

INVESTIGACIÓN

MEJORAMIENTO DE TRIGOS HARINEROS (*Triticum aestivum* L.) EN LA ZONA CENTRO SUR DE CHILE. IV. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVARES DE TRIGOS BASADO EN PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE GLUTENINAS Y GLIADINAS¹

Genetic improvement of bread wheats (*Triticum aestivum* L.)
in the south central zone of Chile. IV. Characterization
of varieties based on electrophoretic profiles
of glutenins and gliadins

Patricio Hinrichsen R.², M. Herminia Castro P.² y Mario Mellado Z.³

A B S T R A C T

Twenty-two wheat cultivars released between 1968 and 1996 by the Quilamapu Research Center of the Chilean Agriculture Research Institute, were analyzed for their seed storage protein profiles, including the high molecular weight glutenins (HMWG) and the acidic gliadins. HMWG showed a good reproducibility compared to previous determinations, and a high diversity, with 14 different protein bands in 12 different allelic combinations, corresponding to the *loci* GluA1, GluB1 and GluD1. A correlation between HMWG alleles related to quality and sedimentation values was observed, with the exception of some cultivars. The electrophoretic screening of the 22 cultivars identified the α , β , δ and ω gliadin types. The similarity among some cultivars, in terms of sharing HMWG or gliadin profiles, did not have any correlation with their having the same progenitors or similar pedigrees. The combination of HMWG and gliadin banding patterns represents a plausible method to differentiate the majority of the cultivars included in this study.

Key words: wheat, seed storage proteins, genetic identification.

R E S U M E N

Se analizaron 22 cultivares de trigo liberados entre 1968 y 1996 en el Centro Regional de Investigación Quilamapu del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, desde el punto de vista de los perfiles de proteínas de reserva de las semillas, incluyendo las gluteninas de alto peso molecular (G-APM) y las gliadinas ácidas. Las G-APM mostraron una buena reproducibilidad comparadas con determinaciones anteriores, y una alta diversidad, con 14 bandas proteicas en 12 diferentes combinaciones alélicas, correspondientes a los *loci* GluA1, GluB1 y GluD1. Se encontró correlación entre los alelos relacionados a calidad y los valores de sedimentación, con excepción de algunos cultivares. El análisis electroforético de los 22 cultivares identificaron los tipos de gliadinas α , β , δ y ω . La similitud entre algunos cultivares, en cuanto a presentar idénticos

¹Recepción de originales: 22 de septiembre de 2000.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.
E-mail: phinrich@platina.inia.cl

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.
E-mail: mmellado@quilamapu.inia.cl

patrones de bandas de G-APM o gliadinas, no tuvo un correlato en cuanto a tener iguales progenitores o similar pedigree. La combinación de los patrones de G-APM y de gliadinas representa un método aplicable para diferenciar la mayoría de los cultivares considerados en este estudio.

Palabras clave: trigo, proteínas de acúmulo de semillas, identificación genética.

INTRODUCCIÓN

En los comienzos del mejoramiento genético de trigo, los cultivares se diferenciaban casi exclusivamente a través de sus características morfológicas. Este sistema de diferenciación es eficiente cuando los cultivares presentan características contrastantes bien definidas, pero tiene limitaciones en aquellos casos en que se trata de individualizar cultivares estrechamente emparentados y por consiguiente muy similares.

Actualmente el desarrollo de herramientas de análisis molecular permite identificar cambios genéticos presentes en un cultivar, aun cuando fenotípicamente no sean perceptibles, como es el caso de las proteínas almacenadas en el grano, que representan un tipo de marcador molecular. Según Forster *et al.* (1997), los marcadores genéticos aplicados al mejoramiento ayudan a identificar un cultivar, a evaluar su pureza y calidad, y a proteger los derechos del obtentor. Hewstone e Hinrichsen (1994) caracterizaron las gluteninas de alto peso molecular (G-APM) de varios cultivares chilenos de trigo, y posteriormente Hinrichsen *et al.* (1997) usaron gliadinas, un tipo de proteínas de reserva del grano, como un marcador molecular apropiado para diferenciar cultivares, ya que cada cultivar presenta un patrón de bandas característico, y su expresión génica no está condicionada, de manera sustancial, a variaciones ambientales, como ocurriría con marcadores fenotípicos convencionales (altura de planta, porcentaje de proteína, etc.). Sin embargo, esto es materia de controversia, y Kahl (1997) señaló que estas bandas proteicas presentan una cierta variabilidad en su expresión.

Existen diversos tipos de marcadores moleculares que permiten estudiar directamente diferencias en *loci* específicos del DNA, como son los microsatélites, fragmentos de largo variable detectados con partidores de diseño aleatorio (acrónimo inglés, RAPD) y fragmentos de restricción amplificados por PCR (acrónimo inglés, AFLP). Varios de ellos han sido usados en trigo, encontrándose en general un bajo índice de diversidad genética (Devos y Gale, 1992), especialmente cuando se usó RAPD (He *et al.*, 1992; Dweikat *et al.*, 1993). Por otra parte, tanto a través del uso de marcadores de AFLP (Law *et al.*, 1998) como de un número relativamente pequeño de microsatélites (Plaschke *et al.*, 1995), se ha podido estimar la diversidad genética e identificar cultivares de trigo. Por su parte, Van Toai *et al.* (1997) demostraron que los marcadores de AFLP permiten estimar contribuciones parentales y rastrear o trazar cambios genéticos en poblaciones.

