

IDENTIFICACION DE LAS BANDAS DE GLIADINAS 42 Y 45 EN *TRITICUM DURUM* Def.

M.C. ARANGO, M.C. GIANIBELLI (*) Y L. CAMPAÑA

Cátedra de Cerealicultura. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP: cc 31,
1900 La Plata, Argentina. CIC Pcia. Bs. As.

Recibido: 10 de agosto, 1989. Aceptado: 21 de noviembre, 1989.

RESUMEN

Se evaluaron por electroforesis en gel de poliacrilamida variedades y líneas de mejoramiento de trigo candeal, estableciendo la presencia o ausencia de las bandas 45 y 42, relacionadas con la fuerza del gluten. Para ello se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 3,1. Las variedades Marquis, Wascana y los biotipos A y B de Duramba se utilizaron como referencia para el estudio de la Movilidad Relativa de las bandas. Todas las variedades presentaron la banda 45, con excepción de Thomas Ventania, que presentó la 42.

El objetivo del trabajo fue evaluar dicha técnica y su utilidad en la selección de cultivares sobre la base de su calidad industrial.

Palabras claves: Trigo candeal, electroforesis, gel de poliacrilamida, A-PAGE, gamma gliadinas, bandas 42 y 45.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF GLIADIN BANDS 42 AND 45 IN *TRITICUM DURUM* DEF.

Lines and varieties of durum wheat were evaluated in order to determine the presence or absence of 45 and 42 bands which are related with gluten strength. For this purpose polyacrylamide gel electrophoresis at pH 3,1 was used. Varieties Marquis, Wascana and biotypes A and B of Duramba were used as references for the study of relative bands mobility. All varieties presented band 45, excepting Thomas Ventania which presented band 42.

The aim of this work was to evaluate this technique to verify if it is useful as a selection criteria in breeding for industrial quality.

Key words: *Triticum durum* Def., electrophoresis, polyacrylamide gel, A-PAGE, gamma gliadins, bands 42 and 45.

INTRODUCCION

El trigo candeal (*Triticum durum* Def.) es utilizado para la obtención de sémolas y su posterior elaboración de pastas secas, debido a las excelentes propiedades reológicas (fuerza y elasticidad) que poseen sus masas, como así también el color de las sémolas y la calidad de cocción de la pasta.

Las proteínas del gluten constituyen el factor más importante en la calidad de cocción de las pastas. Uno de los objetivos de los planes de mejoramiento es obtener cultivares con buena

calidad de gluten y elevado porcentaje de proteínas.

Los test físicos que estiman la calidad de cocción, si bien resultan útiles para dicha selección, tienen la desventaja que evalúan parámetros altamente influenciados por el ambiente y que requieren gran cantidad de material, lo que dificulta su uso en filiales tempranas. Por tal motivo sería importante establecer un método preciso que permita determinar la calidad intrínseca del genotipo.

Las proteínas son el producto de la transcripción y traducción de los genes, por lo tanto

reflejan, el genotipo de los organismos. La información que ellas encierran puede leerse mediante técnicas de fraccionamiento y caracterización de sus constituyentes elementales (polipéptidos) como la electroforesis.

La caracterización de gliadinas por electroforesis resulta adecuada para la identificación de variedades de trigo. Damidaux et al. (1978, 1980) encontraron una fuerte relación entre la presencia de los componentes de gamma gliadinas 42 ó 45 (de acuerdo a la nomenclatura de Bushuk y Zillman, 1978) y las propiedades reológicas del gluten en trigos candeales. Los cultivares que poseen la banda 45 estuvieron asociados con gluten de calidad superior a los que presentaron la banda 42. Kosmolak et al. (1980) obtuvieron resultados similares utilizando variedades canadienses y Du Cros et al. (1982) con cultivares australianos.

La selección sobre la base de la electroforesis de gliadinas ofrece la ventaja de trabajar con proteínas con un marcado polimorfismo intervarietal, cuyos diagramas son independientes de los factores agroclimáticos (Zillman y Bushuk, 1979). Asimismo, debido a que se necesita muy poca cantidad de muestra, un solo grano, permite adecuarla a planes de mejoramiento para seleccionar cultivares sobre la base de su calidad en filiales tempranas.

El objetivo de este trabajo fue aplicar la técnica de electroforesis de gliadinas en variedades y líneas de trigo candeal, estableciendo la presencia o ausencia de las bandas 45 ó 42, relacionadas con la fuerza del gluten, a fin de comprobar su utilidad en el mejoramiento de la calidad.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron variedades de trigo candeal (*Triticum durum* Def.) proveniente de la Chacra Experimental de Barrow (MAA). Se evaluaron 26 muestras correspondientes a líneas y variedades de planes de mejoramiento (Tabla 1). En los casos en que se dispuso de material suficiente se realizó el Test de sedimentación (SDS) de Axford (1978) modificado por Massoni y Robutti (1986), para evaluar la calidad del gluten (Quick y Donnelly, 1980).

