

Síntesis de proteínas y relaciones citogenéticas en el grupo *Aegilops-triticum*

por FRANCISCO GARCIA OLMEDO

Sección de Química y Tecnología de los Cereales, Centro de Cerealicultura,
Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, Madrid.

A B S T R A C T

Kernel proteins from *Aegilops-Triticum* species were extracted and fractionated by a simplified procedure. Diploid species relationships as established by this method are parallel to a great extent to those established by cytogenetical methods. Protein distributions of *Aegilops* allopolyploids are reconstructed by mixture of the diploid parental species. *Triticum* tetraploids are not satisfactorily reconstructed this way, a fact which is consistent with the uncertainty of the *B* genome origin.

I N T R O D U C C I O N

Las especies comprendidas en los géneros *Aegilops* y *Triticum* constituyen uno de los grupos mejor caracterizados desde un punto de vista citogenético. Los estudios cariomorfológicos de SENJANINOVA-KOROZAGINA (1) y CHENNAVEERAI AH (2) y, sobre todo, el análisis genómico realizada por KIHARA y su escuela por el método llamado de los analizadores (3), han permitido establecer la constitución genómica de los aloploiploides y las relaciones citogenéticas entre los genomios básicos del mencionado grupo. Estas especies constituyen, por tanto, un material muy adecuado para estudiar hasta qué punto los métodos bioquímicos pueden duplicar o complementar los resultados obtenidos por métodos citogenéticos. Por otra parte, una caracterización bioquímica detallada permitiría eventualmente establecer secuencias evolutivas sobre la base de las relaciones genómicas ya establecidas.

En el presente trabajo hemos estudiado por un método simplificado, susceptible de ser aplicado a pequeñas muestras, las distribuciones electroforéticas de las proteínas del grano de las diez

