



"EL SABER DE MIS HIJOS  
HARA MI GRANDEZA"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos  
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Formación de Proteínas Poliméricas en Diferentes Fases  
del Desarrollo del Grano de Trigo

**TESIS**

que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

**Javier Delgado Rodríguez**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## CONTENIDO

	Página
CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
General.....	3
Específicos.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
Generalidades del Trigo.....	4
Origen del Trigo.....	4
Clasificación Biológica.....	4
Composición Química.....	5
Clasificación de las Proteínas del Trigo.....	5
Proteínas Monoméricas.....	7
Gliadinas.....	7
Albúminas y Globulinas Monoméricas.....	7
Proteínas Poliméricas.....	8
Gluteninas.....	8
Albúminas de Peso Molecular Alto.....	8
Triticinas.....	8
Composición Proteica y Propiedades Funcionales de la Harina de Trigo.....	9
Relación Genético-Funcional del Trigo y la Harina de Trigo.....	11
Composición de Aminoácidos y Secuencias N-Terminales de las Subunidades de Glutenina de Peso Molecular Alto.....	15
Relación entre Características Genéticas y Propiedades Funcionales de la Harina de Trigo.....	17

## CONTENIDO (Continuación)

	Página
Distribución de las Proteínas del Trigo en Base a su	
Peso Molecular.....	19
Métodos Utilizados para Determinar la Distribución de las	
Proteínas con Base en su Peso Molecular.....	21
Extracción o Solubilización de las Fracciones Proteicas.....	21
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	22
Cromatografía de Exclusión Molecular.....	22
Cromatografía de Fase Reversa.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Fuente de Materia Prima.....	25
Área Experimental.....	25
Labores de Cultivo.....	30
Preparación del Terreno.....	30
Fertilización.....	30
Siembra.....	30
Riegos.....	32
Recolección de Granos en Diferentes Estados de Desarrollo.....	32
Cosecha y Trilla.....	34
Selección de Variedades a Estudiar y Detección de Síntesis de	
Subunidades de Glutenina de Peso Molecular Alto.....	34
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	34
Electroforesis de Extractos de Proteína Total.....	35
Electroforesis de Extractos de Proteína Insoluble.....	36
Análisis de Proteína por Cromatografía de Exclusión Molecular.....	37
Extracción de Proteína Total.....	37
Extracción de Proteína Soluble en 0.5% SDS.....	38

## CONTENIDO (Continuación)

	Página
Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Exclusión Molecular.....	39
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
Rendimientos de Cosecha entre Variedades.....	41
Rendimientos de Cosecha por Variedad y Origen.....	41
Selección de Variedades a Estudiar.....	46
Análisis Electrofórico de las Variedades de Trigo Sembradas.....	46
Detección de Síntesis de Proteína por SDS-Electroforesis.....	53
Variedad Altar.....	53
Variedad Rayón.....	55
Detección de Síntesis de Proteína por Cromatografía de Exclusión Molecular.....	59
Detección de Síntesis de Proteína Polimérica Total en la Variedad Altar.....	61
Detección de Síntesis de Proteína Polimérica Total en la Variedad Rayón.....	61
Comparación entre Porcentaje de Proteína Polimérica Total e Insoluble en 0.5% SDS.....	65
Influencia de la Localidad de Cultivo en la Concentración de Proteína Polimérica.....	80
Variedad Altar.....	80
Variedad Rayón.....	84
CONCLUSIONES.....	87
RECOMENDACIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1 Distribución de las proteínas en el grano de trigo.....	6
2 Variedades de trigo sembradas en el Campo Experimental del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.....	26
3 Análisis de varianza de rendimiento de cosecha entre las variedades sembradas.....	42
4 Rendimientos de cosecha de las variedades sembradas.....	43
5 Análisis de varianza de rendimiento de cosecha por origen de muestras de trigo variedad Rayón.....	44
6 Rendimientos de cosecha de las diferentes muestras de la variedad Rayón.....	45
7 Variedades preseleccionadas, composición de subunidades de glutenina de peso molecular alto y su uso en la Industria.....	52
8 Análisis de varianza de la formación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis.....	63
9 Análisis de varianza de la formación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis.....	67
10 Análisis de varianza de porcentaje de proteína polimérica total entre las variedades de trigo Altar y Rayón.....	69
11 Análisis de varianza de porcentaje de proteína polimérica insoluble entre las variedades de trigo Altar y Rayón.....	71
12 Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica total en muestras de trigo variedad Altar provenientes de de diferentes localidades de cultivo.....	81

## ÍNDICE DE TABLAS (Continuación)

	Página
13 Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica insoluble en muestras de trigo variedad Altar provenientes de diferentes localidades de cultivo.....	82
14 Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica total en muestras de trigo variedad Rayón provenientes de diferentes localidades de cultivo.....	85
15 Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica insoluble en muestras de trigo variedad Rayón provenientes de diferentes localidades de cultivo.....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Localización cromosomal de los genes que codifican a las proteínas del gluten.....	12
2 Representación esquemática de las estructuras de las subunidades de glutenina tipo X e Y.....	16
3 Diagrama de localización de parcelas dentro del área del cultivo.....	29
4 Dimensiones individuales de una parcela de cultivo.....	31
5 Sistema de numeración de los puntos de muestreo en la parcela útil.....	33
6 SDS-Electroforesis de proteína total de diferentes muestras de trigo sembradas (1).....	47
7 SDS-Electroforesis de proteína total de diferentes muestras de trigo sembradas (2).....	48
8 Electroforesis de extractos proteicos de variedades de trigo conteniendo diferentes subunidades de glutenina de peso molecular alto (1).....	49
9 Electroforesis de extractos proteicos de variedades de trigo conteniendo diferentes subunidades de glutenina de peso molecular alto (2).....	50
10 Electroforesis de extractos proteicos de granos de trigo a diferentes días después de antesis de la variedad Altar.....	54
11 Electroforesis de extractos proteicos de granos de trigo a diferentes días después de antesis de la variedad Rayón.....	56



## ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

	Página
12 Contenido de humedad del grano de trigo de las variedades Altar y Rayón a diferentes días después de antesis.....	58
13 Perfil cromatográfico de exclusión molecular de extractos de proteína total de una línea isogénica conteniendo las subunidades (1, 20x+20y, 5+10) utilizando 0.5% SDS y sonicación.....	60
14 Perfiles cromatográficos de exclusión molecular de proteína total extraída de grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis.....	62
15 Perfil de acumulación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis.....	64
16 Perfiles cromatográficos de exclusión molecular de proteína total extraída de grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis.....	66
17 Perfil de acumulación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis.....	68
18 Perfiles cromatográficos de proteína total extraída en 0.5% SDS mas sonicación y de proteína soluble en 0.5% SDS correspondientes a la variedad Altar.....	72
19 Perfiles cromatográficos de proteína total extraída en 0.5% SDS mas sonicación y de proteína soluble en 0.5% SDS correspondientes a la variedad Rayón.....	73
20 Fracción de proteína polimérica insoluble en 0.5% SDS presente en grano de trigo de las variedades Altar y Rayón correspondientes a un grano maduro.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

	Página
21 Patrón de formación de proteína polimérica total e insoluble en 0.5% SDS en grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis.....	75
22 Patrón de formación de proteína polimérica total e insoluble en 0.5% SDS en grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis.....	76
23 Porcentajes de proteína polimérica total e insoluble en 0.5% SDS en granos de trigo maduros de las dos variedades analizadas provenientes de diferentes regiones agrícolas.....	83

## RESUMEN

La calidad del trigo se debe principalmente a las proteínas de almacenamiento del endospermo del grano, de las cuales, la fracción correspondiente a las proteínas poliméricas está relacionada con las propiedades tecnológicas del mismo. El objetivo de este trabajo fue monitorear la formación de proteínas poliméricas en el grano de trigo durante su desarrollo, ya que la presencia de las mismas está relacionada a las características de calidad implicadas en su uso industrial. Para ello se sembraron 13 variedades de trigo utilizando un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones. Para seleccionar las variedades a estudiar y detectar la presencia de estas proteínas se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, mientras que para la detección y cuantificación de proteína polimérica en el grano de trigo en diferentes fases de desarrollo, se empleó cromatografía de exclusión molecular. Se cuantificó la proteína polimérica total soluble extraído con 0.5% SDS aplicando ultrasonido. La fracción proteica soluble fue extraída con 0.5% SDS. La fracción insoluble fue deducida por su diferencia. Se seleccionaron dos variedades de trigo con base en su composición de subunidades de glutenina de peso molecular alto: una variedad Hexaploide (Rayón) con el par 5+10 y una variedad Tetraploide (Altar), la cual carece de dichas subunidades. Los rendimientos de cosecha de las diferentes variedades de trigo sembradas no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, los resultados de formación de subunidades de glutenina de peso molecular alto indicaron que su producción inicia desde etapas tempranas de desarrollo (15 días después de antesis) en la variedad de trigo hexaploide

(Rayón), mientras que un poco más tarde en la variedad de trigo tetraploide (Altar, 22 DDA). Así mismo, la formación de proteína polimérica inició en etapas más tempranas del desarrollo del grano de trigo en la variedad de trigo hexaploide. La proteína polimérica total fue igual en ambas variedades, pero la fracción de proteína polimérica insoluble fue mayor en la variedad hexaploide. Además, se detectaron diferencias en las concentraciones de proteína polimérica en diferentes muestras de granos de trigo ambas variedades, pero provenientes de diferentes localidades. Los perfiles de formación de proteína polimérica total e insoluble obtenidos en este trabajo de investigación, en conjunto con el conocimiento de las subunidades de glutenina presentes en el grano de trigo de las variedades analizadas, pueden ser utilizados como información importante durante el monitoreo del desarrollo del cultivo, así como también establecen un criterio de discriminación dentro de un programa de generación de nuevas variedades comerciales de trigo.



## INTRODUCCIÓN

El trigo pertenece a la familia de las gramíneas (*Gramineae*), siendo las variedades más cultivadas *Triticum aestivum*, *T. durum* y *T. compactum*. Por definición, al trigo se le tiene como una planta gramínea anual, de la familia del césped, con espigas de cuyos granos molidos se obtiene la harina. El trigo es un cereal muy versátil, puede desarrollarse en casi todos los terrenos y en cualquier clima templado, siendo por ello uno de los más cosechados. El trigo harinero hexaploide llamado *T. aestivum* es el cereal panificable más cultivado en el mundo (Atwell, 2001).

El trigo ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, siendo el cereal más cultivado del mundo. Ello es debido a que las propiedades funcionales que posee la masa de harina de trigo son únicas entre los cereales (Patacchini *et al.*, 2001). Estas propiedades funcionales están relacionadas con la constitución de sus proteínas y, aunque el contenido total de proteína es un factor importante en el uso final del trigo, la proporción de las fracciones de proteína que la conforman, es decir, la distribución de gliadinas y gluteninas (Patacchini *et al.*, 2001), y específicamente la distribución de subunidades de glutenina de peso molecular alto en el grano del trigo, es lo que determina su calidad (Wahlund *et al.*, 1996; Weegels *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 2001; Tronsmo *et al.*, 2002). Gracias al empleo de técnicas como la electroforesis en gel de poliacrilamida (MacRitchie y Lafiandra, 1997) se ha encontrado que ciertas subunidades de glutenina, como la 5+10, están asociadas a buenas características de calidad de

panificación (Patacchini *et al.*, 2001), como ha sido anteriormente reportado por Payne *et al.*, (1984), quienes encontraron que la variación alélica de las subunidades de glutenina de peso molecular alto podría estar relacionada con la fuerza de la masa. Sin embargo, la distribución de los pesos moleculares de las proteínas del trigo no es una propiedad constante, sino que cambia durante el desarrollo del grano (Kruger y Marchylo, 1990; Gupta *et al.*, 1996; Southan y MacRitchie, 1999). En estudios recientes se ha encontrado que ciertos tipos de proteínas poliméricas y su proporción en el grano determinan en gran medida el uso final del trigo en la industria. Por lo tanto es importante determinar su presencia, ya que pueden estar presentes en una variedad de trigo, y sin embargo, esta variedad puede ser erróneamente seleccionada si la proporción de las proteínas de interés es muy baja y, en consecuencia, no puede ser destinada al uso que se pensó originalmente. De ahí la importancia de seleccionar aquellas variedades de trigo donde la proteína que posean presente las características adecuadas para su uso. Esto es posible mediante el cultivo de diferentes variedades de trigo con diferentes calidades de panificación y la cuantificación de las diferentes fracciones proteicas a lo largo del desarrollo de las plantas. Con ello se podrían discriminar las variedades de trigo de acuerdo a su composición proteica y se determinaría en cual momento del desarrollo de la planta las proteínas poliméricas alcanzan su mayor concentración. La información que se obtenga servirá eventualmente como complemento en la selección de variedades de trigo de importancia económica.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Monitorear la formación de proteína polimérica en el grano de trigo durante su desarrollo.

