregación de 4:6 para tres bandas de gliadinas, identificadas tanto mediante A-PAGE como por HPLC, en la variedad americana Newton. Por su parte, McLendon *et al.* (1993), identificaron variaciones en las proteínas del endospermo en 5 de 22 cultivares analizados, definiendo a cada variante alélica como un biotipo. Considerando estos antecedentes, se realizó un catastro de todas las variedades estudiadas, analizando separadamente 12 granos por variedad. El resultado se resume en el Cuadro 2, donde se indica el número estimado de bandas para cada variedad analizada, y el grado de pureza de cada muestra analizada. En casi todos los casos de heterocigocidad o variabilidad, se encontraron dos variantes alélicas, aunque en la variedad Cunco se encontraron hasta cuatro combinaciones de perfiles diferentes. Algunas de estas diferencias fueron sutiles, dadas por una única banda de baja intensidad (Domo y Kona), mientras que en otros casos se encontraron diferencias en varios alelos (Dalcahue y Onda). En la Figura 4 (a y b) se muestran los perfiles electroforéticos de semillas individuales representativas de cada una de las distintas formas alélicas (o biotipos) de estas variedades «heterocigóticas». Las proporciones de cada combinación alélica (normalizadas para 12 semillas) se indican en el Cuadro 2.

Este polimorfismo de patrones electroforéticos tiene dos posibles orígenes: mezclas involuntarias durante la manipulación mecánica de los materiales (multiplicados hasta F7/F8 y hasta F12 antes de liberar una variedad), o heterocigosis propia de un material de fitomejoramiento en proceso de segregación. Cuando los patrones electroforéticos individuales difirieron en una o dos bandas (alelos), conservando el perfil general de la variedad, se podría considerar que se trata de una variedad que no ha llegado a un estado de homocigosis total, o bien que se trata de una variedad que se ha generado por la mezcla voluntaria de varias líneas puras homocigotas, provenientes de la misma cruce. Sin embargo, en aquellos casos donde se observan patrones muy diferentes entre granos individuales, o cuando se tienen varios patrones electroforéticos diferentes (tres o cuatro) para la misma variedad, es más probable que se trate de mezclas mecánicas. Finalmente, no se puede descartar la posibilidad de que los materiales liberados como variedades hayan sufrido posteriores mutaciones, las que podrían manifestarse como modificaciones de los perfiles de gliadinas. Esto fue documentado por Cox y Worrall (1987) para la variedad Kharkof; esta variedad fue introducida en USA a principios de siglo, y mantenida en diferentes localidades aisladamente. El análisis de estas «acce-

siones» mostró importantes modificaciones en sus perfiles electroforéticos de gliadinas.

Las variedades que han mostrado algún grado de heterogeneidad entre semillas, serán analizadas a partir de granos de una espiga generadas en condiciones de autopolinización. De esta forma, se determinará si se trataba de mezclas por manipulación, o por heterocigosis. En este último caso, se deberá continuar la multiplicación en condiciones controladas de autopolinización, de tal forma que al cabo de cinco a seis generaciones se obtenga material homogoto, y que al mismo tiempo conserve el fenotipo de interés.

CONCLUSIONES

Se ha estudiado una metodología para la identificación varietal en trigos de pan y candeales, basada en la separación electroforética de las gliadinas del gluten en geles ácidos de PAA (A-PAGE). Mediante A-PAGE fue posible discriminar prácticamente todas las (47) variedades analizadas, encontrándose sólo dos grupos de variedades para los que estos patrones electroforéticos fueron idénticos (3 variedades candeales y 5 variedades de pan). Asimismo, analizando las gliadinas de granos individuales, se encontró

que existe un cierto grado de heterocigocidad, mezcla o polimorfismo en las semillas de algunas variedades, cuyo origen se estudiará posteriormente.