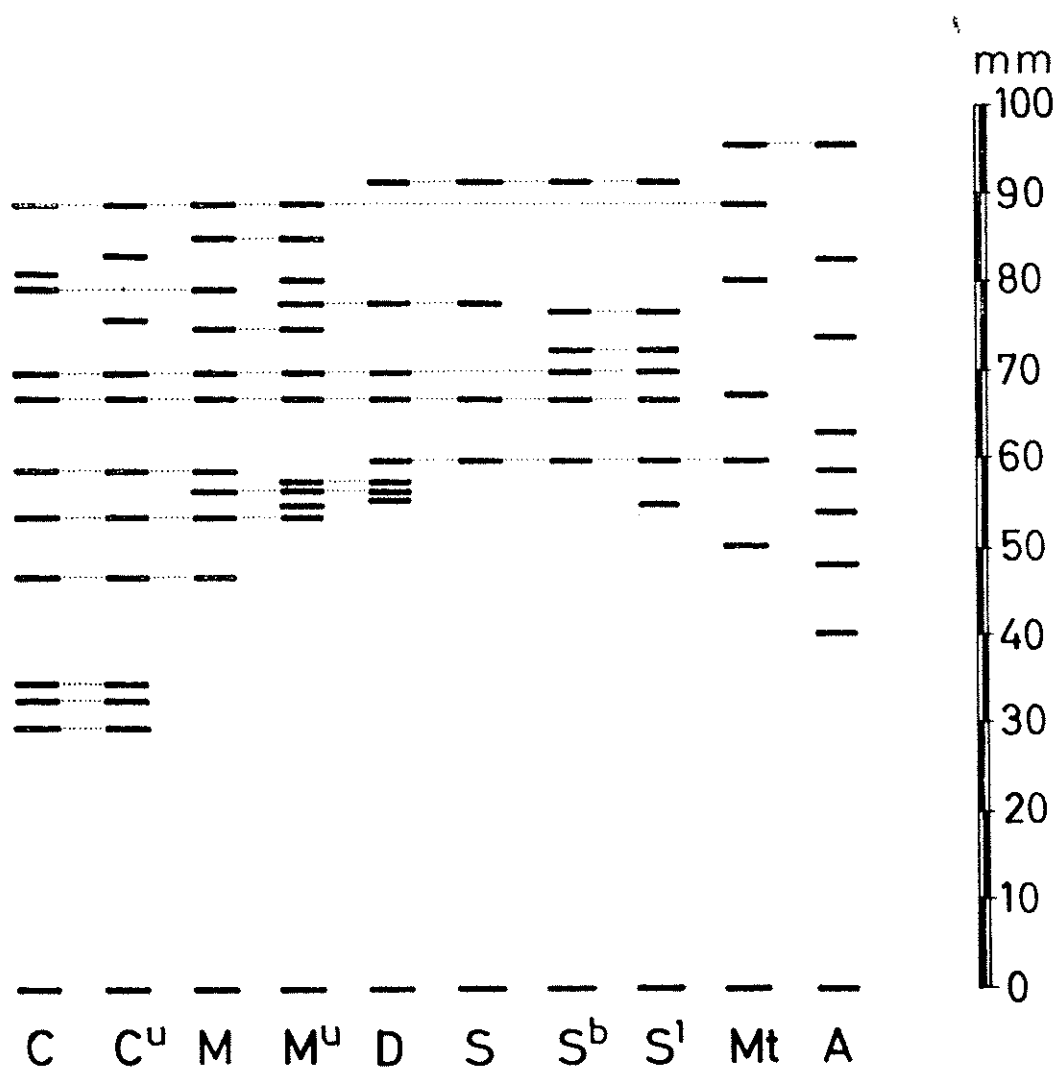


FIG. 1. Esquema de las distribuciones de proteínas del grano de las especies diploides *Ae. caudata* (C), *Ae. umbellulata* (C^u), *Ae. comosa* (M), *Ae. uniaristata* (M^u), *Ae. squarrosa* (D), *Ae. speltoides* (S), *Ae. bicornis* (S^b), *Ae. longuissima* (S^l), *Ae. mutica* (M_l) y *T. monococcum* (A).

especies diploides con genomios diferenciados (4) y de los alopolioides naturales derivados de ellas.

MATERIAL Y METODOS

Muestras

Se obtuvo manualmente semilla (1 gr.) de cada una de las siguientes especies:

<i>Especies</i>	<i>Tipo de Genomio</i>
<i>Ae. speltoides</i>	S
<i>Ae. longuissima</i>	Sl
<i>Ae. bicornis</i>	Sb
<i>Ae. squarrosa</i>	D
<i>Ae. comosa</i>	M
<i>Ae. uniaristata</i>	M ^u
<i>Ae. mutica</i> (*)	M _t
<i>Ae. caudata</i>	C
<i>Ae. umbellulata</i>	C ^u
<i>T. monococcum</i>	A
<i>Ae. crassa</i>	DM ^{er}
<i>Ae. ventricosa</i>	DM ^v
<i>Ae. cylindrica</i>	DC
<i>Ae. juvenalis</i>	DCcMj
<i>Ae. columnaris</i>	C ^u M ^c
<i>Ae. biuncialis</i>	C ^u M ^b
<i>Ae. triaristata</i>	C ^u M ^{tr}
<i>Ae. ovata</i>	C ^u M ^o
<i>Ae. variabilis</i>	C ^u S ^v
<i>Ae. triuncialis</i>	C ^u C
<i>T. durum</i>	AB
<i>T. polonicum</i>	AB
<i>T. carthlicum</i>	AB
<i>T. timopheevi</i>	AB'
<i>T. aestivum</i>	ABD

(*) De esta muestra sólo dispusimos de 50 mg. Las muestras se molturaron en un molino Culatti.

Extracción y electrofóresis de las proteínas

Muestras de 50 mg. se maceraron durante 21 horas a 4° C con 125 microlitros de Urea 2M o con 75 microlitros de agua. Los extractos así obtenidos fueron fraccionados directamente por electroforesis sobre gel de almidón. La inserción se verificó mediante cuadrados de papel Whatman n.º 3 (3 mm. × 10 mm.) previamente embebidos en los extractos. Los geles se prepararon con Urea 3M, tampón lactato de aluminio, pH 3,2, fuerza iónica 0,1 y almidón (Conaught Medical Res. Lab.) al 10 %. Se aplicó una caída de potencial de 15 voltios/cm. durante 3 horas. La tinción se verificó con nigrosina (0,5 % en ácido acético : agua 1 : 1 v/v) durante 12 horas y se destiñó con etanol al 70 % durante 6 horas. Las determinaciones densitométricas se hicieron con un Cromoscan (JOYCE & LOEBL).