La variedad canadiense Marquis (trigo duro, rojo de primavera) fue utilizada como patrón de referencia para analizar los electroferogramas de gliadinas. Esta variedad fue facilitada por el Departamento de Genética del INTA (Castelar). La variedad Wascana y los Biotipos A y B de la variedad Duramba se incluyeron como referencia suplementaria para lograr una mejor determinación de las bandas 42 y 45.

Tabla 1: Variedades y líneas analizadas

Varieties and lines analyzed

Variedades y líneas de mejoramiento	Variedades provenientes de otros ensayos
Bonaerense Valverde D 3144	Bonaerense Valverde
Bonaerense Quilacó D 3286	Bonaerense Quilacó
Balcarceño INTA	Balcarceño INTA
Barrow N 2	Buck Candisur
21/62	Buck Cristal
25/62	Thomas Ventania
67/10840	Taganrog B. Balcarce
67/10844	
67/10856	
67/10857	
Buck Candisur	
Thomas Ventania	
67/10845	
67/10847	
67/10852	
67/10854	
70/10984	
70/10987	
70/10989	

Para caracterizar los cultivares se utilizó la técnica de electroforesis de gliadinas sobre gel de poliacrilamida a pH 3,1 empleada por Bushuk y Zillman (1978, 1979) y modificada por (Khan et al., 1985). Para mejorar el manipuleo de los geles se incrementó a 7,5% la concentración de acrilamida.

El trigo fue molido en un molinillo ciclónico Udy con malla de 1mm. La extracción de las gliadinas se realizó con etanol al 70% en relación 1:2 (400 mg. de muestra: 0.8 ml de solvente) con agitación constante durante 1 h. Las muestras fueron centrifugadas 10 min. a 10.000 g a 4º C. El sobrenadante se conservó a temperatura de -18º C y fue diluido en relación 1:1 con buffer lactato de aluminio-ácido láctico de pH 3.1 conteniendo 60% de sacarosa (P/V). El extracto de gliadinas se almacenó en un "freezer" por un período de 6 meses, con el objeto de evaluar la estabilidad de

los patrones en períodos prolongados de almacenamiento. De cada muestra se realizaron 2 extracciones y con cada una de ellas se hicieron 3 corridas electroforéticas.

Se utilizó para la electroforesis un equipo de 2 placas verticales (16 cm x 18 cm x 1.5 mm) sembrándose 20 muestras por placa y 10 ul por muestra. El gel y la solución buffer se prepararon de acuerdo a la fórmula detallada en la Tabla 2.

Durante la corrida la temperatura se controló por circulación de agua a 10º C aproximadamente. La duración fue de 3 h 30 min., con una corriente constante de 50 mA, durante la primera hora, y 60 mA hasta su finalización. Los geles se colorearon en una solución de 0,125g de Coomassie Brilliant Blue R-250 (disuelto en 12,5 ml de etanol absoluto) en 250 ml de ácido tricloroacético al 12% y se conservaron en agua destilada a 4º C. Estos se fotografiaron con Película Panato-

Tabla 2: Reactivos para la preparación del gel y la solución buffer

Reactives for gel and buffer solution preparation

	csp 100 ml
Solución del gel	
Acilamida	7,5 g.
N, N'-metileno/bis/acrilamida	0,375 g.
Acido Ascórbico	0,024 g.
Sulfato ferroso	0,0002 g.
Solución catalizadora	
Agua oxigenada al 3%	100 µl
Tiempo de polimerización	10 min.
Solución de polimerización	
Lactato de aluminio	0,250 g.
Acido Láctico	hasta pH 3,1

nic x de 32 ASA-16 Din, en blanco y negro de alta definición.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los electroferogramas del material analizado se muestran en las figuras 1, 2 y 3. En los mismos se incluyen las variedades Marquis, Wascana, Duramba A y Duramba B.

Se observaron diferencias entre variedades en cuanto al número de bandas, ubicación (distancia recorrida desde el origen) e intensidad de coloración; con patrones específicos para cada cultivar. No se registraron modificaciones cualitativas en los patrones de gliadinas entre las distintas extracciones ni entre las corridas de una misma variedad.

Comparando los electroferogramas de las variedades Valverde, Quilacó, Candisur, Balcar-

ceño INTA y Thomas Ventania, provenientes de distintos ensayos, se observó la estabilidad en los patrones de gliadinas en cada una de ellas.