### **Específicos**

1. Sembrar diferentes variedades de trigo para la obtención de muestras de granos en diferentes etapas de desarrollo.
2. Determinar el rendimiento de cosecha de las muestras de trigo sembradas.
3. Identificar y cuantificar las fracciones proteicas de peso molecular alto de dos variedades de trigo.
4. Determinar la producción de proteínas poliméricas de acuerdo al desarrollo y maduración del grano de trigo para ambas variedades.
5. Identificar las variedad(es) que sintetiza(n) la mayor calidad de proteínas poliméricas.
6. Determinar la influencia de la localidad de cultivo en la concentración de proteína polimérica.

# REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

## Generalidades del Trigo

### Origen del Trigo

El Trigo (*Triticum* spp.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes en el mundo (Hsam *et al.*, 2001). El primer tipo de trigo cultivado fue einkorn, una especie diploide (AA) conteniendo siete pares de cromosomas. Más tarde se empezó a cultivar el trigo tetraploide (AABB), conocido como emmer (Atwell, 2001). El centro de origen de los trigos diploides y tetraploides se ubica en el suroeste de Asia, en las regiones comprendidas entre la costa del Mediterráneo y las planicies del Río Eufrates. Otra especie de trigo asiática (*Aegilops tauchii* Coss.) también diploide (DD), localizada principalmente en Siria, Irán Irak, así como parte de China, es conocida por su importante contribución como donadora del genoma D en la formación del trigo hexaploide (AABBDD), la especie de trigo más común en nuestros días (*Triticum aestivum*, L.) (Hsam *et al.*, 2001).

### Clasificación Biológica

El trigo es una de las planta más ampliamente cultivadas del mundo. Es una planta gramínea anual, de la familia del césped, con espigas de cuyos granos molidos se obtiene la harina. Con respecto a la clasificación biológica, las tres principales especies que son más comúnmente cultivadas son *Triticum aestivum*



L., a la cual pertenecen la mayor parte de las variedades; *T. Compactum*, y *T. Durum*: a éste último pertenecen las clases de trigo duro.

## **Composición Química**

El grano maduro del trigo está formado por hidratos de carbono (fibra cruda y almidón, lípidos (palmítico, oleico), sustancias minerales (K, P) y agua, junto con pequeñas cantidades de vitaminas (inositol, complejo B), enzimas (amilasas, celulasas) y otras sustancias como pigmentos. Estos nutrientes se encuentran distribuidos en las diversas áreas del grano de trigo, y algunos se concentran en regiones determinadas. El almidón está presente únicamente en el endospermo, la fibra cruda está reducida casi exclusivamente al salvado y la proteína se encuentra por todo el grano. En la Tabla 1 se muestra la distribución de la proteína en el grano de trigo. Las propiedades únicas de la harina de trigo para formar una masa con propiedades viscoelásticas que son esenciales en la elaboración de pan y muchos otros productos, se deben principalmente a las proteínas. Por esta razón, tanto el contenido de proteína como su calidad son los atributos más importante de la composición del trigo, determinando su valor en el mercado y el procesamiento (Singh, 2001a; Corella, 2002).

## **Clasificación de las Proteínas del Trigo**

Existen diferentes criterios que han sido utilizados para clasificar las proteínas del trigo. Por ejemplo, basados en su solubilidad, similitud química o similitud genética. Desde el punto de vista funcional, las proteínas del trigo son

Tabla 1. Distribución de las proteínas en el grano de trigo.

Parte del grano	Porcentaje del peso del grano	Contenido proteico ( NX6.25 ) (%)	Proporción de proteína en el grano (%)
Pericarpio	8.0	5.1	4.0
Aleurona	7.0	22.9	15.5
Endospermo	82.5	28.7	72.5
Externo	12.5	15.9	19.4
Medio	12.5	10.2	12.4
Interno	57.5	7.2	40.7
Embrión	1.0	38.7	3.5
Escutelo	1.5	31.0	4.5

Fuente: Pomeranz, 1988.

divididas en dos clases principales: proteínas monoméricas y proteínas poliméricas, donde las últimas consisten de polipéptidos individuales unidos por enlaces disulfuro (MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001; Rhazi *et al.*, 2003).

## **Proteínas Monoméricas**

Este tipo de proteínas comprende dos principales grupos: las gliadinas y las albúminas y globulinas. Las gliadinas son proteínas de almacenamiento, mientras que las albúminas y globulinas incluyen varias enzimas (MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001).

**Gliadinas.** Las gliadinas están usualmente divididas en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\omega$ -gliadinas, basadas en su movilidad en electroforesis ácida en gel de poliacrilamida (A-PAGE). Sus pesos moleculares se encuentran desde 30,000 hasta 80,000 Daltons (Da). Las  $\omega$ -gliadinas están claramente separadas de otros polipéptidos en electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) debido a que sus pesos moleculares (70,000-80,000 Da) no se confunden con otros. Son deficientes en azufre, pero las otras gliadinas normalmente tienen un número par de residuos de cisteína, que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares (MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001).

**Albúminas y Globulinas Monoméricas.** Las albúminas (solubles en agua) y las globulinas (solubles en soluciones salinas) son una mezcla de compuestos de

bajo peso molecular, muchos de los cuales son enzimas. Generalmente son mas pequeñas que las gliadinas (20,000-30,000 Da) (MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001).

## **Proteínas Poliméricas**

**Gluteninas.** Las gluteninas forman la mayor parte (aproximadamente el 85%) de las proteínas poliméricas. Son similares a las gliadinas en composición química. Están constituidas de dos grupos principales de cadenas polipeptídicas, a las cuales se les denomina subunidades de peso molecular alto (SAPM) y subunidades de peso molecular bajo (SBPM). Algunos estudios han mostrado que los polímeros de glutenina pueden incorporar componentes de gliadina que posean residuos de cisteína. Las SBPM comprenden dos grupos principales: las subunidades B (40,000-55,000 Da) y C (30,000-40,000 Da). Esos rangos han sido deducidos por SDS-PAGE y calibrados con los obtenidos de estándares conocidos (MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001).

**Albúminas de Peso Molecular Alto.** Las albúminas de peso molecular alto son principalmente  $\alpha$ -amilasas y no se encuentran presentes en los cuerpos proteicos. Probablemente sus subunidades forman polímeros con ellas mismas y no con las gluteninas (MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001).

**Triticinas.** El otro grupo de proteínas poliméricas son las triticinas, las cuales son proteínas tipo globulina. Parece ser que consisten de polímeros entre sus

propias subunidades. Sin embargo, no se les ha atribuido alguna relación con las subunidades de glutenina (MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001).

### **Composición Proteica y Propiedades Funcionales de la Harina de Trigo**

Las gluteninas, albúminas de peso molecular alto y tritricinas constituyen la mayor parte de las proteínas poliméricas, mientras que las gliadinas y albúminas y globulinas constituyen las proteínas monoméricas (Dell'Aquila *et al.*, 1983; Huebner *et al.*, 1990; Rubin *et al.*, 1992). Mientras que las gliadinas son cadenas simples de polipéptidos, las gluteninas son estructuras conformadas por varias de ellas donde los polipéptidos se encuentran unidos por puentes disulfuro (Gianibelli *et al.*, 2001). El peso molecular alto de las gluteninas es el responsable por su insolubilidad parcial y su contribución de manera distinta a las gliadinas en la funcionalidad del gluten (Payne y Lawrance, 1983).

Las propiedades funcionales únicas que posee la masa de harina de trigo son debidas a las proteínas de almacenamiento del endospermo (Patacchini *et al.*, 2001). Como se ha mencionado anteriormente, las propiedades tecnológicas del trigo están correlacionadas con los polímeros de glutenina consistentes principalmente de subunidades de peso molecular alto y de peso molecular bajo, las cuales están unidas por enlaces disulfuro (Patacchini *et al.*, 2001). Estas fracciones se encuentran en la harina en proporciones aproximadamente iguales de 1:2 a 1:3 en base a peso, dependiendo del cultivar (Anderson y Green, 1989; Wieser *et al.*, 1994; Antes y Biesser, 2001).

Aunque el contenido total de proteína es un factor importante que determina el uso final del trigo, esa misma proporción de las proteínas que forman el gluten determina su calidad (Wahlund *et al.*, 1996; Weegels *et al.*, 1996; Færgestad *et al.*, 2000; Verbruggen *et al.*, 2001; Wesley *et al.*, 2001; Patachini *et al.*, 2001; Tronsmo *et al.*, 2002). Así pues, las gliadinas determinan la viscosidad del gluten, mientras que las gluteninas regulan la fuerza y elasticidad. Se ha encontrado que a medida que aumenta la proporción de gliadinas en la harina de trigo, disminuye la fuerza de la masa, lo que afecta al tiempo de mezclado (Khatkar *et al.*, 2002a). Los efectos encontrados por la adición de los diversos subgrupos de gliadinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas) es distinto: la resistencia del gluten disminuyó con la adición de  $\omega$ -gliadinas, esto es, el gluten se volvió mas blando (Khatkar *et al.*, 2002b). Se tiene entonces que además de la cantidad de proteína en la harina, probablemente la mas importante característica del gluten que determina el tiempo de mezclado de la masa, es la distribución de tamaños de las proteínas del gluten y especialmente la distribución de las proteínas poliméricas (Bekés y Gras, 1999; Færgestad *et al.*, 2000; Wieser y Kieffer, 2001; Nakamura y Fujimaki, 2002; Tronsmo *et al.*, 2002).

Debido a que el peso molecular de los polímeros de glutenina sobrepasa los 20,000 Kilodaltons (Kda) basados en cromatografía de filtración en gel (Bietz y Simpson, 1992) así como estudios de fraccionamientos en flujo de campo (Stevenson y Preston, 1996), los polímeros de glutenina se encuentran entre las moléculas proteicas más grandes de la naturaleza (Gianibelli *et al.*, 2001). Wahlund *et al.*, (1996) encontraron que extractos proteicos de los cultivares de trigo Monopol y México 8156 presentaron mejor desarrollo de masa de acuerdo a

un aumento en la proporción de glutenina en la harina. Wieser y Kiefer (2001) analizaron 14 cultivares de trigo a los cuales previamente se les habían estudiado sus propiedades reológicas y realizado pruebas de panificación, para determinar las cantidades relativas de los tipos de proteínas de gluten utilizando un procedimiento de extracción por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados que encontraron indicaron que la resistencia máxima de la masa y gluten fueron fuertemente dependientes de la cantidad de subunidades de glutenina en la harina y además, fueron influenciadas por la relación de subunidades de gliadina/glutenina. Resultados similares fueron reportados por Verbruggen *et al.*, (2001), quienes añadieron subunidades de glutenina de peso molecular alto y bajo a una harina base. Sus resultados mostraron que la adición de subunidades de glutenina de peso molecular bajo disminuyó la resistencia máxima de la masa, mientras que la adición de subunidades de glutenina de peso molecular alto aumentó este parámetro.