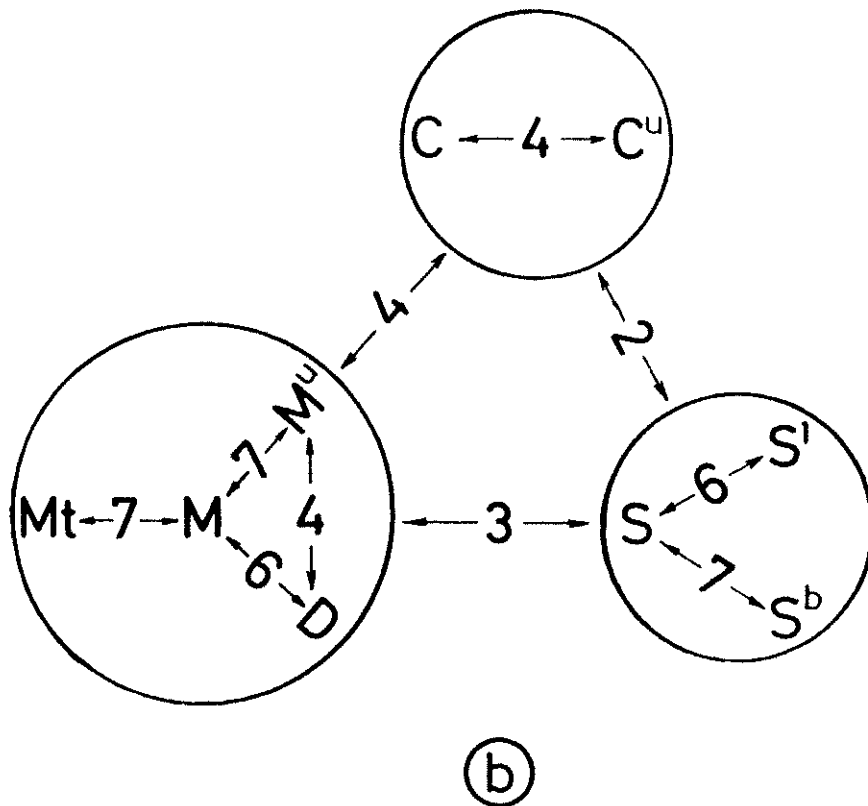
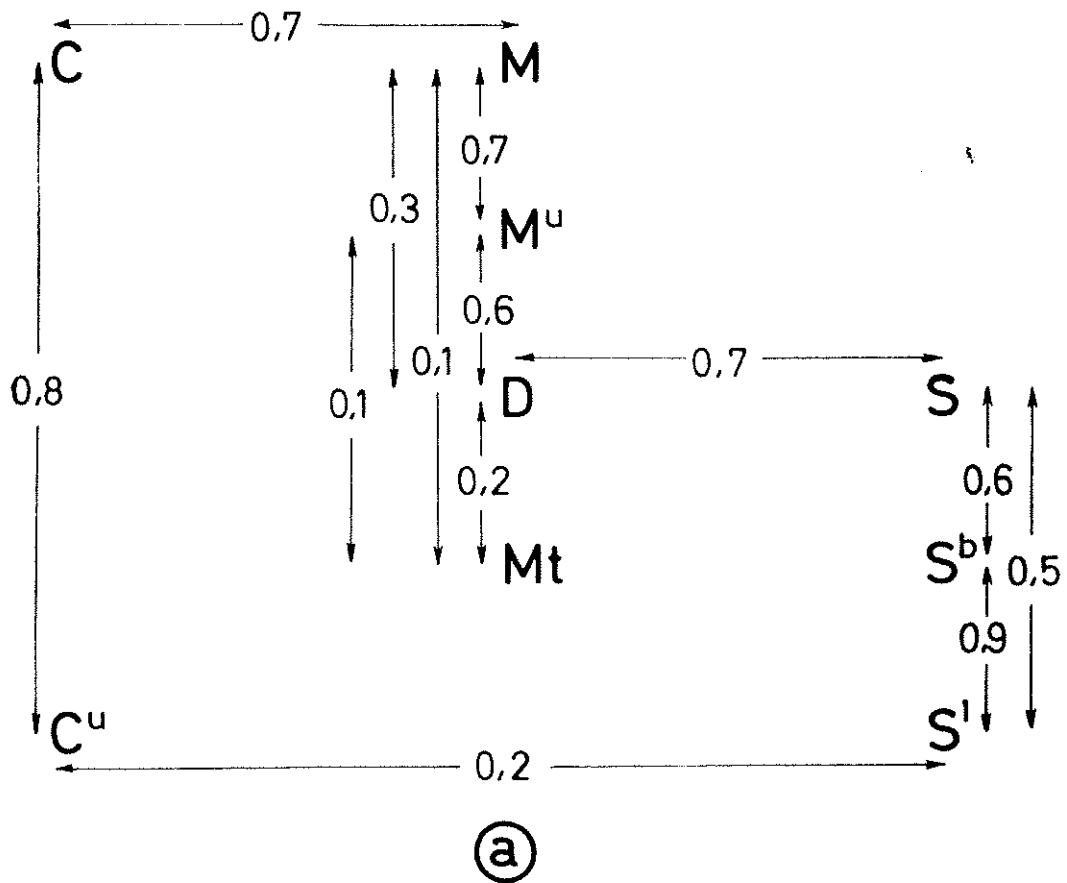


FIG. 2. a) Relaciones deducidas de la fig. 1 entre las especies diploides del grupo *Aegilops-Triticum*. b) Relaciones entre las mismas especies basadas en la afinidad cromosómica (número modal de bivalentes) según Kihara.