Es importante conocer el perfil molecular de los cultivares, ya que ello permitiría apoyar el trabajo de mejoramiento y proteger la propiedad intelectual del obtentor. Este último aspecto es muy relevante cuando se analizan las enormes cifras de dinero involucradas en la comercialización de las semillas mejoradas, y en las tecnologías relativas al mejoramiento. Así, una de las conclusiones del Congreso 1998 de la Asociación Internacional de Seleccionadores (ASSINSEL), realizado en Mónaco, señala que "en el marco de la propiedad intelectual, existiría una presión creciente para que las legislaciones nacionales acepten las patentes de células, órganos, genes y estructuras moleculares". (Portilla, B. 1998. INIA, Dirección Nacional. Comunicación personal).

En el presente estudio se analiza el posible uso de los perfiles electroforéticos de gluteninas y gliadinas para caracterizar los cultivares de trigo liberados por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, en su Proyecto de Mejoramiento Genético de Trigo del Centro Regional Quilamapu, durante el período 1968 a 1996. Además se hace referencia a la asociación entre los perfiles electroforéticos de G-APM y un aspecto o factor de la calidad de la proteína, evaluada a través del índice de sedimentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El nombre comercial de los cultivares estudiados, su hábito de crecimiento, el año de registro y su genealogía se indican en el Cuadro 1. Las semillas para este estudio provinieron de espigas individuales típicas de cada cultivar, seleccionadas de ensayos realizados en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Campo Experimental Santa Rosa (36°31' lat. Sur, 71°54' long. Oeste y alt. 220 m.s.n.m.), Chillán, Chile.

Electroforesis de gluteninas

Se describe a continuación la técnica citada por Hewstone e Hinrichsen (1994), que incluye una modificación del método descrito por Ng y Bushuk (1987) para la extracción de proteínas. Se molió un grano por variedad del cual se pesaron 12 mg de harina pura y se disolvieron en 600 mL de una solución tampón compuesta por 0,05 M de Tris-HCl (pH 8,0), 5M de urea, 0,2% de SDS, 3% de 2-mercaptoetanol y 0,003% de azul de bromofenol, con agitación vigorosa e incubación por 20 min a temperatura ambiente. Se analizaron las muestras por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) de 9 x 8 x 0,1 cm, según la técnica descrita por Laemmli (1970). Cada gel contenía 12 carriles y se cargaron 15 mL de la muestra en cada uno. De cada cultivar se analizaron al menos dos granos, separadamente. Se usó un gel concentrador que contenía 4,5% de acrilamida, 0,06% de bisacrilamida, 0,05% de SDS, 0,125 M de

Tris-HCl (pH 6,8), y un gel separador que contenía 9% de acrilamida, 0,12% de bisacrilamida, 0,05% de SDS, 0,38 M de Tris-HCl (pH 8,8). En ambos casos la polimerización se comenzó agregando 0,044% de persulfato de amonio y 0,043% de N, N, N', N' tetrametiletildiamina (TEMED). Las electroforesis se corrieron a 15 mA por gel, a temperatura ambiente. El tampón de electroforesis usado contenía 0,191 M de glicina, 24,7 mM de Tris-HCl (pH 8,3) y 0,13% de SDS. Los geles fueron teñidos durante toda la noche en una solución al 44% de metanol, 6% de ácido acético y 0,25 g L⁻¹ de azul de Coomassie R-250, y desteñidos en una solución al 20% de metanol y 5% de ácido acético.

Electroforesis de gliadinas

Se usó la técnica usada por Hinrichsen *et al.* (1997). Las gliadinas se extrajeron del endosperma de la semilla, triturando un grano de cada cultivar y separando la harina del pericarpio. En un microtubo de 1,5 mL se pesaron 20 mg de esta harina y se agregaron 240 µL de etanol al 70%, agitándose ocasionalmente y manteniéndose durante 2 h a temperatura ambiente. La extracción se prolongó toda la noche y la mezcla resultante se centrifugó a 15.000 x g durante 25 min. Después de separar el sobrenadante, cuidando de no arrastrar harina, se agregó un volumen igual de sacarosa al 60% preparada 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). Las proteínas extraídas se separaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida 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'-metilbisacrilamida 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

Cuadro 1. Cultivares de trigo harinero liberados por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, entre los años 1968 y 1996
Table 1. Bread wheat cultivars released by the National Agricultural Research Institute, Quilamapu Research Center, between 1968 and 1996