La movilidad relativa de las bandas se determinó por comparación con los patrones de las variedades Marquis, Wascana y los Biotipos A

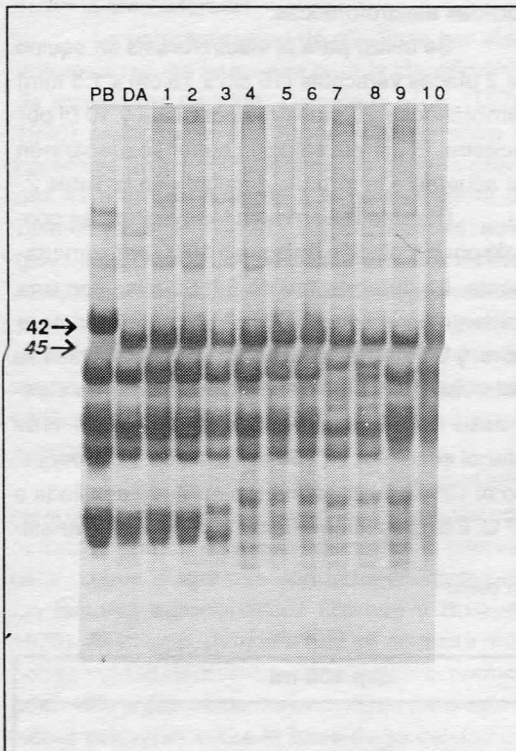


Figura 1

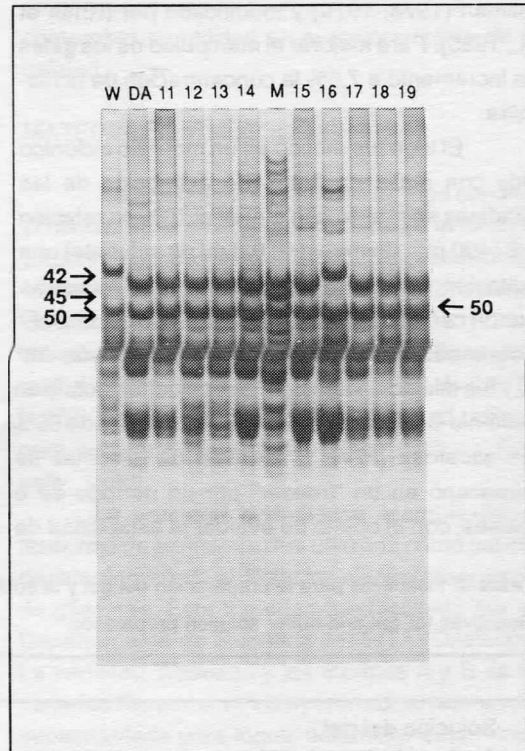


Figura 2

Figura 3

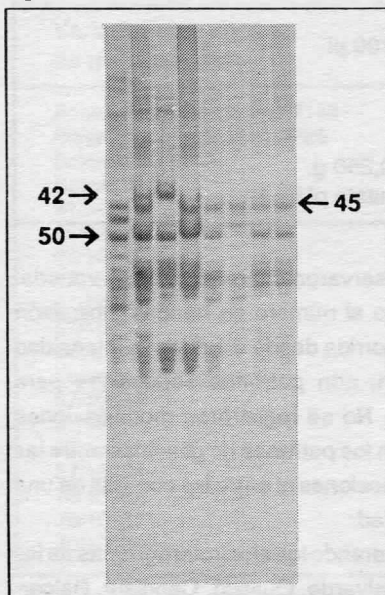


Figura 1: Patrones de gliadinas obtenidos por electroforesis: DB- Duramba B, DA- Duramba A, 1- 67/10.857, 2-67/10856, 3-67/10844, 4- 67/10840, 5- 25/62, 6- 21/62, 7- Barrow N 2, 8- Balcarceño INTA, 9- Bonaerense Quilacó D 3206, 10- Bonaerense Valverde D 3144.

Gliadin patterns obtained by electrophoresis: DB- Duramba B, DA- Duramba A, 1- 67/10857, 2-67/10856, 3- 67/10844, 4- 67/10840, 5- 25/62, 6- 21/62, 7- Barrow N 2, 8- Balcarceño INTA, 9- Bonaerense Quilacó D 3206, 10- Bonaerense Valverde D 3144.

Figura 2: Patrones de gliadinas obtenidos por electroforesis: W- Wascana, DA- Duramba A, 11- 67/10854, 12- 70/10984, 13- 70/10987, 14- 70/10989, M- Marquis, 15- Buck Candisur, 16- Thomas Ventania, 17- 67/10845, 18- 67/10847, 19- 67/10852.

Gliadin patterns obtained by electrophoresis: W- Wascana, DA- Duramba A, 11- 67/10854, 12- 70/10984, 13- 70/10987, 14- 70/10989, M- Marquis, 15- Buck Candisur, 16- Thomas Ventania, 17- 67/10845, 18- 67/10847, 19- 67/10852.