RESULTADOS Y DISCUSION

Sobre el método

La interpretación de los resultados que expondremos a continuación requiere tener presentes una serie de hechos relativos al método empleado en nuestro estudio:

a) A igualdad de condiciones las proteínas homólogas serán igualmente solubilizadas. Las extracciones realizadas no son cuantitativas, pero sí reproducibles en cuanto al número y proporción relativa de los componentes detectados.

b) Al efectuarse la electroforesis directamente con el extracto se evitan posibles modificaciones de la proteína durante las manipulaciones posteriores. Las proteínas extraídas por el agua en nuestras condiciones son igualmente extraídas por urea 2M, que extrae además otras proteínas con movilidad electroforética correspondiente a las gliadinas, que no han sido consideradas en nuestro estudio por no ser claramente resueltas.

c) Por extraer las proteínas de la totalidad del grano, hemos de interpretar con cautela las relaciones cuantitativas entre componentes, ya que vendrán afectadas por variaciones de la relación endospermo/cubiertas/germen en las distintas especies.

d) La movilidad electroforética es sólo una propiedad de las proteínas, pudiendo presentar la misma movilidad más de un componente. Las proteínas con igual movilidad serán consideradas como potencialmente homólogas y las de distinta movilidad como no homólogas.

Especies diploides

Entre las especies diploides de *Aegilops* y *Triticum* existen diez con genomios diferenciados, de los que sólo uno pertenece a *Triticum* y el resto a *Aegilops* (4). Las relaciones citogenéticas entre estos genomios han sido establecidas por KIHARA (3) basándose principalmente en la afinidad cromosómica (número modal de bivalentes) y, en menor grado, en la fertilidad de los híbridos interespecíficos. Según estos criterios, los nueve genomios de *Aegilops* pueden clasificarse en tres grupos.

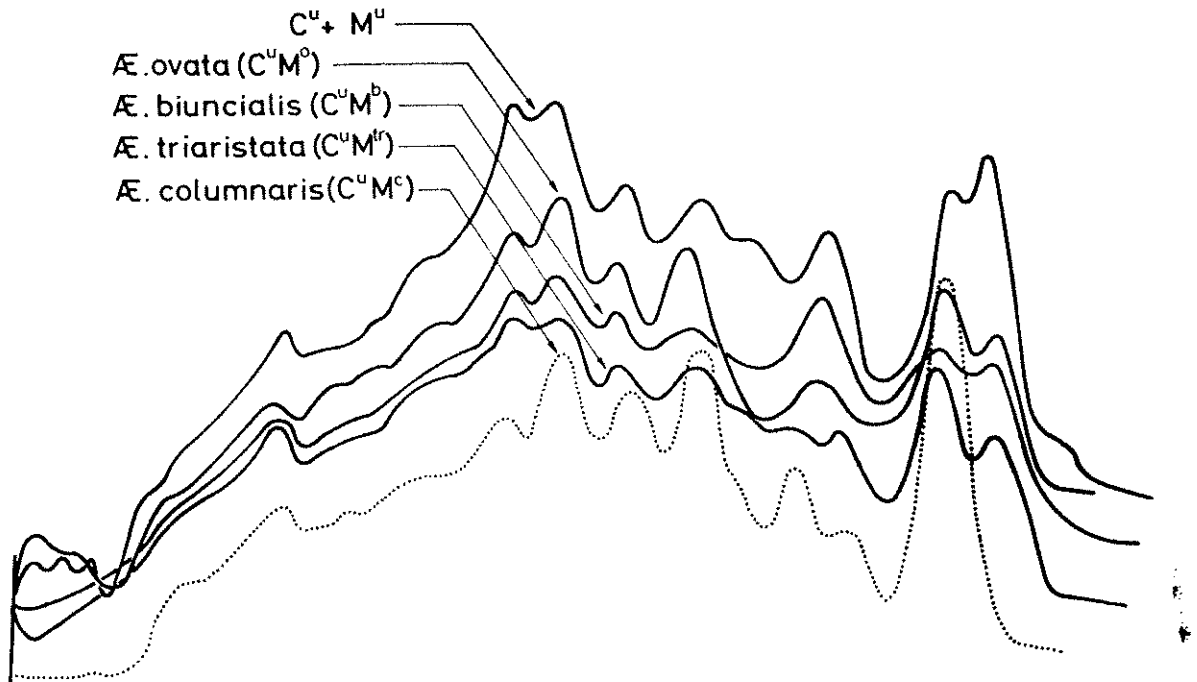


FIG. 3. Comparación de los densitogramas de las especies del grupo *CM* con el testigo $Cu + Mu$. En esta figura y siguientes el punto de inserción y el electrodo positivo están a la izquierda.