Nº	Cultivar	Habito ¹	Año de registro	Progenitores
1	Lilifén	A	1968	Nord Desprez / Winter Wheat /3/ Lee /Frontana // Newthatch
2	Mexifén	P	1971	Sonora64 // 6*Selkirk / 3*Andes
3	Antufén	P	1974	2*908 / Frontana /4/ 4160 // Yaktana54 / Norin10 Brevor/3/ 2*C14 /5/ Orofén
4	Andalién	A	1978	Juffy II /3/ Willet's' / Norin10 Brevor /2/ 2*Yaktana 54 A
5	Andifén	A	1980	Hybride De Bersee / Vogel 881 /5/ Frontana / Kenya 58 // Newthatch /3/ Norin 10 Brevor /4/ Yaqui 54
6	Labriego	A	1981	Hybride De Bersee / Vogel 881 /5/ Frontana / Kenya 58 // Newthatch /3/ Norin 10 Brevor /4/ Yaqui 54
7	Lucero	A	1980	Orofén // Yaktana 54 / Norin 10 Brevor /3/ Lerma Rojo / Menflo /4/ Vilmorin 53 / Vogel 9139
8	Sipa	P	1982	Siskin / Pavon
9	Ancoa	P	1981	Timstein / Chinese 166 // Kenya Farmer /3/ Lerma /4/ Newthatch /5/ Marroqui /6/ María Escobar /7/ Frocor // Norin 10 Brevor / Yaktana 54A
10	Onda	P	1982	Vicam // Ciano / Siete Cerros /3/ Kalyansona / Bluebird
11	Lancero	A	1983	Bezostaja 1 /4/ II-50-72 // Yaqui 54 / Norin 10 Brevor /3/ Marne Desprez / Inversable Bordeaux
12	Lautaro	I	1985	Novi Sad 646 / Bezostaja 1 // Aurora
13	Laurel	I	1985	Siete Cerros / Ciano // Calidad /3/ Gaines // Riebesel 55-1744 /4/ Capelle Desprez / Vogel 8058 // Capelle Desprez / Selkirk
14	Cisne	P	1985	Kavkaz / Cajeme 71
15	Ovación	P	1985	Aurora // Kaliasona / Blue Bird /3/ Woodpecker's'
16	Nobo	P	1986	Kavkaz / Buho // Kaliasona / Blue Bird
17	Ciko	P	1988	Maya / Nacozari 76
18	Saeta	P	1989	Pheasant's' / Bobwhite's'
19	Candela	I	1989	BT22.75 /4/ Vilmorin53 / Vogel 9052 /3/ Capelle Desprez/ Vogel 8058 // Capelle Desprez / Selkirk
20	Quelen	A	1993	Nainari 60 / Heines VII // Bluejay
21	Domo	P	1993	Nord Desprez / Vogel 9144 // Kaliasona Bluebird /3/ Yaco's'
22	Tamoi	P	1996	Temu 49-82 /3/ Kavkaz / Tanori // Tito's'

¹A = Hábito alternativo; P = Hábito primaveral; I = Hábito invernal.

láctico (Clements, 1987). Como catalizador de la reacción de polimerización se usó peróxido de hidrógeno de 30 vols. (11 μ L para 100 mL de gel). Para la parte concentradora del gel se preparó una matriz de poliacrilamida 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. 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. Posteriormente, se fijó y tiñó en una solución de ácido tricloroacético 12% y azul de Coomassie R-250, al 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. Los geles fueron registrados digitalmente con un sistema Agfa Snapscan 1212.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Patrones de gluteninas de alto peso molecular (G-APM)

En el Cuadro 2 se indican las bandas de G-APM de cada cultivar y sus respectivos alelos. Se identificaron 14 bandas diferentes, representadas en 12 combinaciones alélicas. Los cultivares se agruparon según su similitud en el patrón de G-APM en seis grupos de dos o más genotipos cada uno, habiendo otros seis genotipos que presentaron una combinación de bandas única, diferente a cualquiera de los 22 genotipos considerados en este estudio. En general, los cultivares de un mismo grupo no presentaron progenitores comunes, con la sola excepción de Andifén y Labriego, que son cultivares hermanos. Esta falta de asociación no debiera sorprender, dado que después del cruzamiento se produce segregación de los alelos de cada *loci* en forma aleatoria, y la selección durante los primeros ciclos reproductivos está dirigida a muchas características agronómicas, fisiológicas y de resistencia a enfermedades, las que pueden o no estar relacionadas con la calidad del grano, o con selección por

algún alelo específico de G-APM. La presencia de las mismas bandas de G-APM en cultivares con distintos progenitores, como ocurre con los grupos de cultivares Andifén, Lucero y Lancero; Lilifén, Mexifén y Candela; Lautaro, Ovación y Cisne; Quelén y Ciko; Sipa y Saeta; y Onda y Tamoi, inhabilita la metodología de G-APM para diferenciar, con rigurosidad, los cultivares de trigo harinero analizados en este trabajo, y no permite usar esta técnica como único criterio de decisión para proteger la propiedad intelectual (derechos de obtentor) sobre dichos cultivares. A pesar de ello, estos marcadores pueden resultar una buena herramienta para diferenciar cultivares conocidamente divergentes en sus perfiles de G-APM, ya sea como único criterio o combinado con otro marcador proteico, como los perfiles de gliadinas.

Se encontró una buena reproducibilidad al comparar los resultados de G-APM del presente trabajo con los indicados por Hewstone e Hinrichsen (1994), lo que apoyaría la tesis que las G-APM no son influenciadas por el medio ambiente. En efecto, las bandas proteicas de 13 cultivares incluidos en ambos estudios, señalaron que ocho de ellos presentaron los mismos patrones de G-APM, mientras que tres cultivares presentaron diferencias en un único *locus* y dos difirieron en las bandas correspondientes a dos *loci* de G-APM. En este último grupo se encuentra el cultivar Sipa, el que, adicionalmente, ha presentado siempre un cierto grado de segregación para el color del grano, sugiriendo ambos hechos que es un material con un insuficiente nivel de homocigosis. Por otra parte, las pocas diferencias encontradas entre ambos trabajos podrían explicarse por la aplicación de distintos criterios en la interpretación de los perfiles de bandas proteicas, dado que se trata de bandas correspondientes a diferentes *loci* con alelos de tamaños muy similares, como el alelo 2* (*locus* GluA1) y el alelo 2+12 (correspondiente al *locus* GluD1), o bandas de tamaño muy similar de un mismo *locus*, como 7+9 y 17+18 (*locus* GluB1).