Para obtener cada perfil electroforético, se sugiere realizar el análisis de gliadinas extrayendo unos 20 granos con etanol al 70% y cargando 15-20 μ l de estos extractos en geles de A-PAGE al 10% (pH 3,1 en ácido láctico) con una porción de gel concentrador preparado al 4,5%. Si este tipo de electroforesis no permite discriminar las variedades analizadas, se debiera recurrir a un gel tipo PAGE-SDS al 9%, para analizar las gluteninas de alto peso molecular. Por otra parte, para la determinación de pureza varietal, se recomienda analizar separadamente las gliadinas de 10 a 20 granos de cada muestra, extrayéndolos ya sea en DMF 1,5 M o en etanol 70%, y cargando 8 a 10 μ l del extracto en minigeles de A-PAGE.

Dado que no se pudo lograr una diferenciación total entre todas las muestras analizadas, deberán desarrollarse nuevas metodologías, basadas en el análisis de fragmentos específicos de ADN, para mejorar los criterios de discriminación inter-varietal, y diferenciar aquellas variedades que de acuerdo a los perfiles proteicos de gliadinas y gluteninas de alto peso molecular aparecen idénticas.

RESUMEN

Se ha implementado una metodología para identificación varietal de trigos candeales y de pan, basada en el perfil electroforético de las proteínas extraídas del grano en medio alcohólico (principalmente gliadinas del gluten). Las gliadinas fueron resueltas en geles ácidos (pH 3,1) de PAA al 10%, precedido de un gel concentrador de PAA al 4,5%. Los patrones obtenidos fueron reproducibles entre extracciones de granos individuales. Se identificaron los grupos de gliadinas correspondientes a las regiones α , β , γ y ω , en base a la comparación con una variedad conocida (Marquis). De las 47 variedades analizadas, sólo algunos grupos menores mostraron patrones idénticos. A pesar de estas limitaciones, por su

simpleza se recomienda como un método apropiado para diferenciar variedades de trigo, y para determinar grados de pureza de partidas de semillas. Finalmente, cabe destacarse que el análisis independiente de 12 granos por variedad mostró que existe un grado variable de heterogeneidad en los perfiles electroforéticos de algunas de ellas, lo cual puede deberse a heterocigocidad propia de la variedad, o a mezclas -voluntarias o no- producidas durante la manipulación mecánica de las semillas.

Palabras claves: A-PAGE; electroforesis de proteínas; gliadinas; trigo; *Triticum aestivum* L.; *Triticum durum*.

LITERATURA CITADA

ARANGO, M.C., GIANIBELLI, M.C. y CAMPAÑA, L. 1989. Identificación de las bandas de gliadinas 42 y 45 en *Triticum durum* Def. Rev. Fac. Agronom. Univ. (Buenos Aires) Tomo 65 (1-2): 25-30.

BARRIGA, P., MANQUIÁN, N. y MANSILLA, R. 1983. Identificación de cultivares de trigo por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida. Agro Sur (Chile) 11: 61-63.

BARRIGA, P., GONZÁLEZ, J., MANSILLA, R. y MANQUIÁN, N. 1985. Catálogos de fórmulas de electroforogramas de trigos cultivados en Chile. Agro Sur (Chile) 13: 13-23.

BIETZ, J.A. 1983. Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatography 255: 219.