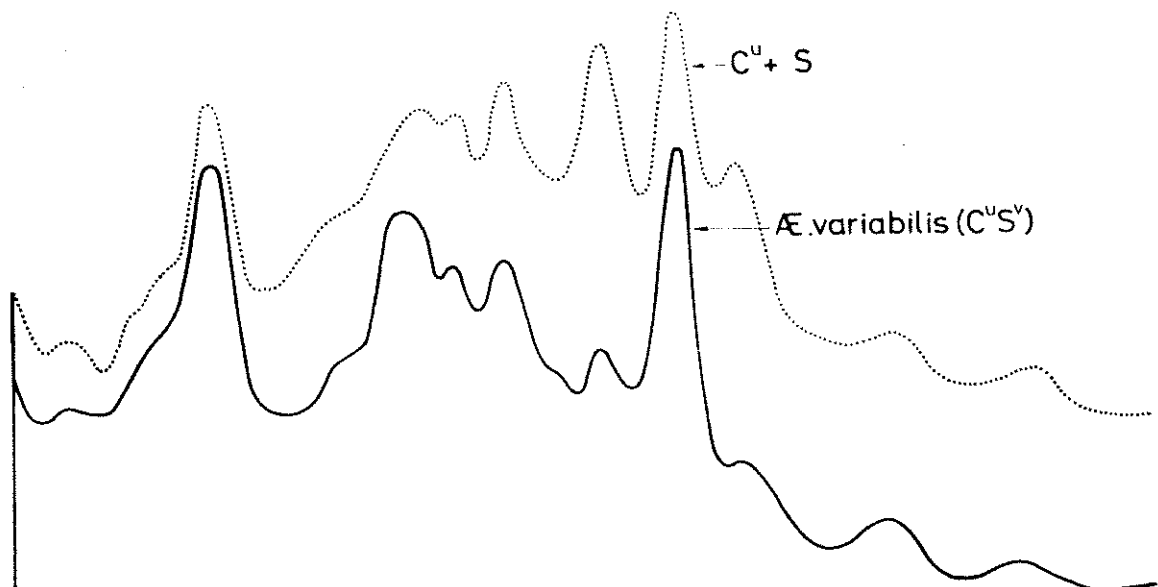


FIG. 4. Comparación del densitograma de la especie *Æ. variabilis* con el testigo $Cu + S$.

- | | | |
|-------------|---|--|
| 1. Grupo C: | <i>Ae. caudata</i> (C), | <i>Ae. umbellulata</i> (C ^u) |
| 2. Grupo M: | <i>Ae. comosa</i> (M), | <i>Ae. uniaristata</i> (M ^u) |
| | <i>Ae. squarrosa</i> (D), | <i>Ae. mutica</i> (M _i) |
| 3. Grupo S: | <i>Ae. speltoides</i> (S), | <i>Ae. bicornis</i> (S ^b) |
| | <i>Ae. longissima</i> (S ^l) | |

En la figura 1 hemos simbolizado las distribuciones electroforéticas de las proteínas del grano de estas especies atendiendo exclusivamente a su movilidad relativa. Para expresar en forma aproximada el grado de homología entre dos distribuciones dadas hemos empleado el cociente entre el número de componentes potencialmente homólogos y el número total de componentes detectados.

Los resultados obtenidos por este método se comparan con los obtenidos por KIHARA (3) en la figura 2. La concordancia entre ambos esquemas es considerable. El grupo *M* resulta prácticamente equidistante entre el *C* y el *S*, siendo bajo el grado de homología entre estos dos últimos grupos. Dentro de cada grupo existen relaciones bien definidas entre genomios que, en general, son similares en los dos esquemas. Sin embargo, existen algunas discrepancias entre las que merece resaltarse la escasa homología entre la distribución del genomio *M_i* y las de los genomios *M*, *M^u* y *D*, que no es la que cabría esperar de la gran afinidad cromosómica entre *M_i* y *M*. Los genomios *C* y *C^u* resultan más próximos entre sí en nuestro esquema que en el de KIHARA, pero es de señalar que, según el mismo investigador, el alopoloide de constitución genómica *C C C^u C^u* es prácticamente un autotetraploide. En el grupo *S* existen un mayor grado de homología entre los genomios *S^l* y *S^b* que entre *S* y cualquiera de estos dos.