### **Relación Genético-Funcional del Trigo y de la Harina de Trigo**

Los cromosomas son cuerpos alargados o acortados. Tienen una construcción primaria coloreable y distinguible en el microscopio que se conoce como centrómero (Fig. 1), siendo su función principal servir como lugar de unión con las fibras del uso acromático en las divisiones celulares. La posición del centrómero sirve para clasificar las diversas especies. Por ejemplo, existen diversas posiciones que puede adoptar el centrómero en el cromosoma: se le

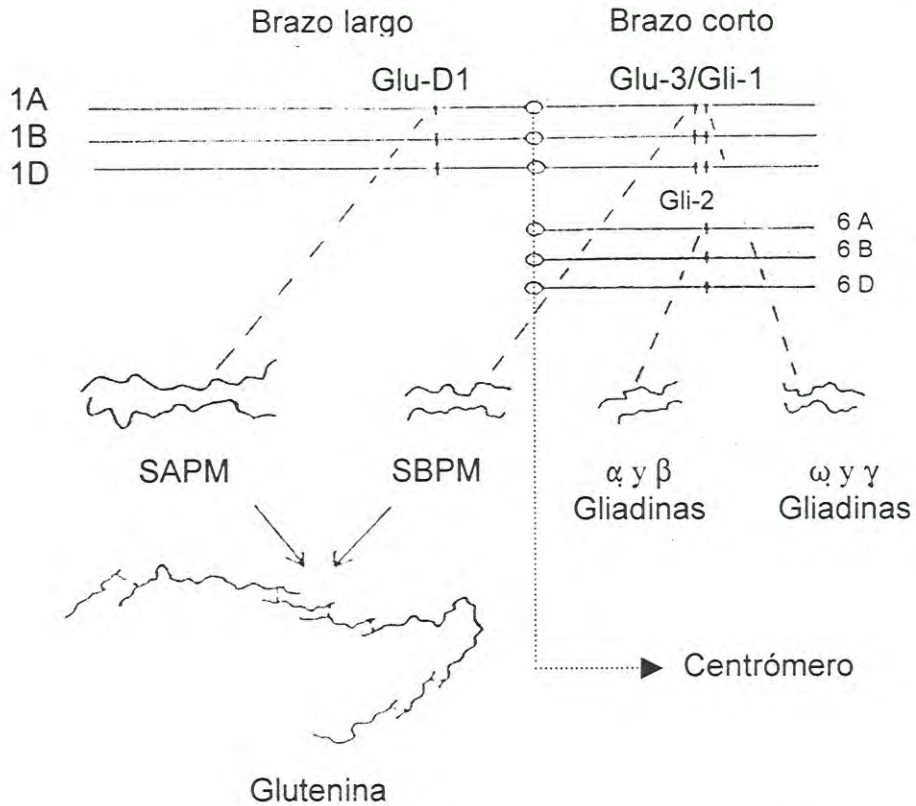


Figura 1. Localización cromosomal de los genes que codifican a las proteínas del gluten (MacRitchie, 1999).



llama metacéntrico cuando se encuentra casi en la parte media del cromosoma. El cromosoma submetacéntrico tiene el centrómero hacia uno de los extremos formando así un brazo corto y uno largo. El cromosoma telocéntrico tiene el centrómero completamente al extremo, por lo que no se forman propiamente dos brazos (Sánchez, 1986).

Los nueve loci (posiciones que ocupan los genes en el genoma) que codifican las proteínas del gluten son los tres loci Glu-1 (Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1) en los brazos largos de los cromosomas 1A, 1B, y 1C, respectivamente, los cuales codifican a las subunidades de glutenina de peso molecular alto (SU-APM); los 3 loci Gli-1/Glu-3 (Gli-A1/Glu-A3, Gli-B1/Glu-B3, Gli-D1/Glu-D3) en el brazo corto de los cromosomas 1A, 1B y 1D con genes fuertemente unidos codificando las  $\omega$ - y  $\lambda$ - gliadinas y las subunidades de glutenina de peso molecular bajo (SU-BPM); y los tres loci Gli-2 (Gli-A2, Gli-B2, Gli-D2) codificando las  $\alpha$ - y  $\beta$ - gliadinas. Todos los loci exhiben variación alélica (Fig. 1).

Un juego completo de cromosomas característico de una especie integra un genomio. De esta manera, para el trigo (*Triticum aestivum* L.) el número básico es  $X=7$  y el gamético o haploide es  $n=21$ . La razón de esto es que el trigo proviene de un genomio de *Triticum monococcum* (genomio  $A=X=7$ ), otro genomio de *Aegilops speltoides* ( $B=X=7$ ) y de otro proveniente de *Aegilops squarrosa* ( $D=X=7$ ). Cada especie contribuye con un genomio, lo que da  $n=ABD=21$  cromosomas del trigo harinero para panificación (*Triticum aestivum* L.). Por duplicación cromosómica aplicando colchicina, se obtiene  $2n=42=6X$ , o sea que citogenéticamente, el

grano de trigo panadero es un hexaploide (Sánchez, 1986; Hsam *et al.*, 2001, Rhazi *et al.*, 2003).

Existen muchas proteínas cuyas estructuras están determinadas por los genes codificados en el ADN del trigo. Se ha demostrado que las propiedades de estos agregados poliméricos son los que determinan las propiedades viscoelásticas de las masas de harina de trigo. Incluso ya se ha establecido estadísticamente que los diferentes grupos alelos de las subunidades de glutenina de peso molecular alto son las que aportan la mayor contribución a estas propiedades (Bekés y Gras, 1999; MacRitchie y Lafiandra, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001). El sistema de numeración o nomenclatura desarrollado por Payne y Lawrance (1983) para identificar subunidades de glutenina de peso molecular alto (SAPM) también proporciona una localización cromosomal de los genes y es el sistema que se utiliza en la actualidad. Originalmente, la asignación de números ascendientes estaba relacionada con la movilidad en electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE): menores números para las menores movilidades. Conforme nuevas subunidades han sido identificadas, ha sido más difícil seguir este orden lógico. Así, hay algunas subunidades como la 21, con menor movilidad y un número más grande que las subunidades originales. Cuando se identifica a las subunidades numéricamente, se acostumbra incluir tanto el genoma del cual se deriva la subunidad como la indicación de si se trata de una subunidad tipo X o Y. Las subunidades tipo X son de tamaño molecular y su región repetitiva es ligeramente más grande y presentan menor movilidad relativa en electroforesis de gel de poliacrilamida, mientras que las subunidades tipo Y son de tamaño molecular más pequeño y su movilidad es ligeramente

mayor (Fig. 2). De esta forma, todos los trigos hexaploides contienen cuando menos las subunidades 1Bx, 1Dx, 1Dy, mientras que algunos cultivares también contienen las subunidades 1By y 1Ax (Gianibelli *et al.*, 2001).

### **Composición de Aminoácidos y Secuencias N-Terminales de las Subunidades de Glutenina de Peso Molecular Alto**

Las subunidades de glutenina de peso molecular alto tienen un contenido de ácido glutámico alto que se encuentra en forma de glutamina (Payne y Lawrance, 1983; Gianibelli *et al.*, 2001). También contienen prolina, glicina y bajos contenidos de lisina. Las características estructurales incluyen un dominio central repetitivo (compuesto por regiones cortas de aminoácidos que aporta alrededor del 85% de la secuencia de la proteína) y dos regiones terminales no repetitivas que contienen la mayoría de los residuos de cisteína presentes (Payne *et al.*, 1987; Gianibelli *et al.*, 2001). A esas regiones se atribuyen las propiedades funcionales del gluten (Hsam, 2001; Gianibelli *et al.*, 2001). La composición de aminoácidos de las subunidades de glutenina de peso molecular alto indica la naturaleza hidrofílica de su región central repetitiva y las características hidrofóbicas de sus regiones terminales de cisteína. La proporción de los diferentes aminoácidos está principalmente definida por secuencias repetidas de polipéptidos. Las secuencias PGQGQQ y GYYPTSPQQ forman el 90% del dominio repetitivo. El dominio central del tipo "Y" a menudo tiene la segunda prolina reemplazada por una leucina en la cadena GYYPTSPQQ. Tanto como el tipo "X" y el tipo "Y" parecen

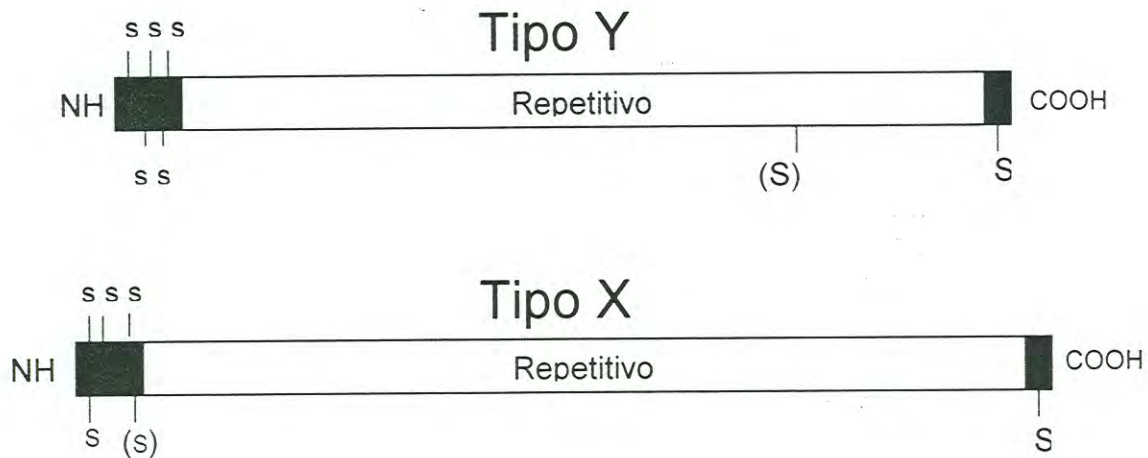


Figura 2. Representación esquemática de las estructuras de las subunidades de glutenina tipo X e Y (Shewry *et al.*, 1992).

tener una estructura de conformación en giro  $\beta$  (Tatham *et al.*, 1990). Esta región mantiene secuencias repetidas de aminoácidos en número de 490 hasta 700 de ellos. Esas regiones son ricas en glutamina, prolina, glicina, y pobres en cisteína (Gianibelli *et al.*, 2001).

Las N- terminaciones tienen una secuencia no repetitiva conformada desde 81 hasta 140 residuos con tres a cinco residuos de cisteína. Los residuos de cisteína pueden formar uniones disulfuro entre las subunidades de peso molecular alto y las subunidades de peso molecular bajo formando de esta manera polímeros con un rango de diferentes tamaños que pueden alcanzar hasta decenas de millones de daltons (Gianibelli *et al.*, 2001).

### **Relación entre Características Genéticas y Propiedades Funcionales de la Harina de Trigo**

Se han realizado muchos estudios donde las propiedades funcionales de varios genotipos de trigo se han estudiado (MachRitchie y Lafiandra, 1997). La presencia de ciertas combinaciones de bandas electroforéticas ha sido utilizada como una medida de la composición de las proteínas (MachRitchie y Lafiandra, 1997). Payne *et al.*, (1984) han encontrado que la variación alélica en las subunidades de glutenina de peso molecular alto podría estar relacionada con la fuerza de la masa basado esto en comparaciones entre la composición de las subunidades de diferentes variedades y su calidad medida por pruebas de sedimentación con dodecil sulfato de sodio (SDS), asignando diferentes marcadores a las subunidades de peso molecular alto.

Un locus (plural = loci) es la posición que ocupa un gen en el genoma. Algunos loci controlan la síntesis de proteínas de gluten que son responsables por muchas de las características físicas y tecnológicas de los trigos tetraploides y hexaploides: nueve loci para los hexaploides y seis loci para los tetraploides (MacRitchie y Lafiandra, 2001). Las subunidades de glutenina de peso molecular alto se codifican en el locus Glu-1 de los brazos largos del grupo 1 de cromosomas (1A, 1B y 1D). Esos loci son Glu-A1, Glu-B1 y Glu-D1, respectivamente. Cada locus incluye dos genes unidos codificando dos diferentes tipos de subunidades de glutenina de peso molecular alto: las subunidades tipo "X" y tipo "Y". El tipo "X" generalmente tiene menor movilidad electroforética en SDS-PAGE y peso molecular mayor que el tipo "Y" (Gianibelli *et al.*, 2001). Un alelo representa una forma en que puede presentarse un gen en determinado locus. Ciertas subunidades alélicas imparten diferentes efectos en la calidad del gluten. Un ejemplo de ello es la variación alélica en el locus Glu-D1 de los trigos panaderos con pares alternantes de subunidades 5+10 (las cuales están asociadas a buena calidad panadera) y subunidades 2+12 (de menor calidad panadera) que se han identificado (Nagamine *et al.*, 2000; Tronsmo *et al.*, 2002). Branlard y Dardevet (1985) reportaron que los parámetros alveográficos de fuerza de gluten (W) y tenacidad (P) así como el índice de sedimentación de Zeleny fueron correlacionados positivamente con las subunidades 7+9 y 5+10, mientras que lo fueron negativamente con las bandas 2+12. Patacchini *et al.*, (2001), señalaron que las buenas características de calidad de harinas de trigo son atribuidas a cultivares que muestran los pares alélicos 5+10 y tratan de compararlo con aquellas que muestran el par 2+12 haciendo referencia a que

existe una organización mas regular de espirales beta en la subunidad 10, lo que puede determinar la elasticidad intrínseca del gluten. Otra variante alélica ha mostrado resultados similares: las subunidades de Glu-B1 17+18 (fuerte) contra las subunidades 20X+20Y (débiles). Esas diferencias en la fuerza de la masa fueron debido al tamaño molecular de los polímeros de glutenina deducidos a partir de medidas de solubilidad (Gupta y MacRichtie, 1994).