Figura 3: Patrones de gliadinas obtenidos por electroforesis: M- Marquis, 1- Taganrog Buck Balcarce, 2- Thomas Ventania, 3- Buck Cristal, 4- Buck Candisur, 5- Balcarceño INTA, 6- Bonaerense Quilacó, 7- Bonaerense Valverde.

Gliadin patterns obtained by electrophoresis: M- Marquis, 1- Taganrog Buck Balcarce, 2- Thomas Ventania, 3- Buck Cristal, 4- Buck Candisur, 5- Balcarceño INTA, 6- Bonaerense Quilacó, 7- Bonaerense Valverde.

Tabla 3: Test de sedimentación con SDS

Sedimentation test with SDS

Variedades	Valores de Sedimentación (ml) (*)
Taganrog Buck Balcarce	28,7
Thomas Ventania	14,0
Buck Cristal	22,7
Buck Candisur	22,0
Balcarceno INTA	33,5
Bonaerense Quilacó	34,3
Bonaerense Valverde	36,3

(*) Valores promedio de tres repeticiones.

y B de Duramba, usando la nomenclatura de Bushuk y Zillman (1978). En todos los casos se observó la presencia de la banda 45, con excepción de la variedad Tomás Ventania que presentó la banda 42.

En la tabla 3 se observa que la variedad Thomas Ventania presentó un valor de sedimentación significativamente inferior al resto de las variedades; lo que estaría relacionado según Quick y Donnelly (1980), con una menor calidad de gluten. Es importante destacar que este cultivar fue el único que presentó la banda 42, demostrando la asociación de esta gliadina con baja calidad en trigo candeal.

En cuanto al tiempo de conservación del extracto de gliadinas, se observó que en corridas realizadas hasta los 45 días de la extracción no hubo distorsiones en los patrones. Sin embargo, corridas realizadas con los mismos extractos conservados por 6 meses a 18° C, presentaron problemas de baja resolución, un efecto de chorro en la zona media del gel sin observarse

las bandas correspondientes a las gliadinas de mayor movilidad, las alfa gliadinas.

Los resultados obtenidos confirman que esta técnica es útil para determinar diferencias genotípicas, siendo adecuada para la identificación de cultivares de trigo candeal, así como es un método de suma utilidad en la selección de cultivares por calidad, ya que con una pequeña cantidad de material pueden detectarse con precisión las bandas de gamma gliadinas asociadas con la calidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Ing. María Laura Seghezzi y al Ing. H.L. Carbajo de la Chacra Experimental de Barrow MAA de la Provincia de Buenos Aires por facilitar el material analizado en este trabajo. Asimismo se agradece a Mr. M.C. Mackay (Australian Winter Cereals Collection) el envío de las muestras utilizadas como patrones.

BIBLIOGRAFIA

- Axford, D.W.E.; Dermott, E.E. and Redman, D.G.- Small-scale test on bread-making quality. Milling feed and fertilizer. 66 (5): 18. (1978).
- Bushuk, W. and Zillman, R.R. - Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I-Apparatus, method and nomenclature. Can. J. Plant Sci. 58:505. (1978).
- Damidoux, R. and Feillet, P.- Mise en evidence de relations applicables en selection entre 1 electrophoregramme del gliadines et les propietes viscoelastiques de gluten de *Triticum durum* Def. C.R. Hebd Seances Acad. Sci. Paris, Ser. D. 287:701. (1978).
- Damidoux, R.; Autran, J.C. and Feillet, P.- Gliadin electrophoregrams and measurements of gluten viscoelasticity en durum wheats. Cereal Foods World 25:754. (1980).
- Du Cros, D.L.; Wrigley, C.W. and Hare, R.A.- Prediction of durum wheat quality from gliadin protein composition. Aust. J. Agric. Res. 33:429. (1982).
- Khan, K.; Hamada, A.S. and Patek, J. - Polyacrilamylde gel electrophoresis for wheat variety identification: Effect of variables on gel properties. Cereal Chem. 62 (5): 310-313. (1985).
- Kosmolak, F.G.; Dexter, J.E.; Matsuo, R.R.; Leisle, D. and Marchylo B.A.- A relationship between durum wheat quality and gliadin electrophoregrams. Can. J. Plant Sci. 60:427-432. (1980).
- Mazzoni, M.R. y Robutti, J.L.- Adaptación del método de sedimentación SDS a la selección por calidad en generaciones tempranas de trigo. Primer Congreso Nacional de Trigo. Cap. I:253-257. (1986).
- Quick, J.S. and Donnelly, B.J.- A rapid test for estimating durum wheat gluten quality. Notes. Crop Sci., vol. 20, Nov-Dic. (1980).
- Zillman, R.R. and Bushuk, W.- Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. II - Effects of environmental factors on the gliadin electrophoregram. Can. J. Plant. Sci. 59 282:286 (1979)