Entre los grupos *M* y *C*, el punto de contacto está representado por *Ae. comosa* (*M*) y *Ae. caudata* (*C*). Entre los grupos *M* y *S*, el par *Ae. squarrosa* (*D*) y *Ae. speltoides* (*S*) presenta el mayor grado de homología.

Aunque en nuestro esquema no se han tenido en cuenta las relaciones cuantitativas entre componentes, debe mencionarse que éstas refuerzan en general las conclusiones basadas en la movilidad electroforética.

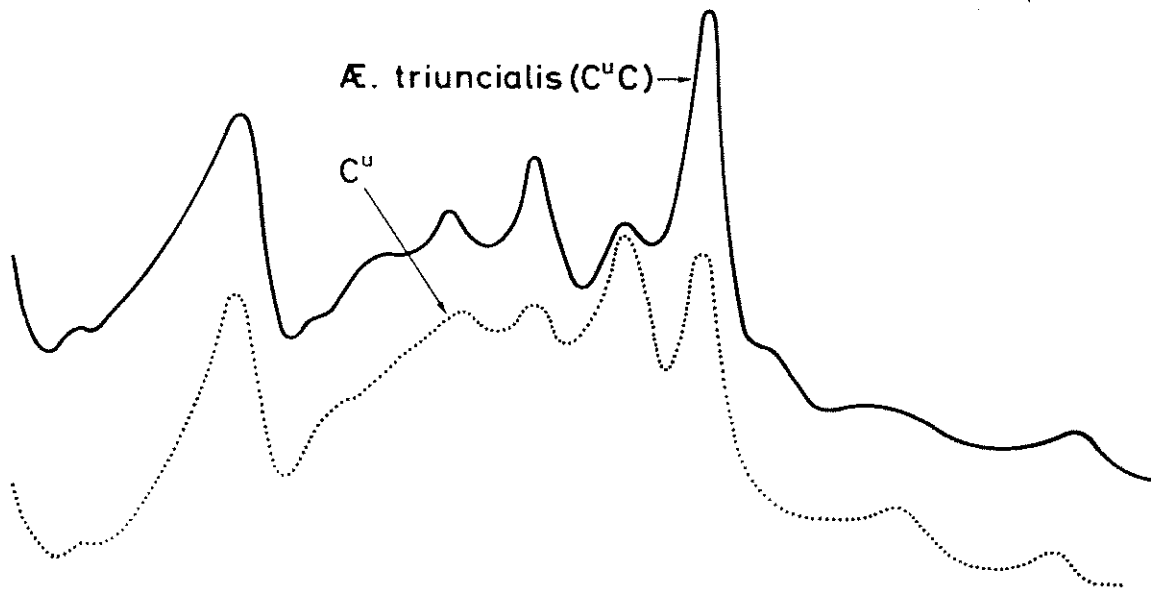


FIG. 5. Comparación de *Ae. triuncialis* ($C^u C$) con *Ae. umbellulata* (C^u).

Especies aloploides

En el estudio de los aloploides naturales de *Aegilops* y *Triticum* hemos empleado como testigos mezclas por partes iguales de las especies diploides que aportaron los genomios constituyentes del aloploide. Por este procedimiento hemos podido comprobar que, para los grupos de aloploides que poseen como genomios básicos