Tronsmo *et al.*, (2002) señalaron que los cambios en las proporciones de proteínas monoméricas y poliméricas afectan la calidad de la miga de pan. También puede atribuirse cierto efecto sobre la elasticidad del gluten a los enlaces hidrógeno intercatenarios (Patacchini *et al.*, 2001). Nagamine *et al.*, (2000), estudiaron la variación alélica en los loci Glu-1 y Glu-3 y sus efectos en las propiedades viscoelásticas en 85 cultivares de trigo Japoneses, encontrando que las líneas de cultivo Glu-A1 y Glu-B1 mostraron diferencias significativas en medidas farinográficas de las propiedades de la masa y del gluten con respecto a los loci Glu-A1 y Glu-A3.

### **Distribución de las Proteínas del Trigo en Base a su Peso Molecular**

Desde que la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución se ha adaptado al estudio de las proteínas de los cereales, esta técnica ha sido utilizada como una herramienta muy útil para la caracterización de las proteínas del trigo (MacRitchie y Lafiandra, 1997). La distribución de pesos moleculares (MWD) ha sido reconocida como la principal determinante de las propiedades físicas de la masa de la harina de trigo (Southan y MacRitchie, 1999), y está

determinada por las proporciones relativas de proteínas monoméricas y poliméricas. Esto es, depende de la proporción de las subunidades de glutenina de peso molecular alto y bajo, las cuales resultan de la variación alélica y de la presencia de gliadinas modificadas que actúan como terminadores de cadena (Southan y MacRitchie, 1999). La distribución de pesos moleculares de las proteínas del trigo puede variar en dos principales formas: la cantidad relativa de proteínas monoméricas y poliméricas puede cambiar o la distribución de pesos moleculares puede variar de una muestra de trigo o un cultivar a otro.

La distribución de pesos moleculares de las proteínas del trigo no es una propiedad estática, sino que cambia durante el desarrollo del grano. Kruger y Marchylo (1990) estudiaron la ruptura de gluteninas de peso molecular alto en trigo Neepawa por un período de cinco días después de la germinación utilizando cromatografía de fase reversa y electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de concentración. Sus resultados indicaron que la composición relativa de subunidades de glutenina de peso molecular alto cambia desde la germinación. Por su parte Gupta *et al.*, (1996) encontraron que la formación de polímeros mayores empieza solamente durante las últimas etapas del desarrollo del grano.

Sin embargo, la manera en la cual ésta cambia después de la cosecha se determina por su distribución inicial en la harina del grano maduro, así como también se controla por factores genéticos y ambientales. De esta forma, si se logra determinar la distribución óptima de pesos moleculares (MWD) de las subunidades de glutenina para el uso final que se requiera, se podría utilizar este conocimiento para tratar de ajustarla en el proceso directamente o bien, desde el cultivo mismo (Southan y MacRichtie, 1999).



## Métodos Utilizados para Determinar la Distribución de las Proteínas con Base en su Peso Molecular

### Extracción o Solubilización de las Fracciones Proteicas

Uno de los procedimientos recientemente utilizados en el análisis de las fracciones de glutenina es el empleo de ultrasonido para solubilizarlas y facilitar su caracterización (Singh *et al.*, 1990a). La depolimerización controlada que se logra con este método también tiene el potencial de proporcionar información acerca de la estructura de las gluteninas (Singh *et al.*, 1990b). El efecto del ultrasonido puede ser controlado eficientemente variando el tiempo e intensidad aplicados. A través del monitoreo de la degradación de los productos también se puede obtener una primera visión del mecanismo molecular de la ruptura de las gluteninas. Esto puede servir para deducir cuales uniones se rompen más fácilmente y como diferentes subunidades se encuentran unidas en polímeros de glutenina (Singh *et al.*, 1990a). La extracción inicial con dodecil sulfato de sodio (SDS) seguida por una extracción con el mismo solvente utilizando sonicación, remueve cerca del 98% de las proteínas (Singh y MacRichtie, 2001; Singh *et al.*, 1990b). La primera extracción remueve casi todas las proteínas monoméricas (principalmente gliadinas, albúminas y globulinas) y algunas de las más pequeñas gluteninas poliméricas. La segunda extracción (sonicada) remueve la mayoría de las gluteninas poliméricas mas grandes (Ueno *et al.*, 2002).

## **Electroforesis en Gel de Poliacrilamida**

En 1978, Axford *et al.*, introdujeron el análisis electroforético con dodecil sulfato de sodio como un método para estimar la calidad de panificación de cultivares de trigo. Moonen *et al.*, (1982) demostraron que la determinación de la composición de subunidades de proteína de trigo podía realizarse como un método relativamente simple para medir la calidad panadera de los trigos. Recientemente esta técnica ha sido utilizada para estudiar la variación intercultivar de las proporciones de fracciones de proteína (Vereijken *et al.*, 2000), detectar polimorfismo de subunidades de glutenina de peso molecular bajo y caracterizar bioquímicamente a las proteínas poliméricas (Gianibelli *et al.*, 2001), la variación alélica de las subunidades de glutenina (Nagamine *et al.*, 2000), polimerización in vitro de subunidades de glutenina (Veraverbeke *et al.*, 2000), y otras aplicaciones como la determinación de acumulación de subunidades de proteína y sus polímeros en granos de trigos hexaploides en desarrollo (Gupta *et al.*, 1996).

## **Cromatografía de Exclusión Molecular**

La cromatografía de exclusión molecular consiste en la permeación selectiva de una mezcla de polímeros eluidos por una fase móvil a través de una fase estacionaria porosa. El tiempo de elución del polímero está directamente relacionado con su tamaño molecular, de manera que las moléculas se separan en diferentes tamaños. Con la aplicación de la cromatografía de exclusión molecular iniciada por Bietz (1984) y desarrollada por otros investigadores (por ejemplo Dachkevitch y Autran, 1989), se ha hecho posible medir las cantidades relativas de proteínas monoméricas y poliméricas en el grano de trigo. Los

cambios en la distribución de tamaños moleculares pueden seguirse utilizando la cromatografía líquida de exclusión molecular de alta resolución (SE-HPLC) y la composición de las subunidades de glutenina puede medirse por SDS-PAGE (Singh y MacRitchie, 2001). El Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) es el detergente más ampliamente utilizado para la extracción de proteínas poliméricas (Dachkevitz y Autram, 1989; Singh *et al.*, 1990a, Gupta *et al.*, 1993).

Muchos investigadores han utilizado la cromatografía de exclusión molecular para determinar la distribución de proteínas monoméricas y poliméricas y de que manera esto se puede relacionar a las propiedades de panificación de las harinas de trigo (Singh *et al.*, 1990a; Veraverbeke *et al.*, 2000; Bean y Lookhart, 2001; Singh and MacRitchie, 2001; Gianibelli *et al.*, 2002; Tronsmo *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 2002). Este procedimiento también fue utilizado por Gupta *et al.*, (1996) para medir diferentes clases de proteínas (poliméricas, gliadinas, albúminas y globulinas) y monitorear la distribución de tamaños moleculares de proteínas poliméricas en granos en desarrollo de trigos hexaploides, encontrando que la cantidad de albúminas y globulinas aumentaron sólo ligeramente hasta 19 días después de la antesis (etapa del desarrollo del grano de trigo cuando se produce la floración de la espiga) y luego se mantuvieron constantes. Por otro lado, la cantidad de gliadinas y proteínas poliméricas aumentaron de acuerdo al desarrollo del grano desde el día 31 hasta el día 40 posterior a la antesis.

### **Cromatografía de Fase Reversa**

La cromatografía de fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. La fase estacionaria es apolar y las moléculas se retienen en la

columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la fase estacionaria. Es una herramienta útil en la determinación de proteína polimérica (Weegels *et al.*, 1996; Burnouf y Bietz, 1998). Wiesser y Kieffer (2001) realizaron la cuantificación de gliadinas totales y subunidades de glutenina aplicando la cromatografía de fase reversa utilizando sílica gel. Kruger y Marchylo (1990) utilizaron la cromatografía de fase reversa para monitorear el rompimiento de subunidades de glutenina de peso molecular alto en trigo Neepawa en un experimento de monitoreo del desarrollo del trigo después de un período de cinco días posterior a la germinación. De manera similar, Gupta *et al.*, (1996) utilizaron la cromatografía de fase reversa para analizar extractos de proteínas poliméricas. Sus resultados indicaron un aumento general de las cantidades de subunidades de glutenina de peso molecular bajo (tipos B y C) así como de las subunidades de glutenina de peso molecular alto de acuerdo al desarrollo del grano: la acumulación fue mayor para las subunidades de peso molecular alto que para las de peso molecular bajo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Fuente de Materia Prima**

Muestras de diferentes variedades de trigo fueron proporcionadas por el proyecto "Estudio Integral de la Calidad de Los Trigos Mexicanos y su Uso Potencial" (CONACYT, Clave: G35201-B). Dichas muestras fueron colectadas en diferentes regiones agrícolas del noroeste del país. La siembra se realizó el día 17 de diciembre del 2002 en seco. En total se sembraron 40 muestras de trigo, de donde 13 variedades estaban incluidas (Tabla 2, Fig. 3). El objetivo de sembrar diferentes variedades fue para realizar comparaciones poscosecha de rendimientos agronómicos para contar con un parámetro de comparación y consideración para su estudio. Además, para la identificación de las subunidades de glutenina de peso molecular alto presentes en las muestras sembradas, así como en las muestras de grano de trigo durante su desarrollo, se utilizaron muestras de líneas de trigo isogénicas de composición de subunidades de glutenina de peso molecular alto conocida, provenientes de la Universidad Estatal de Kansas, EU.

### **Área Experimental**

El cultivo tuvo lugar en los campos agrícolas del departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, situado en el Km 20 de la carretera Hermosillo–Bahía de Kino. Las dimensiones de cada bloque fueron de 70 m de

Tabla 2. Variedades de trigo sembradas en el Campo Experimental del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

Muestra	Variedad	Localidad de Procedencia	Estado	*Grupo
1	Rayón	Valle del Yaqui	Sonora	I
2	Rayón	Valle del Yaqui	Sonora	I
3	Rayón	Valle del Yaqui	Sonora	I
4	Rayón	Valle del Yaqui	Sonora	I
5	Rayón	Valle del Yaqui	Sonora	I
6	Altar	Valle del Yaqui	Sonora	V
7	Altar	Valle del Yaqui	Sonora	V
8	Altar	Valle del Yaqui	Sonora	V
9	Altar	Valle del Yaqui	Sonora	V
10	Rafi	Valle del Yaqui	Sonora	V
11	Rafi	Valle del Yaqui	Sonora	V
12	Rafi	Valle del Yaqui	Sonora	V
13	Altar	Valle del Yaqui	Sonora	V
14	Nácori	Valle del Yaqui	Sonora	V
15	Nácori	Valle del Yaqui	Sonora	V
16	Aconchi	Navojoa	Sonora	V

\* Clasificación (SAGARPA, Delegación Estatal en Sinaloa, 2002.)

I = Gluten Fuerte.

V = Gluten Tenaz.

Tabla 2 (Cont). Variedades de trigo sembradas en Campo Experimental del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

Muestra	Variedad	Localidad de Procedencia	Estado	*Grupo
17	Altar	Navojoa	Sonora	V
18	Nácori	Navojoa	Sonora	V
19	Rafi	Navojoa	Sonora	V
20	Rayón	Los Mochis	Sinaloa	I
20	Rayón	Los Mochis	Sinaloa	I
21	Ocoroni	Los Mochis	Sinaloa	I
22	Batequis	Los Mochis	Sinaloa	I
23	Maviri	Los Mochis	Sinaloa	I
24	Oasis F-86	Guamúchil	Sinaloa	I
25	Rayón F-89	Guamúchil-Angostura	Sinaloa	I
26	Rayón F-89	Guamúchil	Sinaloa	I
27	Rayón F-89	Guamúchil	Sinaloa	I
28	Rafi C-97	Guamúchil	Sinaloa	V
29	Ocoroni	Guasave	Sinaloa	I
30	Rayón F-89	Guasave	Sinaloa	I
31	Rayón F-89	Guasave	Sinaloa	I
32	Rayón F-89	Guasave	Sinaloa	I

\* Clasificación (SAGARPA, Delegación Estatal en Sinaloa, 2002.)

I = Gluten Fuerte.

V = Gluten Tenaz.