- BRZEZINSKI, W., VAN GELDER, W.M.J., MENDELEW-SKI, P. and KOLSTER, P. 1989. Polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadins: the use of a moving boundary for improved resolution. *Euphytica* 40: 207-212.
- BUSHUK, W. and ZILLMAN, R.R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.* 58: 505-515.
- CIAFFI, M., LAFIANDRA, D., PORCEDDU, E. and BENEDETTELLI, S. 1993. Storage-protein variation in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) from Jordan and Turkey. I. Electrophoretic characterization of genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 86: 474-480.
- CLEMENTS, R.L. 1987. A study of gliadins of soft wheats from the eastern United States using a modified polyacrylamide gel electrophoresis procedure. *Cereal Chem.* 64: 442-448.
- COX, T.S. and WORRAL, W.D. 1987. Electrophoretic variation among and within strains of 'Kharkof' wheat maintained at 11 locations. *Euphytica* 36: 815-822.
- COX, T.S., LOOKHART, G.L., WALKER, D.E., HARRELL, L.G., ALBERS, L.D. and RODGERS, D.M. 1985. Genetic relationships among hard red winter wheat cultivars as evaluated by pedigree analysis and gliadin polyacrylamide gel electrophoretic patterns. *Crop Science* 25: 1058-1063.
- DAMANIA, A.B. and SOMAROO, B.H. 1988. Preliminary screening of greek durum wheat varieties using PAGE. *RACHIS* 7: 54-56.
- DEVOS, K.M. and GALE, M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567-572.
- D'OVIDIO, R., TANZARELLA, O.A. and PORCEDDU, E. 1992. Molecular analysis of gliadin and glutenin genes in *T. durum* cv. Lira. A model system to analyse the molecular bases of quality differences in durum wheat cultivars. *J. Cereal Science* 16: 165-172.
- D'OVIDIO, R., MASCI, S. and PORCEDDU, E. 1995. Development of a set of oligonucleotide primers specific for genes at the Glu-1 complex loci of wheats. *Theor. Appl. Genet.* 91: 189-194.
- DU CROS, D.L., LAWRENCE, G.J., MISKELLY, D.M. and WRIGLEY, C.W. 1980. Systematic identification of Australian wheat varieties by laboratory methods. *Tech. Publ. N° 7 CSIRO Wheat Research Unit: Australia.*
- GRAYBOSCH, R.A., PETERSON, C.J., LEE, J.-H. and SHELTON, D.R. 1994. Effects of glutenin protein polymorphisms on breadmaking quality of winter wheats. *Crop Science* 34: 628-635.
- GREENE, F.C., ANDERSON, O.D., LITTS, J.C. and GAUTIER, M.-F. 1985. Control of wheat protein biosynthesis. *Cereal Chem.* 62: 398-405.
- GUIRAUD, P.T., SEIGLE-MURANDE, F.M., STEIMAN, R.L. and POTIE, J.-C.M. 1990. A modified polyacrylamide gel method for assessing the extraction of gliadins. *J. Agric. Food Chem.* 38: 982-985.
- HEWSTONE, N. e HINRICHSEN, P. 1994. Composición de subunidades de gluteninas de alto peso molecular de trigos chilenos de pan. *Agricultura Técnica (Chile)* 54: 211-218.
- HINRICHSEN, P., AMIGO, C., ALVARADO R. y MUÑOZ, C. 1996. Identificación de variedades chilenas de arroz (*Oryza sativa* L.): evaluación del uso de perfiles proteicos y de fragmentos polimórficos amplificadas al azar (RAPD). *Agricultura Técnica (Chile)* 56: 1-10.
- JONES, R.W., TAYLOR, N.W. and SENTI, F.R. 1959. Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Arch. Biochem. Biophys.* 84: 363-376.
- JONES, B.L., LOOKHART, G.L., HALL, S.B. and FINNEY, K.F. 1982. Identification of wheat cultivars by gliadin electrophoresis: Electrophoregrams of the 88 wheat cultivars most commonly grown in the United States in 1979. *Cereal Chem.* 59: 181-188.
- JOSHI, C.P. and NGUYEN, H.T. 1993a. Application of the random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats. *Genome* 36: 602-609.
- JOSHI, C.P. and NGUYEN, H.T. 1993b. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. *Plant Science* 93: 95-103.
- KASARDA, D.D., BERNARDIN, J.E. and NIMMO, C.C. 1976. Wheat proteins. *En: Advances in Cereal Science and Technology*, vol. I. Pomeranz, Y., ed. Pág. 158. Amer. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN.
- LAFIANDRA, D. and KASARDA, D.D. 1985. One- and Two-dimensional (two-pH) polyacrylamide gel electrophoresis in a single gel: Separation of wheat proteins. *Cereal Chem.* 62: 314-319.
- LOOKHART, G.L., JONES, B.L., HALL, S.B. and FINNEY, K.F. 1983. An improved method for standardizing polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadin proteins. *Cereal Chem.* 59: 178-181.
- LOOKHART, G.L., ALBERS, L.D. and BIETZ, J.A. 1986. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis and high-performance liquid chromatography analyses of gliadin polymorphism in the wheat cultivar Newton. *Cereal Chem.* 63: 497-500.
- LOOKHART, G. and BEAN, S. 1995a. A fast method for wheat cultivar differentiation using capillary zone electrophoresis. *Cereal Chem.* 72: 42-47.
- LOOKHART, G. and BEAN, S. 1995b. Separation and characterization of wheat protein fractions by High-Performance Capillary Electrophoresis. *Cereal Chem.* 72: 527-532.