Cuadro 2. Subunidades de gluteninas de alto peso molecular y alelos asociados en cultivares de trigos harineros**Table 2. High molecular weight glutenin sub-units and associated alleles of bread wheat cultivars**

Cultivar	Subunidades de Gluteninas			Alelos**		
	GluA1	GluB1	GluD1	GluA1	GluB1	GluD1
Grupos de cultivares con patrones comunes						
Andifén	0	20	2 + 12	c	e	a
Lucero	0	20	2 + 12	c	e	a
Lancero	0	20	2 + 12	c	e	a
Labriego	2*	20	2 + 12	(b), c	e	a
Lilifén	2*	7 + 8	5 + 10	b	b	d
Mexifén	2*	7 + 8	5 + 10	b	b	d
Candela	2*	7 + 8	5 + 10	b	b	d
Lautaro	2*	7 + 9	5 + 10	b	c	d
Ovación	2*	7 + 9	5 + 10	b	c	d
Cisne	2*	17 + 18	5 + 10	b	c	d
Quelén	(2*)	17 + 18	2 + 12	(b), c	i	a
Ciko	(2*)	17 + 18	2 + 12	(b), c	i	a
Sipa	1	17 + 18	5 + 10	a	i	d
Saeta	1	17 + 18	5 + 10	a	i	d
Onda	2*	17 + 18	5 + 10	b	i	d
Tamoi	2*	17 + 18	5 + 10	b	i	d
Cultivares con patrones únicos						
Andalién	0	13 + 16	5 + 10	c	f	d
Antufén	0	13 + 16	2 + 12	c	f	a
Ancoa	0	7 + 8	2 + 12	c	b	a
Laurel	2*	7	5 + 10	b	a	d
Nobo	1	7 + 9	5 + 10	a	c	d
Domo	2*	7	5 + 10	c	a	a
Promedio						

2*: Indica que no fue posible diferenciar esta banda de aquella del alelo 2 + 12 del *locus* GluD1.

**Las combinaciones alélicas están representadas, para cada *locus*, por una letra diferente.

De acuerdo con la nomenclatura de Payne *et al.* (1980), en los 22 cultivares analizados se identificaron 14 bandas: 1, 2, 2*, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18 y 20, a lo que se debe agregar el alelo nulo para el *locus* GluA1. Estos cultivares se muestran en la electroforesis de las Figuras 1a y 1b, donde se señalan sus respectivas subunidades.

Según Branlard y Dardevet (1985), la subunidad 2* codificada en el cromosoma 1A, las subunidades 7, 8 y 9 (en sus correspondientes combinaciones alélicas 7+8 y 7+9), codificadas en el cromosoma 1B, y las subunidades 5+10, codificadas en el cromosoma 1D, están relacionadas con una alta sedimentación; por el contrario, las subunidades 6+8 y 2+12 corresponden, según

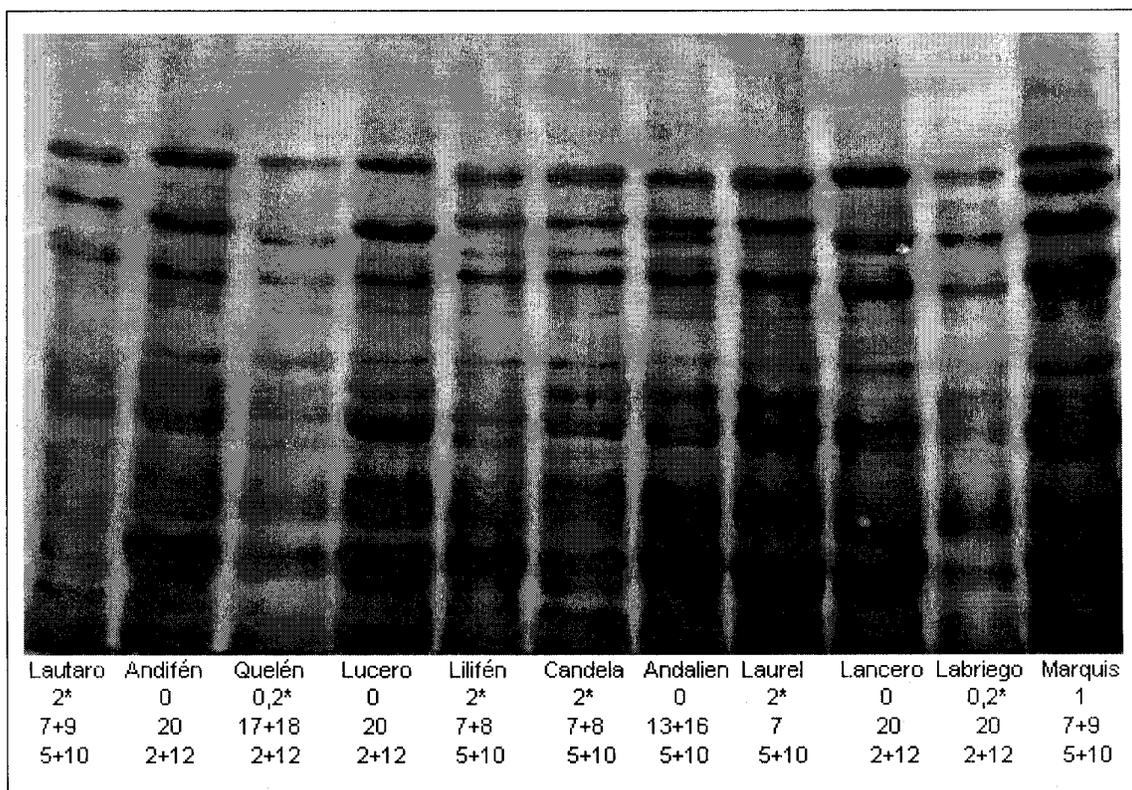


Figura 1a. Subunidades de gluteninas de alto peso molecular de 10 cultivares de trigo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, creados entre 1968 y 1996, separados por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) al 9%. En el carril de la derecha se incluye el patrón del cv. de referencia, Marquis.