Tabla 2 (Cont). Variedades de trigo sembradas en el Campo Experimental del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

Muestra	Variedad	Localidad de Procedencia	Estado	*Grupo
33	Rayón F-89	Guamúchil-Angostura	Sinaloa	I
34	Oasis F-86	Guamúchil	Sinaloa	I
35	Rayón	Guasave	Sinaloa	I
36	Oasis	Guasave	Sinaloa	I
37	Ocoroni F-87	La Cruz	Sinaloa	I
38	Rayón F-89	El Espinal	Sinaloa	I
39	Rayón F-89	El Espinal	Sinaloa	I
40	Rayón F-89	La Cruz	Sinaloa	I

\* Clasificación (SAGARPA, Delegación Estatal en Sinaloa, 2002.)

I = Gluten Fuerte.

V = Gluten Tenaz.





largo por 20 m de ancho y con 4 parcelas de cuatro surcos, cada una con 5 m de largo (Fig 4). El área experimental fue de 720 m<sup>2</sup> y el área total de 2800 m<sup>2</sup>. La evaluación de los parámetros agronómicos fue determinada en base a la parcela útil con un área de 4.5 m<sup>2</sup> (Fig. 4). La franja comprendida entre los 0.5 m de cada cabecera fue eliminada para evitar los denominados efectos de orilla.

## **Labores de Cultivo**

### **Preparación del Terreno**

Se realizó un barbecho a una profundidad de 30 cm y dos rastreos en forma cruzada. Después de la preparación del terreno se trazaron los surcos donde se depositaría la semilla, con longitud de 4 m y una separación de 80 cm entre cada uno de ellos. Los bordos de contención se trazaron a una distancia de dos metros.

### **Fertilización**

La dosis de fertilizante fue de 155 Kg de N<sub>2</sub>/ha y se aplicó manualmente en forma fraccionada dos tercios en presembrado (28.94 Kg) y un tercio en siembra (14.46 Kg).

### **Siembra**

La siembra se realizó manualmente y se llevó a cabo en seco el 17 de diciembre del 2002 colocándose alrededor de 500 g de semilla total en los bloques (125 g por parcela) a una profundidad de 3-5 cm.

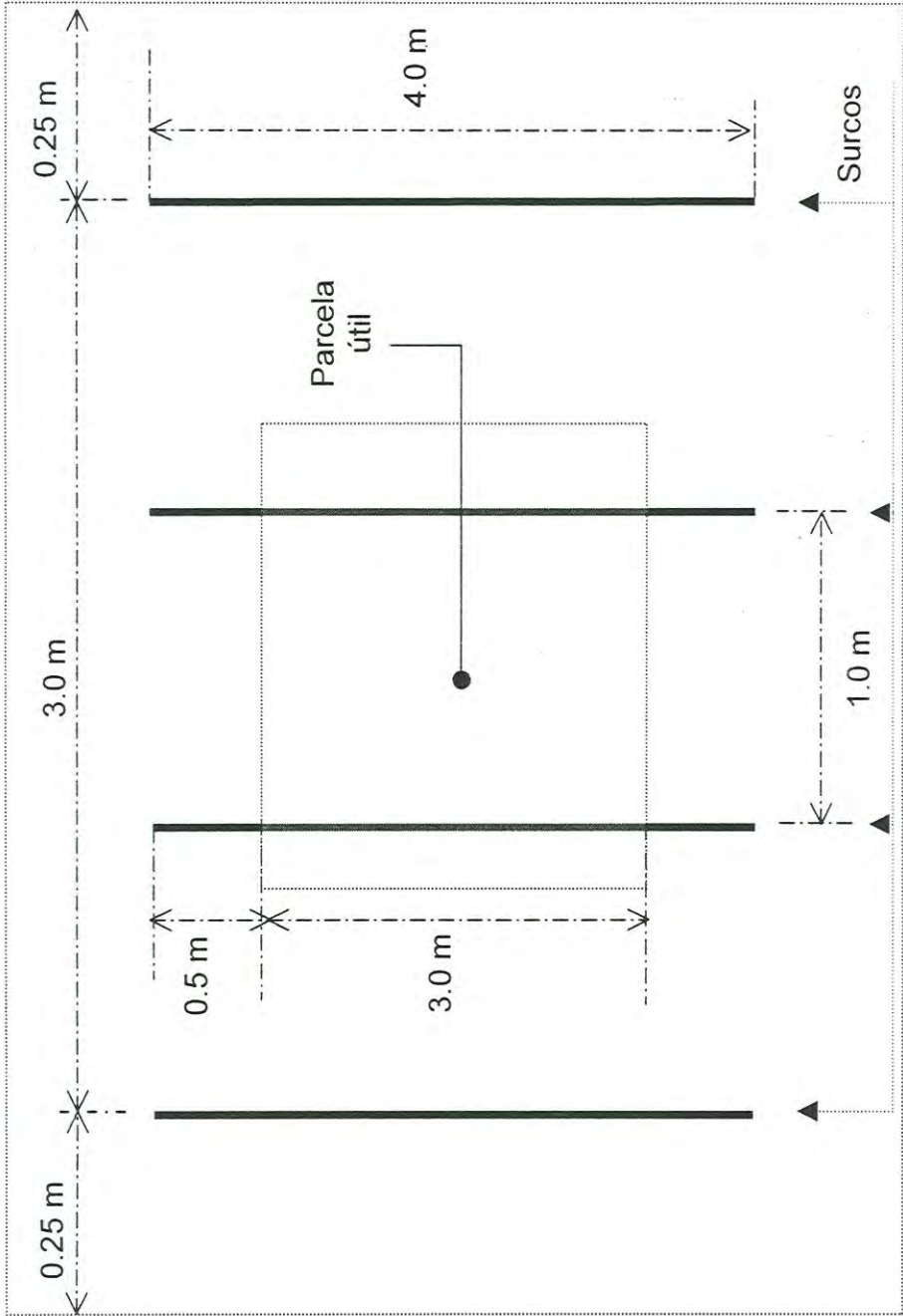


Figura 4. Dimensiones individuales de una parcela de cultivo. La región comprendida en el centro (parcela útil) fue tomada para determinar el rendimiento de cosecha, así como para realizar el muestreo.

## Riegos

Se aplicó un riego de siembra con lámina de 15-20 cm y seis riegos de auxilio con una lámina de 12 cm cada uno a intervalos de 12 días.

## Recolección de Granos en Diferentes Estados de Desarrollo

La recolección de muestras se llevó a cabo cortando 4 espigas de cada bloque (repetición) de las muestras de las diferentes variedades sembradas a intervalos de 3 días entre el 7° y 40° día después de anthesis (DDA) de acuerdo a lo reportado por Gupta *et al.*, (1996). La anthesis o el inicio de la floración de la espiga fue registrado el día 19 de marzo del 2003 y marcó el inicio del muestreo, mismo que terminó el día 26 de abril (40 DDA). Además, se colectaron muestras de trigo durante la cosecha, correspondientes al día 55 DDA.

Todas las muestras se colectaron entre las 7:30 y 9 :00 de la mañana. Se trazó una serie de puntos imaginarios en los surcos correspondientes a la parcela útil, asignándoseles números del 1 al 20 (Fig. 5) y seleccionando un número aleatorio en esa escala para cada día de muestreo. Sólo se tomaron muestras de la porción de parcela comprendida en el centro, denominada “parcela útil” para evitar posibles efectos de variación por interacciones de la planta y el medio ambiente circundante, denominados “efectos de orilla”.

Las espigas fueron etiquetadas y almacenadas a  $-5^{\circ}\text{C}$  para evitar la pérdida de humedad y prevenir su deterioro. Los granos de trigo se extrajeron de la espiga manualmente y se colocaron en tubos de vidrio de 100 x 23 mm. Los granos

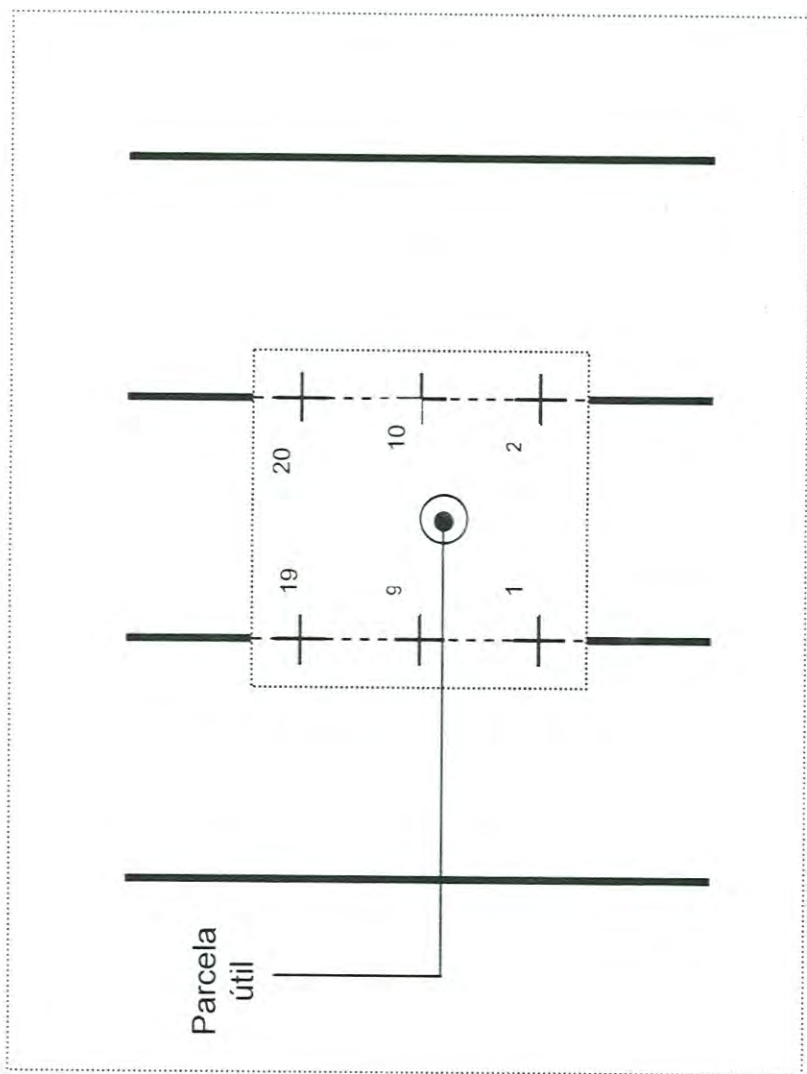


Figura 5. Sistema de numeración de los puntos de muestreo en la parcela útil. Los números indican el rango (1 a 20) y posición de algunos puntos de muestreo dentro de la parcela útil, mismos que fueron seleccionados aleatoriamente.

colectados fueron congelados y secados utilizando un liofilizador (Marca Labconco Freeze Dryer 3; Kansas City, Missouri, USA). Una vez secadas, las muestras fueron conservadas a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **Cosecha y Trilla**

La cosecha se llevó a cabo manualmente entre el 12 de mayo y el 13 de junio del 2003. Para ello se utilizó hoz para cortar el trigo, así como sacos de ixtle para su almacenamiento conforme se procedía con la cosecha. Los sacos fueron depositados en el almacén del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora y guardados hasta el momento de la trilla, que se realizó mecánicamente. Finalmente se almacenó el grano en bolsas de plástico previamente etiquetadas.

### **Selección de Variedades a Estudiar y Detección de Síntesis de Subunidades de Glutenina de Peso Molecular Alto**

#### **Electroforesis en Gel de Poliacrilamida**

Se realizaron análisis electroforéticos a las 40 muestras que fueron utilizadas para la siembra. Para conocer el patrón electroforético de las muestras sembradas e identificar diferencias en la presencia de subunidades de glutenina de peso molecular alto se empleó el procedimiento recomendado por (Laemmli, 1970). Además, para identificar la formación de proteína insoluble durante el desarrollo del grano de trigo se utilizó la técnica de Gupta y MacRitchie (1991).

**Electroforesis de Extractos de Proteína Total.** El análisis electroforético de extractos de proteína fue realizado de acuerdo al procedimiento recomendado por Laemmli (1970). Granos de trigo fueron molidos manualmente en un mortero utilizando un mazo y tamizados a través de un tamiz 10xx para uniformizar el tamaño de partícula.