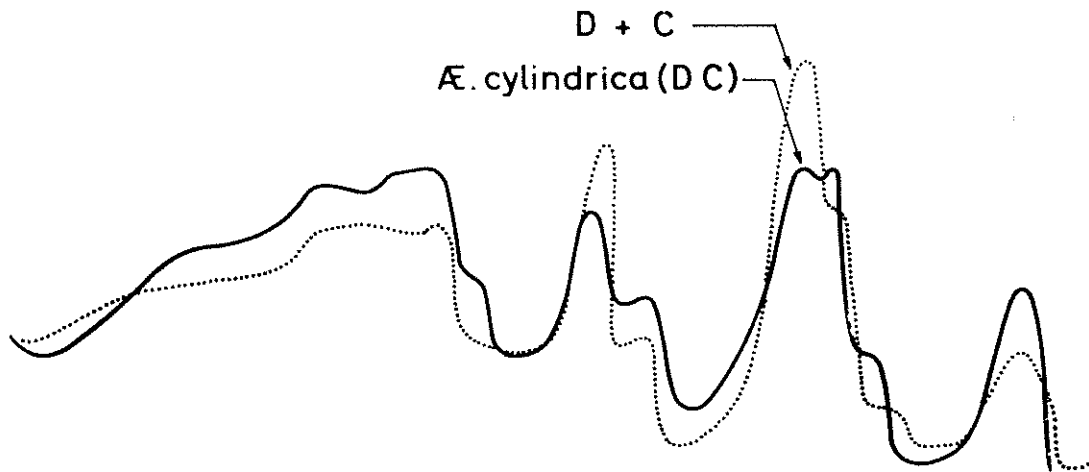


FIG. 6. Comparación de *Ae. cylindrica* (DC) con el testigo $D + C$.

el C^u y el D , la síntesis de proteínas específicas de cada genomio se superpone en el aloploide.

Según puede observarse en las figuras 3 a 7, el grado de homología entre las distribuciones de proteínas de los testigos y de los aloploides naturales es considerable.

Entre los aloploides cuyo segundo genomio es del grupo M (Fig. 3) es de resaltar, además del alto grado de homología, la buena concordancia en las relaciones cuantitativas entre componentes. La especie *Ae. columnaris* ($C^u M^u$) no presenta el componente de mayor movilidad, que está presente en las demás especies del grupo y cuya síntesis está regulada por el genomio M .

La gran similitud entre las distribuciones de proteínas de los genomios C^u y C se refleja en el hecho de que *Ae. triuncialis* ($C^u C$) presenta una distribución casi idéntica a la de *Ae. umbellulata* (C^u) (Fig. 5).

En la figura 8 se presentan las distribuciones de proteínas correspondientes a aloploides del género *Triticum*. Para los alotetraploides se han usado dos testigos: uno con *Ae. speltoides* (S) y el otro con *Ae. bicornis* (S^b). Es de señalar que *T. polonicum* (AB) *T. carthlicum* (AB) y *T. durum* (AB), presentan distribuciones prácticamente idénticas, siendo la de *T. timopheevi* (AB') distinta.

Ninguno de los testigos presenta un grado de homología con los trigos tetraploides del mismo orden que el observado en los aloploides del género *Aegilops*. Esto no es sorprendente si tenemos en cuenta que no se ha encontrado hasta el presente una especie diploide que se corresponda exactamente con el genomio B , si bien es casi seguro que el genomio B se derivó de sitopsis (genomios S , S^1 y S^b) (4). No obstante, la posible interacción entre genomios no debe ser descartada como origen de las desviaciones observadas entre los testigos y las especies aloploides. El estudio de las interacciones y particularmente el de la posible formación de proteínas híbridas (proteínas a las que cada genomio aporta una cadena polipeptídica) requeriría disponer de trigos tetraploides sintéticos, lo que no nos ha sido posible por el momento.

La distribución de proteínas de *T. aestivum* (ABD) no se reconstruye satisfactoriamente a partir de las tres especies ancestrales, pero sí se obtiene una buena aproximación por mezcla de *T. durum* (AB) y *Ae. squarrosa* (D). En este caso hemos dispuesto de un alohexaploide sintético, *T. spelta* (*T. carthlicum* (AB) y *Ae.*

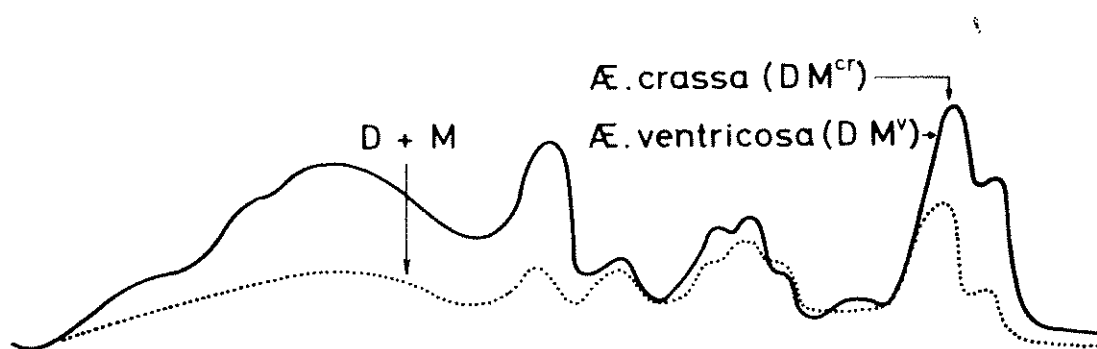


FIG. 7. Comparación de *Ae. crassa* (DM^{cr}) y *Ae. ventricosa* (DM^v) con el testigo $D + C$.

squarrosa (D) y su distribución de proteínas ha resultado ser idéntica a la de *T. aestivum*. El mencionado *T. spelta* sintético fue obtenido por KIHARA y nuestra observación concuerda con su hipótesis de que el trigo hexaploide se originó del tetraploide cultivado y de *Ae. squarrosa*.