Figure 1a. High molecular weight glutenin sub-units of 10 wheat cultivars created by the National Agricultural Research Institute, Quilamapu Regional Research Center, during the period 1968 to 1996, separated by electrophoresis in 9% PAGE-SDS. The rightmost lane contains the reference cv. Marquis.

estos autores, a una baja sedimentación. Payne *et al.* (1987) y Carrillo *et al.* (1990) complementaron la información anterior al señalar que en el cromosoma 1A se ubican los genes correspondientes a las subunidades 1 y 2*, consideradas favorables para la calidad, especialmente la 2*, en contraposición al alelo nulo (o banda 0), que está asociado a un bajo volumen de sedimentación. De acuerdo a lo anterior, los alelos de los trigos de Quilamapu (Cuadro 2) sugieren que los cultivares de mayor calidad serían Lilifén, Mexifén, Candela, Lautaro, Laurel, Ovación y Cisne; sin embargo, en este grupo sólo el cultivar Mexifén presentó un elevado índice de sedimentación (Mellado, 2001). El cultivar Onda,

con la mayor sedimentación de los 22 trigos analizados, presenta coincidentemente alelos que conferirían buena calidad.

Es interesante considerar el caso de los cultivares Candela y Lucero, que tuvieron los índices más bajos de sedimentación (Mellado, 2001); sin embargo, sólo el cultivar Lucero presentó alelos de mala calidad, en tanto que Candela se ubicó entre los mejor evaluados, coincidiendo con resultados anteriores (Hewstone e Hinrichsen, 1994). De este modo, se confirma que si bien las G-APM son factores considerados importantes en la determinación de calidad, existen otros factores no estudiados en este trabajo que estarían

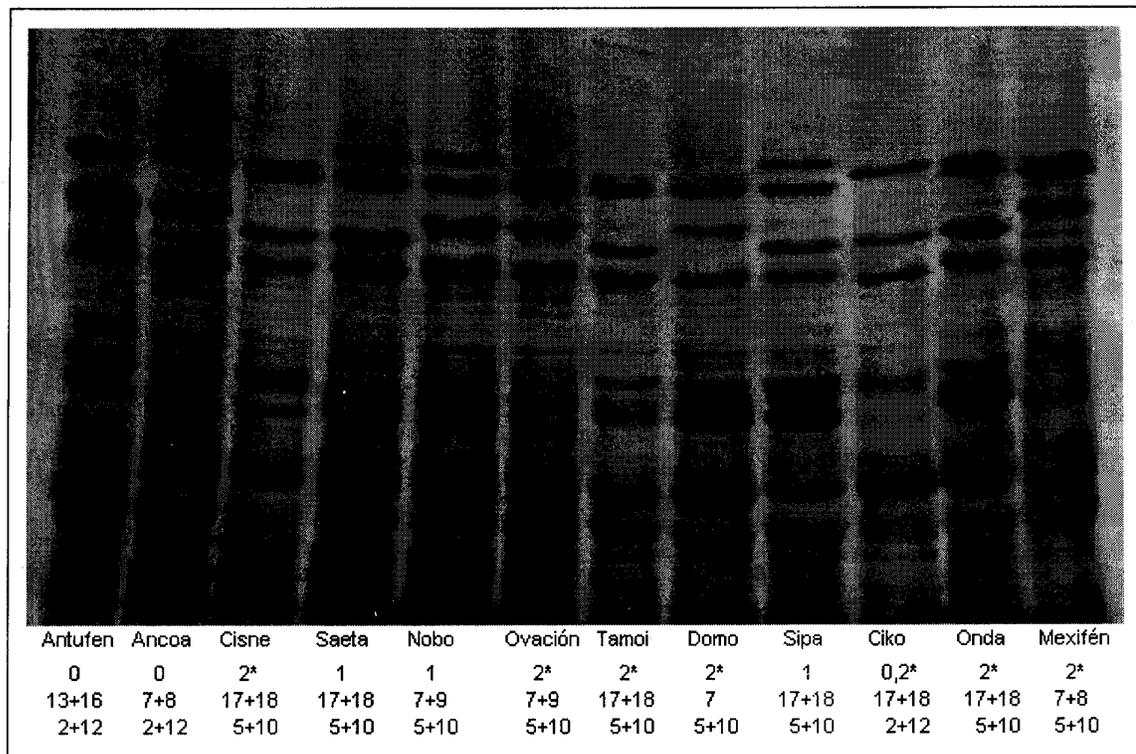


Figura 1b. Subunidades de gluteninas de alto peso molecular de 12 cultivares de trigo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, creados entre 1968 y 1996, separados por PAGE-SDS al 9%.

Figure 1b. High molecular weight glutenin sub-units of 12 wheat cultivars created by the National Agricultural Research Institute, Quilamapu Regional Research Center, during the period 1968 to 1996, separated by 9% PAGE-SDS gel electrophoresis.

presentes en variedades como Candela, que explicarían esta inconsistencia entre valores de sedimentación y alelos asociados con buena calidad (Zawistowska *et al.*, 1985).