10 mg de harina fueron mezclados con 1 ml de 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, conteniendo glicerol al 10% (v/v), SDS al 2%(p/v) y 2-mercaptoetanol al 5% (v/v). Posteriormente se agitó por 5 min a temperatura ambiente en un agitador (Marca Vortex Modelo Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) a nivel de poder número 4 y fueron centrifugados por 10 min a 10,000 g en una centrifuga (Marca Eppendorf, Modelo 5415D, Eppendorf; Hamburgo, Alemania). Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ L las cuales fueron usadas para su análisis electroforético en un gel separador con 10% de acrilamida y un gel concentrador con un 3.8% de acrilamida, ambos conteniendo 1.35% de bisacrilamida (Laemmli, 1972).

La separación de proteína se llevó a cabo a voltaje constante de 200 V por aproximadamente 1 h. Los geles fueron recuperados y teñidos por 1 h en una solución de azul de Coomassie al 0.1% (p/v) conteniendo ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 40% (v/v). Los geles se destiñeron en una solución conteniendo ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 40% (v/v) hasta obtener un fondo translúcido. Finalmente los geles fueron secados a temperatura ambiente y fotografiados utilizando un Escáner (Marca HP, Modelo Scanjet 3500 C, Palo Alto, CA. USA).

**Electroforesis de Extractos de Proteína Insoluble.** Los granos de trigo fueron molidos manualmente en un mortero utilizando un mazo y pasados a través de un tamiz de 10xx para uniformizar el tamaño de partícula. 10 mg de muestra finamente molida y tamizada fue mezclada en un tubo cónico (Eppendorf de 2.0 ml) y se agregó 1.4 mL de dimetilsulfóxido al 100%. Las muestras se sometieron a agitación en un agitador (Marca Vortex Modelo Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) por 10 min a nivel de poder 4 a temperatura ambiente (25-27 °C). Después de la agitación, las muestras fueron centrifugadas por 5 min (11,000 x g). El sobrenadante fue descartado y el residuo fue resuspendido en 1.4 mL de etanol al 70% (v/v), agitado por 10 min y centrifugado a 10,000 x g por 10 min. El sobrenadante fue nuevamente descartado y el residuo se dispersó en 160 µL de una solución de etanol al 70% (v/v) conteniendo 2-mercaptoetanol al 3% (v/v). Las muestras fueron incubadas a 80 °C en un baño de agua (Marca Yamato, modelo Water Bath Incubator, Yamato Scientific America, San Fco., CA. USA) por 5 min y se centrifugaron por 10 min. El sobrenadante fue cuidadosamente retirado y se combinó con 160 µL de buffer Tris 0.125 M conteniendo SDS al 4% (p/v), glicerol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0.005% (p/v) (Gupta y MacRitchie, 1991).

Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 20 µL, las cuales fueron usadas para el análisis electroforético en un gel separador con 10% de acrilamida y un gel concentrador con un 3.8% de acrilamida, ambos conteniendo 1.35% de bisacrilamida. La separación de proteína se llevó a cabo a voltaje constante de 200 V por aproximadamente 1 h. Los geles fueron recuperados y teñidos por 1 h en una solución de azul de Coomassie al 0.1% (p/v) conteniendo ácido acético al



10% (v/v) y metanol al 40% (v/v). Los geles se destiñeron en una solución conteniendo ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 40% (v/v) hasta obtener un fondo translúcido. Finalmente los geles fueron secados a temperatura ambiente y fotografiados.

### **Análisis de Proteína Polimérica por Cromatografía de Exclusión Molecular**

Se realizaron análisis de proteína polimérica total e insoluble para detectar la formación de proteína polimérica en los granos de trigo en desarrollo de las muestras seleccionadas. Además, se analizaron muestras de granos de trigo de diferentes localidades que fueron utilizadas para la siembra (Progenitores) así como las muestras cosechadas de las mismas (Progenie), con el objeto de establecer diferencias en el contenido de proteína que podrían presentarse en diferentes muestras de la misma variedad al provenir de diferentes regiones agrícolas.

### **Extracción de Proteína Total**

Se pesaron muestras de 10 mg de muestras de trigo previamente molido y tamizado en un tubo cónico Eppendorf de 2 ml y fueron suspendidas en 1 ml de buffer de fosfato 0.05 M, pH 6.9, conteniendo dodecil sulfato de sodio al 0.5% (p/v). La extracción de proteína soluble se realizó mediante agitación por 5 min en un agitador Vortex Genie 2. Las suspensiones fueron sonicadas por 15 s con una salida de poder de 6 watts utilizando un sonicador (Marca Sonic Dismembrator Modelo 60, Fisher Scientific, Pittsburg, PA., USA). Las soluciones sonicadas

fueron centrifugadas a 11, 000 x g por 20 min. Los sobrenadantes fueron removidos utilizando jeringas desechables de 3 mL y filtrados a través de filtros de nylon Whatman de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Marca Whatman, Inc.; Clifton, NJ, USA). El filtrado fue colocado en viales para HPLC de 2.0 mL y sumergidos por 2 min en un baño de agua (Marca Yamato, modelo Water Bath Incubator, Yamato Scientific America, San Fco., CA. USA) a 80 °C para evitar cambios en su estabilidad debidos a actividad proteolítica (Larroque *et al.*, 2000). Después de enfriados, los viales fueron colocados en un dispositivo de inyección automático (Autosampler 410 Varian Prostar) para su análisis por HPLC (Cinco, 2001).

### **Extracción de Proteína Soluble en 0.5% SDS**

Se pesaron 10 mg de muestras de trigo molido y tamizado en un tubo cónico Eppendorf de 2 ml y fueron suspendidas en 1 ml de buffer de fosfato 0.05 M, pH 6.9, conteniendo dodecil sulfato de sodio al 0.5% (p/v). La extracción de proteína soluble se realizó mediante agitación por 5 min en un agitador Vortex Genie 2. Posteriormente fueron centrifugadas a 11,000 X g por 20 min. Los sobrenadantes fueron removidos utilizando jeringas desechables de 3 mL y filtrados a través de filtros de nylon Whatman de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman, Inc.; Clifton, NJ, USA). El filtrado fue colocado en viales para HPLC de 2 mL y sumergidos por 2 min en un baño de agua (Marca Yamato, modelo Water Bath Incubator, Yamato Scientific America, San Fco., CA. USA) 80 °C. Después de enfriados, los viales fueron colocados en un dispositivo de inyección automático (Autosampler 410 Varian Prostar) para su análisis por HPLC (Cinco, 2001).

## **Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Exclusión Molecular**

Las preparaciones de proteína total y de proteína soluble fueron analizadas por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna (Marca Phenomenex BioSep SEC-4000) (300 X 7.8 mm) con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 500 Å con un rango de exclusión de 15,000 a 500,000 Da para proteínas suspendidas en 0.5% SDS (Phenomenex, Inc., Torrence, CA., USA). Se inyectaron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  en la columna y fueron fraccionadas a un flujo de 0.5 mL/min con acetonitrilo (ACN) al 50% conteniendo ácido trifluoroacético (TFA) al 0.05% (Cinco, 2001). El tiempo total de elución fue de 30 min con un tiempo de equilibrio de 10 min entre inyecciones. La elución de proteína fue detectada a 214 nm utilizando un detector UV-visible de arreglo de diodos. Los datos fueron procesados utilizando el paquete Star Chromatography Work Station Varian System Control Versión 5.51. Las determinaciones de proteína polimérica se realizaron mediante la integración del área bajo la curva, la cual se realizó utilizando el programa (Varian Interactive Graphics) del paquete anterior.

### **Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Para monitorear la formación de proteínas poliméricas durante el desarrollo del grano de trigo de las diferentes variedades sembradas se empleó un diseño experimental de bloques completamente al azar, con cuatro repeticiones por variedad.

Para los resultados de rendimiento de cosecha y de formación de proteína polimérica total e insoluble se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias por la Prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ . Para realizar estos análisis estadísticos se utilizó el programa JMP Versión 4.0.4. (SAS Institute, Inc., 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Rendimientos de Cosecha entre Variedades

El rendimiento de cosecha obtenido de las muestras de las diferentes variedades fue muy similar y no se encontraron diferencias estadísticas. El rendimiento promedio global encontrado fue de 5.93 Ton/ha sin que se observaran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (Tablas 3 y 4), lo cual podría atribuirse a las condiciones en que se mantuvo el cultivo durante su desarrollo gracias a un constante monitoreo y cuidado. De esta forma, los rendimientos agronómicos no pueden señalar un primer criterio de selección de variedades para su estudio, al ser sus rendimientos estadísticamente iguales.

### Rendimientos de Cosecha por Variedad y Origen

Se encontraron diferencias significativas en una de las muestras de la variedad Rayón (Tabla 5). La muestra No. 38 proveniente de El Espinal, Sinaloa, fue estadísticamente diferente (Tabla 6) a las muestras provenientes de La Cruz, Sinaloa (No.40), Guamúchil-Angostura (No.33), y Guamúchil (No.26). Estas últimas tres muestras presentaron rendimientos significativamente mayores ( $P > 0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en las demás variedades.

Tabla 3. Análisis de varianza de rendimiento de cosecha entre las variedades sembradas.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Variedad	12	1.17 NS
Error	147	

<sup>1</sup> NS = No significativa a  $p < 0.05$ .

Tabla 4. Rendimientos de cosecha de las variedades sembradas.

Variedad	Rendimiento (Ton/ha) <sup>1</sup>
Aconchi	5.92 a
Altar	5.85 a
Batequis	5.49 a
Maviri	6.19 a
Nácori	5.59 a
Oasis	5.57 a
Oasis F-86	6.73 a
Ocoroni	5.76 a
Ocoroni F-86	6.30 a
Rafi	5.63 a
Rafi C-97	6.14 a
Rayón	5.65 a
Rayón F-89	6.30 a
DMS <sup>2</sup>	2.35

1 = Valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0.05$ .

2 = Diferencia mínima significativa.

Tabla 5. Análisis de varianza de rendimientos de cosecha por origen de muestras de trigo variedad Rayón.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Localidad	6	5.30 NS
Error	60	

<sup>1</sup> NS = No significativa a  $p < 0.05$ .



Tabla 6. Rendimientos de cosecha de las diferentes muestras de la variedad Rayón.

Origen	Promedio
La Cruz, Sin. (40)**	7.11 a <sup>1</sup>
Guamúchil-Angostura Sin. (33)	6.98 a
Guamúchil, Sin. (26)	6.91 a
Guamúchil, Sin. (27)	6.47 ab
Guamúchil-Angostura Sin. (25)	6.27 ab
Guasave, Sin. (35)	6.21 ab
Guasave, Sin. (31)	6.19 ab
Guasave, Sin. (32)	6.18 ab
V. Del Yaqui, Son. (4)	6.06 ab
El Espinal, Sin (38)	5.89 ab
V. Del Yaqui, Son. (5)	5.89 ab
Guasave, Sin. (30)	5.87 ab
V. Del Yaqui, Son. (1)	5.77 ab
V. Del Yaqui, Son. (3)	5.49 ab
Los Mochis, Sin. (20)	5.30 ab
V. Del Yaqui, Son. (2)	5.15 ab
El Espinal, Sin (39)	4.73 b
DMS <sup>***</sup>	2.07

1<sup>\*</sup> = Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0.05$ .

2<sup>\*\*</sup> = El número entre paréntesis indica el número de muestra correspondiente al lote original sembrado e indica una diferente localidad de cultivo.

3<sup>\*\*\*</sup> = Diferencia mínima significativa.