En conclusión diremos que el método que se propone puede proporcionar valiosa información complementaria a los experimentos citogenéticos. Es evidente que en determinados casos no será discriminatorio, pero tiene la enorme ventaja de su simplicidad.

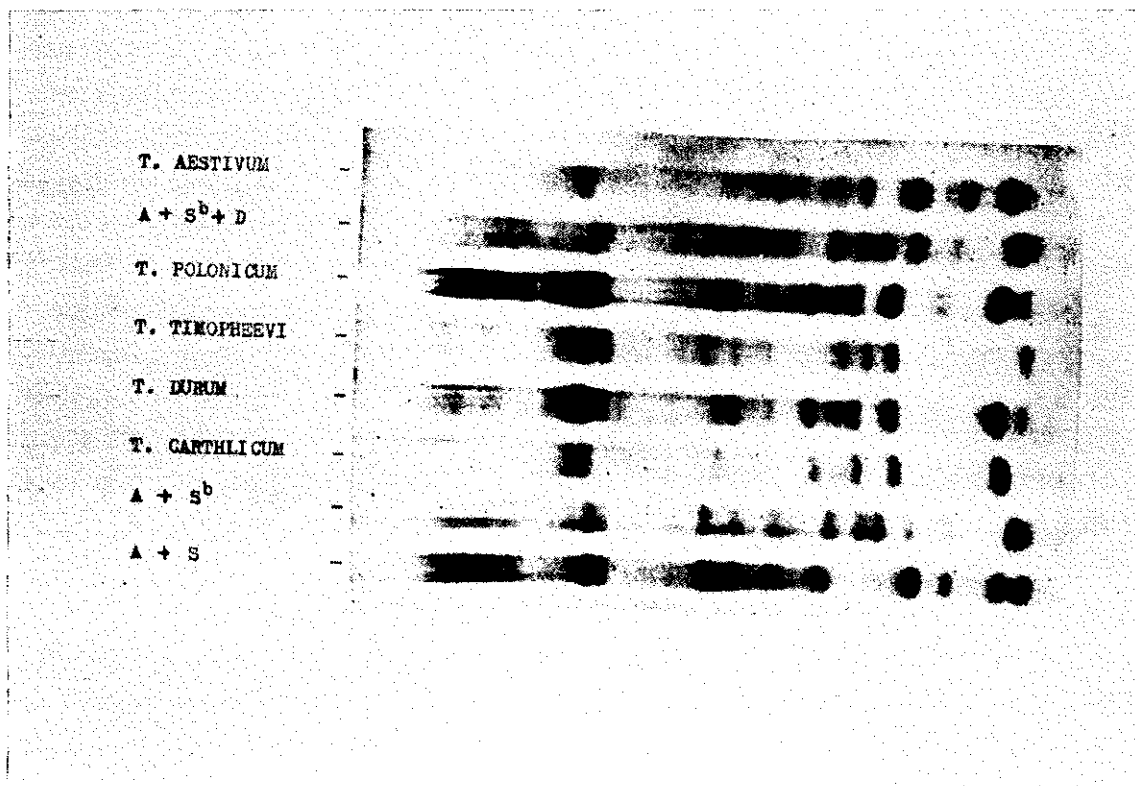


FIG. 8. Distribución de proteínas de trigos tetraploides y hexaploides.

R E S U M E N

Se propone un método simplificado para la extracción y fraccionamiento de las proteínas del grano de diversas especies. Se estudian por dicho método las especies diploides del grupo *Aegilops-Triticum* y se investiga el paralelismo entre síntesis de proteínas del grano y las relaciones citogenéticas entre las especies del grupo. Las distribuciones de proteína de los aloploides se reconstruyen por mezcla de las especies diploides parentales.

B I B L I O G R A F I A

- SENJANINOVA-KOROZAGNINA, M.
1932 *Bull. Appl. Bot. Gen. en Pl. Breed.*, ser. 2.
- CHENAVERAJAH, M. S.
1960 *Acta Horti Gotoburgensis*, 23: 85
- KIHARA, H.
1954 *Cytologia*, 19: 336.
- KIHARA, H.
1966 *Indian J. Genet.*, 26A, 14.