Dentro de los trigos precoces estudiados se determinó que los cultivares con el menor índice de sedimentación fueron Ancoa y Antufén (Mellado, 2001), y ello, según el presente trabajo, sí estuvo asociado con alelos que pueden conferir mala calidad. En resumen, de los 22 trigos analizados, únicamente los cultivares Mexifén y Onda presentaron alelos relacionados a buena calidad, con un elevado volumen de sedimentación, y solamente en los cultivares Lucero, Ancoa y Antufén, se asociaron los alelos de mala calidad con valores bajos de sedimentación.

Patrones de gliadinas

Los patrones de gliadinas de los 22 trigos extraídas en medio alcohólico, y separadas en electroforesis en medio ácido A-PAGE (Figura 2), señalan que hay diferencias entre los cultivares, aunque hubo grupos de genotipos muy similares entre sí, difíciles de diferenciar. El alto grado de pureza del material biológico usado en el presente trabajo, determinado mediante el análisis separado de 10 semillas por cada cultivar, contrasta con aquel material usado en trabajos anteriores de Hinrichsen *et al.* (1997), donde se encontró que un porcentaje de las muestras presentaba grados variables de heterogeneidad en una o más bandas. El nivel de pureza es un requisito esencial si se pretende comparar patrones de gliadinas,

especialmente cuando se trata de cultivares emparentados, es decir, que tengan algunos progenitores comunes.

Las separaciones electroforéticas permitieron observar los cuatro grupos de proteínas descritos en esta familia (Bushuk y Zillman, 1978), es decir, gliadinas tipo α , β , δ y ω , como se aprecia en la Figura 2. Se diferenciaron grupos de cultivares de mayor similitud, con la excepción del cultivar Labriego que presenta una banda δ de alto peso molecular, diferente a todos los otros cultivares analizados, incluido Andifén que tiene los mismos progenitores (Cuadro 1).

Un primer grupo de genotipos, separados en base a diferencias en los péptidos ω , incluye a los cultivares Cisne, Saeta, Nobo, Ovación y Lautaro. Cisne tiene un péptido adicional en la región ω , que lo diferencia fácilmente. Los patrones de los otros cuatro cultivares son parecidos, y sólo unas bandas de la región α diferencian a Saeta y Ovación de Nobo y Lautaro. Estos dos pares de genotipos tienen patrones de gliadinas idénticos, aunque presentan algunas diferencias en los patrones de G-APM (Cuadro 2). Esta similitud en sus perfiles de gliadinas no guarda relación con la genealogía de estos cultivares, ya que si bien uno de los padres de Saeta tiene los mismos