## Selección de Variedades a Estudiar

### Análisis Electroforético de las Variedades de Trigo Sembradas

En el trigo existen diferentes tipos de proteína, y las proteínas que ejercen una influencia predominante sobre la calidad de la masa de trigo son las gluteninas y, específicamente, las subunidades de glutenina de peso molecular alto (Dell'Aquila *et al.*, 1983; Gupta *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1996; y Rhazi *et al.*, 2003). Se determinó la presencia o ausencia de éstas ya que estudios recientes con líneas isogénicas de trigo han mostrado asociaciones significativas con las subunidades 1Dx5+1Dy10 y la viscoelasticidad del gluten y fuerza de la masa (Popineau *et al.*, 1994). De esta forma es posible evaluar el efecto que ejercen éstas subunidades en la formación de proteína polimérica en variedades de trigo mexicanos y utilizar la información generada en la discriminación y selección de variedades y posterior generación de líneas isogénicas. Para seleccionar la(s) variedad(es) a estudiar, se empleó la técnica de electroforesis disociante de extractos de proteína total (Figs. 6 y 7). Este análisis permitió detectar la presencia de las subunidades de glutenina de peso molecular alto, pues al comparar las bandas correspondientes a las diferentes variedades se pudo observar las diferencias existentes entre ellas. El siguiente paso consistió en seleccionar ciertas variedades que por los patrones observados podrían ser objeto de estudio. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron las variedades Rayón, Oasis, Altar y Aconchi (Figuras 8 y 9). De las variedades Rayón y Oasis, cuyas harinas son utilizadas en la industria de la panificación, se necesitaba

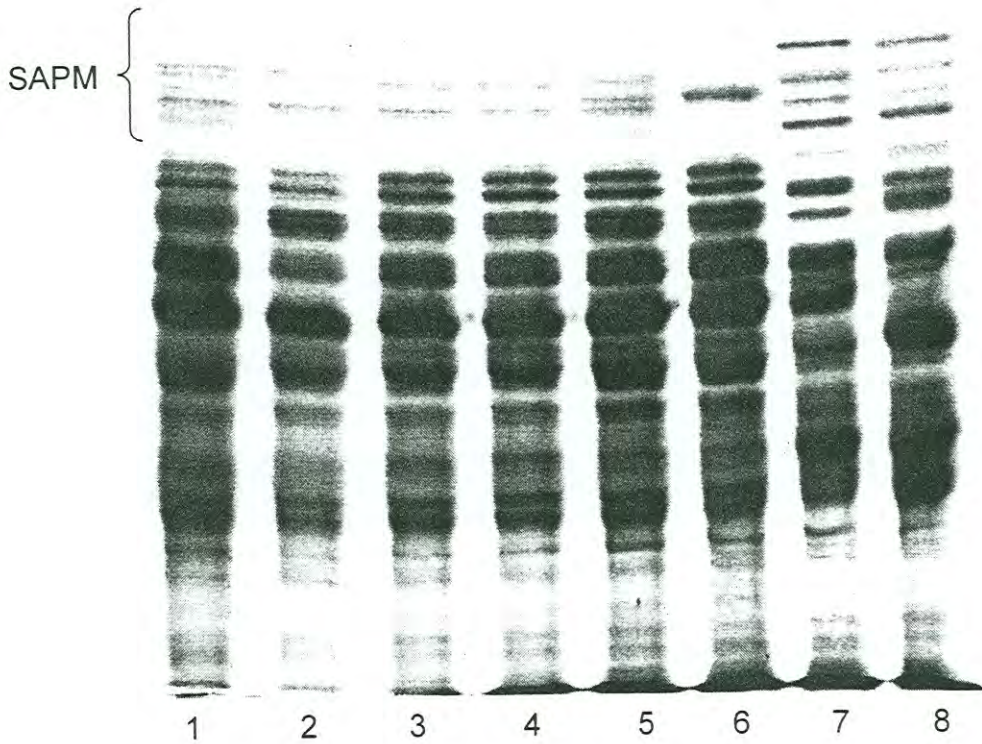


Figura 6. SDS-Electroforesis de proteína total de diferentes muestras de trigo sembradas (1): (1,2,5) Nacori, (3) Aconchi, (4) Altar, (6) Rafi, (7) Ocoroni, y (8) Batequis. SAPM: Subunidades de masa molecular alta.

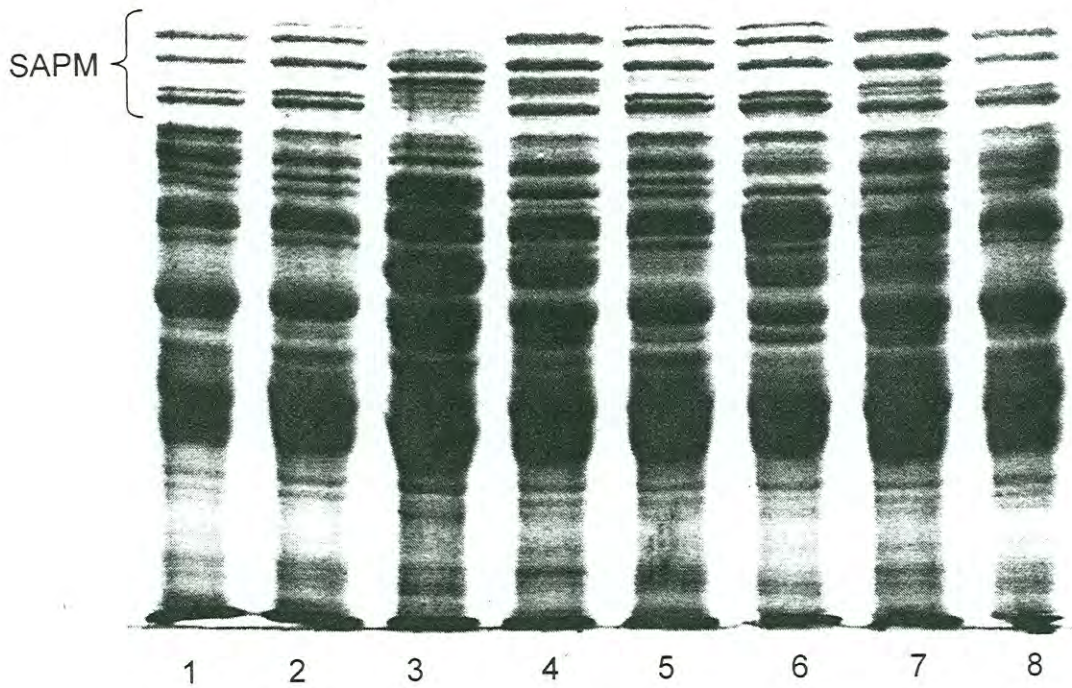


Figura 7. SDS-Electroforesis de proteína total de diferentes muestras de trigo sembradas (2): (1) Maviri, (2, 5) Oasis F-86, (3), Rafi C-97, (4) Ocoroni, (6) Oasis, (7) Ocoroni F-86 y (8) Rayón . SAPM: Subunidades de masa molecular alta.

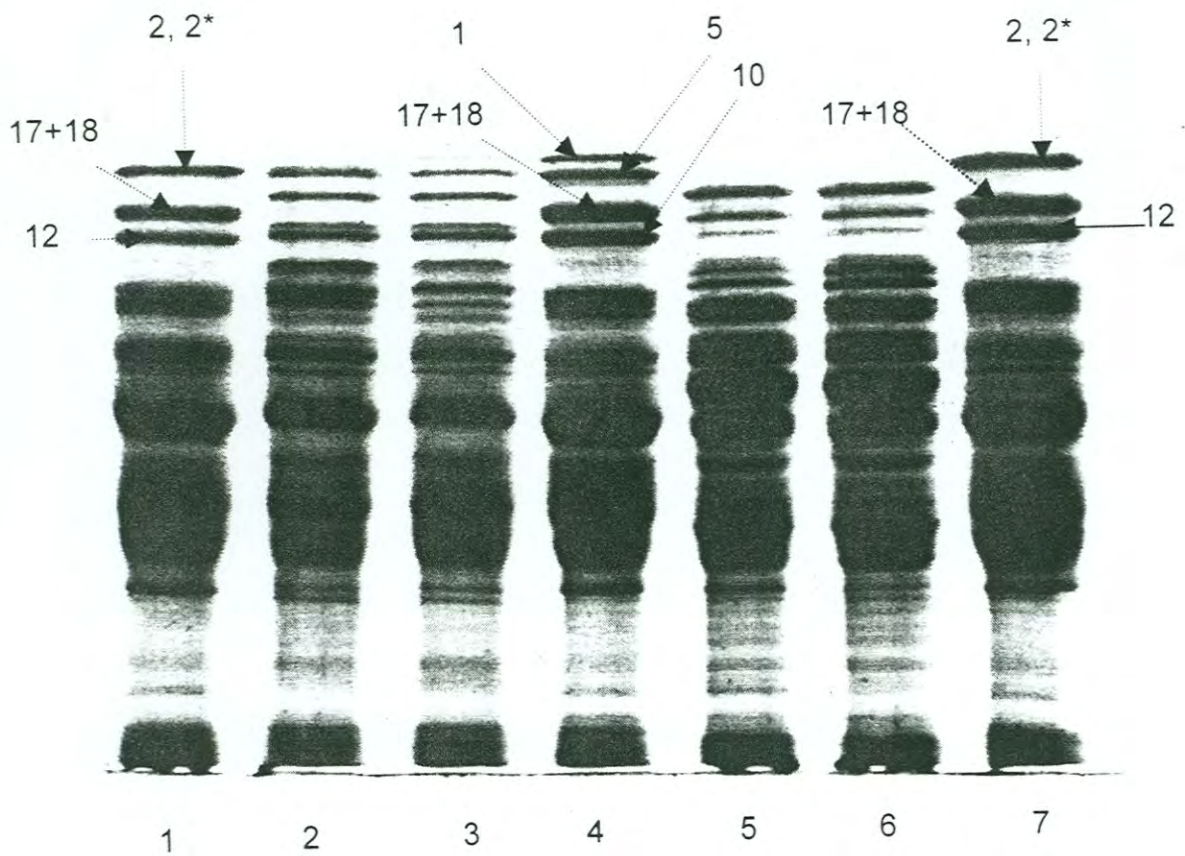


Figura 8. Electroforesis de extractos proteicos de variedades de trigo conteniendo distintas subunidades de glutenina de peso molecular alto (1): (1) Rayón; (2) Oasis F-86; (3) Altar; (4) Aconchi; (1), (4) y (5): Líneas isogénicas con subunidades de gluteninas (2\*, 17+18, 2+12), (1, 17+18, 5+10) y (2\*, 17+18, 5+10), respectivamente.

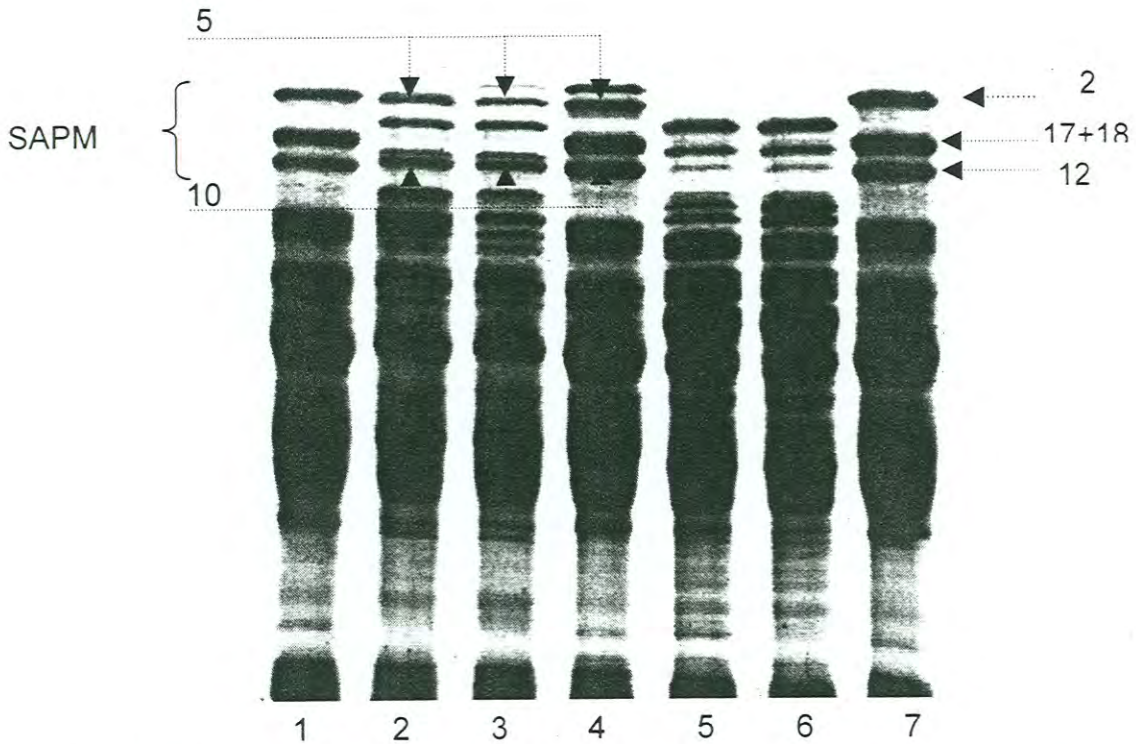
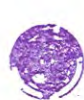


Figura 9: Electroforesis de extractos proteicos de variedades de trigo conteniendo distintas subunidades de glutenina de peso molecular alto (2): (2) Rayón; (3) Oasis F-86; (5) Altar; (6) Aconchi; (1), (4) y (7): Líneas isogénicas con subunidades de gluteninas (2\*, 17+18, 2+12), (1, 17+18, 5+10) y (2\*, 17+18, 5+10), respectivamente. SAPM: Subunidades de peso molecular alto.



determinar la presencia de subunidades asociadas a buenas características de calidad, mientras que de las variedades Altar y Aconchi el objetivo era determinar la ausencia de subunidades de glutenina de peso molecular alto correspondientes al genoma D, debido a que éstas están relacionadas con la formación de proteína polimérica, y con esta información seleccionar dos de ellas con el propósito de analizar la formación de proteína polimérica en el desarrollo del grano de trigo. De esta forma, el siguiente paso consistió en la utilización de muestras de harina de trigo de composición de subunidades de glutenina conocida. Para ello se emplearon líneas de trigo isogénicas conteniendo varias subunidades de glutenina de alto peso molecular provenientes de la Universidad Estatal de Kansas, EU, para usarlas como patrones de referencia. En dichas muestras están presentes los pares de subunidades de glutenina de peso molecular alto correspondientes al genoma D, 5+10 y 2+12, de tal forma que se podría indentificar la presencia o ausencia de ellas en las variedades de trigo preseleccionadas. En el análisis por electroforesis se encontró que el par de subunidades de glutenina de peso molecular alto 5+10 está presente en las variedad Rayón y Oasis F-86, mientras que en las variedades Altar y Aconchi no se encuentran subunidades asociadas al Loci Glu-D1. Las diferencias encontradas en Glu-D1 son mostradas en la Tabla 7, donde se muestran la composición de subunidades de glutenina de peso molecular alto de estas variedades y el uso a que están destinadas estas variedades en la industria.