- McLENDON, M.E., LANNING, S.P., McGUIRE, C.F., MARTIN, J.M. and TALBERT, L.E. 1993. Variation of seed storage proteins within hard red spring wheat cultivars and effect on end-use properties. *Cereal Chem.* 70: 607-610.
- MARCHYLO, B.A., KRUGER, J.E. and HATCHER, D.W. 1990. Effect of environment on wheat storage proteins as determined by quantitative Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem.* 67: 372-376.
- MOREL, M.-H. and AUTRAN, J.C. 1990. Separation of durum wheat proteins by ultrathin-layer focusing: a new tool for the characterization and quantification of low molecular weight glutenin. *Electrophoresis* 11: 392-399.
- MORELL, M.K., PEAKALL, R., APPELS, R., PRESTON, L.R. and LLOYD, H.L. 1995. DNA profiling techniques for plant variety identification. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 807-819.
- NIETO-TALADRIZ, M.T., PERRETANT, M.R. and ROUSSET, M. 1994. Effect of gliadins and HMW and LMW subunits of glutenin on dough properties in the F6 recombinant inbred lines from a bread wheat cross. *Theor. Appl. Genet.* 88: 81-88.
- PAYNE, P.I., HOLT, L.M., JACKSON, E.A. and LAW, C.N. 1984. Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 304: 359-371.
- PAYNE, P.I. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 141-153.
- PELTONEN, J. and VIRTANEN, A. 1994. Effect of nitrogen fertilizers differing in release characteristics on the quantity of storage proteins in wheat. *Cereal Chem.* 71: 1-5.
- PENNER, G.A. and BEZTE, L.J. 1994. Increased detection of polymorphism among randomly amplified wheat DNA fragments using a modified temperature sweep gel electrophoresis (TSGE) technique. *Nucleic Acids Res.* 22: 1780-1781.
- SOZINOV, A.A. and POPERELYA, F.A. 1980. Genetic classification of prolamines and its use for plant breeding. *Ann. Technol. Agric.* 29: 229-245.
- STAUB, J.E. and MEGLIC, V. 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivar discrimination: A case study in cucumber. *HortTechnology* 3: 291-300.
- VAN CAMPENHOUT, S., STAPEN, J.V., SAGI, L. and VOLCKAERT, G. 1995. Locus-specific primers for LMW glutenin genes on each of the group 1 chromosomes of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 91: 313-319.
- WEEGELS, P.L., FLISSEBAALJE, T. and HAMER, R.J. 1994. Factors affecting the extractability of the glutenin macropolymer. *Cereal Chem.* 71: 308-309.
- WERNER, W.E., WIKTOROWICZ, J.E. and KASARDA, D.D. 1994. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis of gliadins and high molecular weight glutenin subunits. *Cereal Chem.* 71: 397-402.
- WOYCHIK, J.A., BOUNDY, J.A. and DIMLER, R.J. 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.* 94: 477-482.
- ZAWISTOWSKA, U., BEKES, F. and BUSHUK, W. 1985. Involvement of carbohydrates and lipids in aggregation of glutenin proteins. *Cereal Chem.* 62: 340-345.
- ZILLMAN, R.R. and BUSHUK, W. 1979. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. II. Effects of environmental factors on the gliadin electrophoregram. *Can. J. Plant Sci.* 59: 282-286.