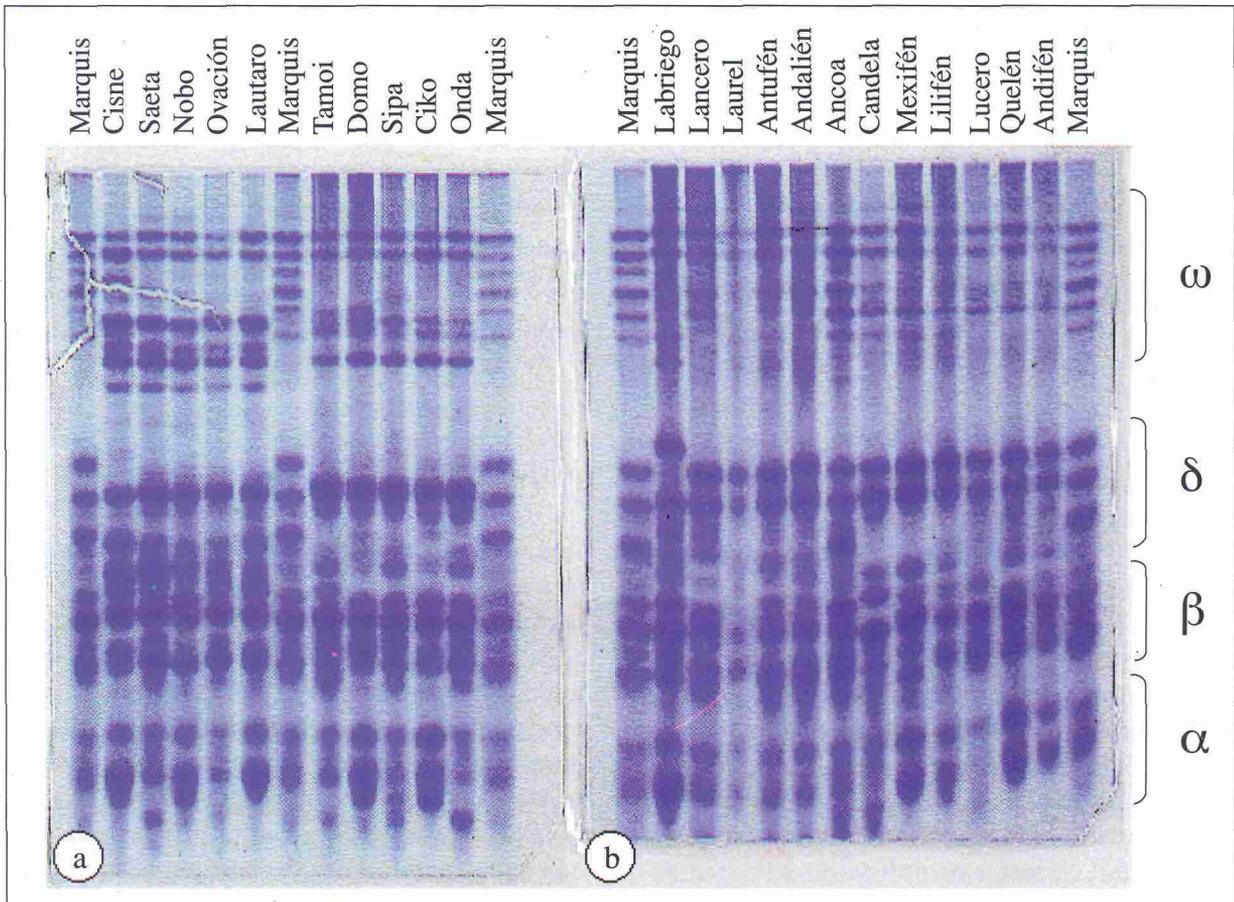


Figura 2. Perfiles de gliadinas de 22 cultivares de trigo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, analizados mediante gels de poliacrilamida en medio ácido (A-PAGE). Las letras griegas de la derecha indican los cuatro grupos de gliadinas de trigo (ver texto).

Figure 2. Gliadin profiles corresponding to 22 wheat cultivars released by National Agricultural Research Institute, Quilamapu Regional Research Center, analyzed by A-PAGE. Greek letters on the right indicate the four gliadin wheat groups (see the text).

progenitores que Ovación, en el caso de Nobo y Lautaro no comparten progenitores. En otras palabras, el hecho que dos o más cultivares tengan similitud en sus patrones de gliadinas no implica necesariamente una relación de parentesco directo entre ellas, ni viceversa, esto es, que cultivares provenientes de los mismos progenitores pueden presentar patrones muy diferentes. Lo que debiera evaluarse más adelante es si las diferentes bandas de gliadinas identificadas en cada cultivar tienen un correlato en sus progenitores, comportándose como marcadores genéticos simples.

El primer grupo analizado, así como un segundo grupo compuesto por los cvs. Tamoi, Domo, Sipa, Ciko y Onda, tienen bandas de la región δ menores a la banda 42 del cultivar de referencia Marquis, según la nomenclatura de Bushuk y Zillman (1978). En este segundo grupo, Domo y Ciko son muy semejantes en sus patrones de gliadinas, excepto por una banda de la región ω . De los otros tres cultivares de este grupo, Tamoi tiene una banda en la región β que no está presente en Sipa y Onda, mientras que estos dos últimos trigos difieren entre sí en algunos péptidos de la zona α . En este segundo grupo, sólo los dos últimos cultivares están estrechamente relacionados a nivel de pedigrí, ya que los mismos progenitores de Onda corresponden a uno de los padres de Sipa (Cuadro 2).

Los otros 12 genotipos estudiados (mitad derecha de la Figura 2) mostraron patrones de gliadinas relativamente similares; su diferenciación se dificultó por no haber estandarizado la carga de cantidades equivalentes de proteína total en cada carril. Al respecto, se ha observado con cierta frecuencia, y en algunas muestras con mayor incidencia, algún grado de inestabilidad o degradación peptídica, lo que podría deberse a particularidades de determinados genotipos o a la antigüedad de los granos analizados; esto último no es aplicable a esta investigación, ya que siempre se trabajó con semillas del año y obtenidas de un mismo ensayo. Respecto a este problema de inestabilidad, el extracto proteico del cv. Laurel

siempre tuvo un “chorreado” que se interpreta como degradación peptídica, por lo que no ha sido considerado en el análisis de gliadinas. Tres de los once cultivares restantes (Lucero, Quelén y Andifén), se diferenciaron de los demás por carecer de un péptido en la zona baja del grupo ω . También se debe destacar la diferencia en los patrones de gliadinas de Andifén y Labriego, a pesar de ser cultivares hermanos; esta diferencia prácticamente no se observó cuando se compararon los patrones de gluteninas de estos cultivares.

Dadas las dificultades para diferenciar trigos a través de patrones de gluteninas y gliadinas, se deberá recurrir a otras metodologías para un análisis más detallado de las diferencias genéticas entre cultivares, como marcadores de AFLP (Law *et al.*, 1998), cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (Lookhart *et al.*, 1986) o electroforesis capilar (Werner *et al.*, 1994). Otra alternativa sería el estudio directo de secuencias genómicas hipervariables, como los marcadores de microsatélites (Plaschke *et al.*, 1995; Zerené *et al.*, 2000) de los cuales existen más de 200 descritos en trigo (Röder *et al.*, 1995, 1998). Estos marcadores han sido postulados en numerosas especies como los más versátiles y apropiados para la identificación de genotipos (Morgante y Olivieri, 1993), lo que permite postular que en el futuro serán la metodología de elección para caracterizar cultivares de trigo.

CONCLUSIONES

1. Se encontró un adecuado nivel de reproducibilidad al comparar los resultados de G-APM del presente trabajo con resultados publicados anteriormente, lo que refuerza la hipótesis de que son marcadores que no son influenciados por el medio ambiente.
2. Cultivares como Candela, que muestran inconsistencia entre los alelos asociados a calidad y sus valores de sedimentación, refuerzan la noción de que hay factores adicionales a las G-APM involucrados en la determinación de calidad.

3. El análisis electroforético permitió separar los cuatro grupos de gliadinas descritos por Bushuk y Zillman en 1978, pero la alta similitud de los 22 cultivares estudiados no permitió diferenciar varios subgrupos integrados por diverso número de cultivares.
4. La similitud entre algunos cultivares, en cuanto a presentar idénticos patrones de bandas de G-APM o gliadinas, no tuvo un correlato en cuanto a tener progenitores comunes o coincidir en sus pedigríes. Complementariamente, tampoco aquellos cultivares que comparten progenitores muestran una mayor similitud en sus patrones de bandas.
5. Dado que existen varios grupos de cultivares que comparten los mismos patrones de G-APM y/o de gliadinas, ninguna de estas técnicas puede ser usada como único criterio para identificar cultivares; la combinación de ambas técnicas aumenta la probabilidad de diferenciar cultivares genéticamente muy similares. En este mismo sentido, la implementación de técnicas basadas en el uso de ADN, como los marcadores de microsatélites, representa una mejor opción que está siendo actualmente evaluada.

LITERATURA CITADA

- Branlard, G., and M. Dardevet. 1985. Diversity of grain protein and bread wheat quality. I. Correlation between gliadin bands and flour quality characteristics. *J. Cereal Sci.* 3:329-343.
- Bushuk, W., and R.R. Zillman. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.* 58:505-515.
- Carrillo, J.M., M. Rousset, C. Qualset, and D.D. Kasarda. 1990. Use of recombinant inbred lines of wheat for study of associations of high-molecular-weight glutenin subunit alleles to quantitative traits. 1. Grain yield and quality prediction tests. *Theor. Appl. Genet.* 79:321-330.
- Clements, R.L. 1987. A study of gliadin of soft wheats from the eastern United States using a modified polyacrylamide gel electrophoresis procedure. *Cereal Chem.* 64:442-448.
- Devos, K.M., and M.D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84:567-572.
- Dweikat, I., S. Mackenzie, M. Levy, and H. Ohm. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor. Appl. Genet.* 85:497-505.
- Forster, P.B., A.M. Lee, U. Lundqvist, S. Millam, K. Vamling, and M.A. Wilson. 1997. Genetic engineering of crop plants: from genome to gene. *Exp. Agric.* 33:15-33.
- He, S., H. Ohm, and S. Mackenzie. 1992. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 84:573-578.
- Hewstone, N., y P. Hinrichsen. 1994. Composición de subunidades de gluteninas de alto peso molecular de trigos chilenos de pan (*Triticum aestivum* L.). *Agricultura Técnica (Chile)* 54:211-218.
- Hinrichsen, P., X. Opitz, I. Ramirez, y C. Muñoz. 1997. Identificación de cultivares chilenos de trigos de pan (*Triticum aestivum* L.) y trigos candeales (*Triticum durum* Def.) basada en perfiles electroforéticos de gliadinas. *Agricultura Técnica (Chile)* 57:102-112.
- Kahl, G. 1997. Fingerprinting de plantas y hongos con microsatélites. p. 129-132. *In* Paredes, M. y Muñoz, C. (eds.). Conferencia de Planificación. Programa Nacional para el Desarrollo de la Biotecnología Agropecuaria y Forestal en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilmapu, Chillán, Chile.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
- Law, R.J., P. Donini, D.M. Koebner, C.J. Reeves, and J.R. Cooke. 1998. DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102:335-342.
- Lookhart, G.L., L.D. Albers, and J.A. Bietz. 1986. Comparison of polyacrilamide gel electrophoresis and high-performance liquid chromatography analyses of gliadin polymorphism in the wheat cultivar Newton. *Cereal Chem.* 63:497-500.
- Mellado, M. 2001. Mejoramiento de trigos harineros (*Triticum aestivum* L.) en la zona centro sur de Chile. III. Contenido y producción de proteína, y volumen de sedimentación en trigos invernales, alternativos y primaverales. *Agricultura Técnica (Chile)* 61:120-128.
- Morgante, M., and A.M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3:175-182.
- Ng, P.K.W., and W. Bushuk. 1987. Glutenin of Marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 64:324-327.
- Payne, P.I., C.N. Law, and E.E. Mudd. 1980. Control by homologous group of chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 58:113-119.
- Payne, P.I., M.A. Nightingale, A.F. Krattiger, and L.M. Holt. 1987. The relationships between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40:51-65.
- Plaschke, J., W.M. Ganal, and S.M. Röder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91:1001-1007.
- Röder, S.M., J. Plasche, S.U. König, A. Börner, M.E. Sorrells, S.D. Tanksley and M.W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246:327-333.
- Röder, S.M., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy, and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Van Toai, T.T., J. Peng, and St. K.S. Martin. 1997. Using AFLP markers to determine the genomic contribution of parents to populations. *Crop Sci.* 37:1370-1373.
- Werner, W.E., J.E. Wiktorowicz, and D.D. Kasarda. 1994. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis of gliadins and high molecular weight glutenin subunits. *Cereal Chem.* 71:397-402.
- Zawistowska, U., F. Bekes, and W. Bushuk. 1985. Involvement of carbohydrates and lipids in aggregation of glutenin proteins. *Cereal Chem.* 62:340-345.
- Zerené, M., D. Granger, D. Prehn, y P. Hinrichsen. 2000. Secuencias de microsatélites asociadas a genes de proteínas de reserva en variedades chilenas de trigo harinero: descripción y posible uso como marcadores de calidad panadera. *Agricultura Técnica (Chile)* 60:14-31.