Tabla 7. Variedades preseleccionadas, composición de subunidades de glutenina de peso molecular alto en Glu-D1 y su uso en la industria.

Muestra	Variedad	Origen	SAPM <sup>1</sup>	Clasificación <sup>2</sup>	Uso <sup>2</sup>
2	Rayón	Valle del Yaqui	5+10	Grupo 1	Panificación
6	Altar	Valle del Yaqui	--	Grupo 5	Pastas
16	Aconchi	Navojoa	--	Grupo 5	Pastas
34	Oasis F-86	Guamúchil	5+10	Grupo 1	Panificación

<sup>1</sup> SAPM: Subunidades de glutenina de peso molecular alto.

<sup>2</sup> Fuente: SAGARPA, 2002.



## Detección de Síntesis de Proteína por SDS-Electroforesis

### Variedad Altar

Debido a que la síntesis de subunidades de glutenina de peso molecular alto en el grano de trigo en desarrollo puede ser comparada con el grado de polimerización de las proteínas en el mismo, es posible establecer la influencia que ejercen dichas subunidades sobre el patrón de formación de proteína polimérica (Gupta *et al.*, 1996). Con ese objetivo, en este estudio se seleccionaron muestras de granos de trigo en desarrollo correspondientes al período comprendido entre los 3 y 55 DDA, período durante el cual el grano de trigo atraviesa el proceso de llenado y maduración (Miller, 1992). En los patrones electroforéticos de proteína total se detectó la formación de subunidades de glutenina y albúminas de peso molecular bajo desde el día 15 DDA, al igual que las gliadinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ), en el caso de la variedad Altar. Esto coincide con los resultados reportados por Mecham *et al.*, (1981) y Benetrix *et al.*, (1994), quienes indicaron que existe una síntesis coordinada entre los diferentes grupos de gliadinas. La aparición de subunidades de glutenina de peso molecular alto ocurre hasta el día 22 después de antesis (DDA) (Fig. 10). Se observaron diferencias en la formación de proteína total y proteína insoluble. Las bandas de proteína que habían sido detectadas desde pocos días después de antesis correspondientes a proteína total no fueron detectadas en la fracción proteica insoluble (Fig. 10). La proteína insoluble fue detectada hasta el día 22 DDA. Esto podría significar que si bien la proteína dentro del grano de trigo empieza a ser producida desde los primeros días después de antesis, en el caso de esta variedad en particular

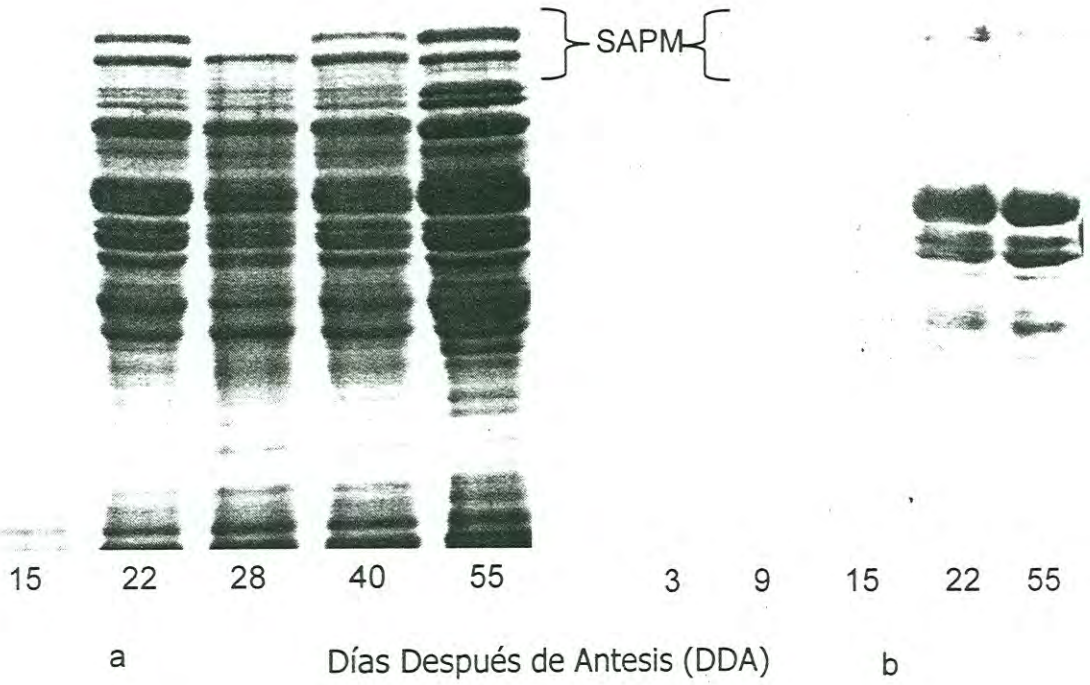


Figura 10. Electroforesis de extractos proteicos de granos de trigo a diferentes días después de antesis de la variedad Altar. (a) Proteína total y (b) Proteína polimérica insoluble. La subunidades de glutenina de peso molecular alto (SAPM) son detectadas desde el día 15 DDA en la electroforesis de extractos de proteína total (a) , mientras que la proteína insoluble es detectada hasta el día 22 DDA.

(Altar), la agregación por enlaces disulfuro (formación de polímeros mayores) (de acuerdo a Rhazi *et al.*, 2003) y con ello la aparición de la fracción insoluble no son procesos que inician de manera simultánea. Una vez que se detectó por primera vez la formación de proteína insoluble ésta permaneció presente en el patrón electroforético durante todo el proceso de desarrollo del grano de trigo.

### **Variedad Rayón**

En el caso de la variedad Rayón la producción de proteína total, las subunidades de glutenina de peso molecular alto, así como la producción de proteína insoluble ocurren desde etapas más tempranas del desarrollo del grano de trigo. Mediante análisis electroforético de proteína total se encontró que las subunidades de glutenina de peso molecular alto aparecen desde el día 15 DDA (Fig. 11). Además, la formación de agregados poliméricos también aparece más temprano en la variedad Rayón que en la variedad Altar. En la Fig. 11 se puede observar cómo la intensidad de las bandas correspondientes a la proteína polimérica insoluble aumenta desde el día 15 DDA al día 55 DDA. Al comparar los resultados correspondientes a la formación de proteína total y proteína insoluble, se observó que se producen proteínas monoméricas de peso molecular bajo en altas concentraciones (albúminas, globulinas y gliadinas). Posteriormente se forman los agregados poliméricos que son detectados como fracción proteica insoluble y que corresponden a gluteninas de peso molecular alto. Estos observaron un patrón similar en la síntesis de las diferentes fracciones proteicas durante el desarrollo de diferentes genotipos de variedades de trigo.

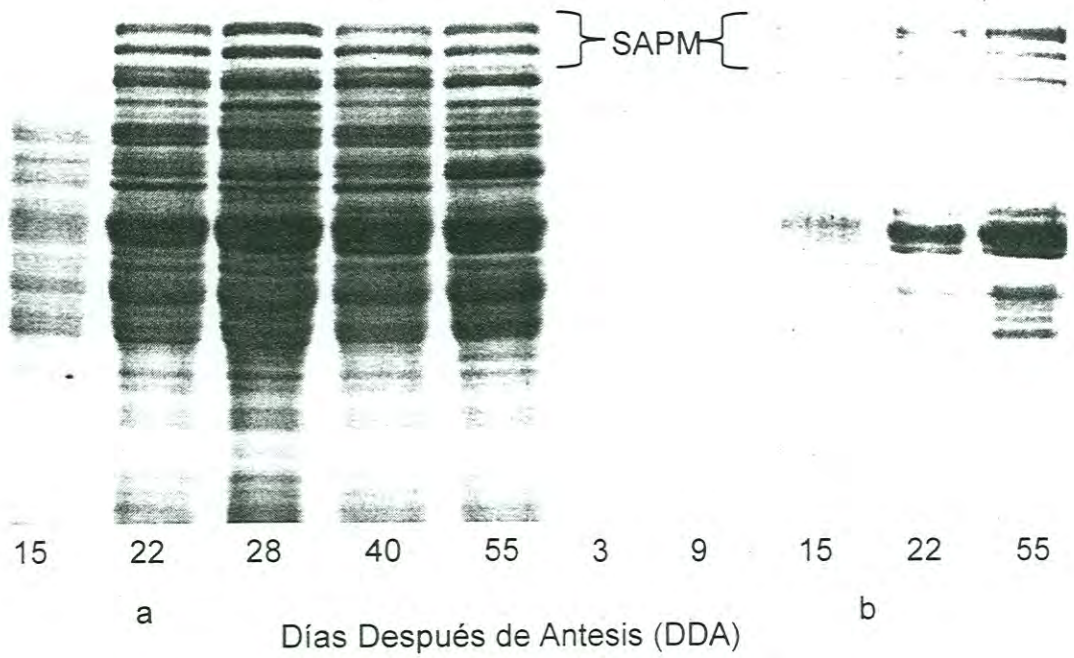


Figura 11. Electroforesis de extractos proteicos de granos de trigo a diferentes días después de antesis de la variedad Rayón. (a) Proteína total y (b) Proteína polimérica insoluble. La subunidades de glutenina de peso molecular alto (SAPM) son detectadas desde el día 15 DDA en la electroforesis de extractos de proteína total (a) al igual que la proteína insoluble (b) es detectada hasta el día 22 DDA.

En este estudio, la humedad del grano de trigo en las etapas más tempranas de desarrollo fue muy alta en ambas variedades (alrededor del 70% en el día 9 DDA) y disminuyó progresivamente durante su desarrollo (Fig. 12). En el caso de la variedad Altar, la aparición de proteína polimérica insoluble en el patrón electroforético fue detectada al día 22 DDA. La humedad correspondiente a ese día en el grano de trigo fue de 53%. En contraste, en la variedad Rayón este proceso inició en el día 15 DDA con una humedad correspondiente a 61%. Es interesante observar que la intensidad del patrón electroforético en la variedad Altar permanece constante, mientras que en el caso de la variedad Rayón, éste aumentó progresivamente durante el desarrollo del grano. Rhazi *et al.*, (2003) reportaron que durante la fase de división y alargamiento celular, las subunidades de glutenina (particularmente las de peso molecular bajo) contienen una gran cantidad de grupos sulfidrilo libres, los cuales sufren reacciones de oxidación durante la deshidratación del grano, un proceso que coincide con la formación de proteína polimérica insoluble. La desecación produce la ruptura de los cuerpos proteicos y aparece una matriz proteinacea rodeando a los gránulos de almidón, el cual es un proceso simultáneo a la formación de proteína polimérica insoluble. Además, Rhazi *et al.*, (2003) observaron que la alquilación de grupos sulfidrilo de glutenina libres antes de que el grano sufra el proceso de desecación promueve un incremento en la solubilidad en SDS de las proteínas poliméricas al reducir tanto la distribución de sus pesos molecular como la compactación de las mismas. Según sus resultados, la desecación del grano promueve la formación de pequeños agregados al facilitar la formación de puentes de hidrógeno

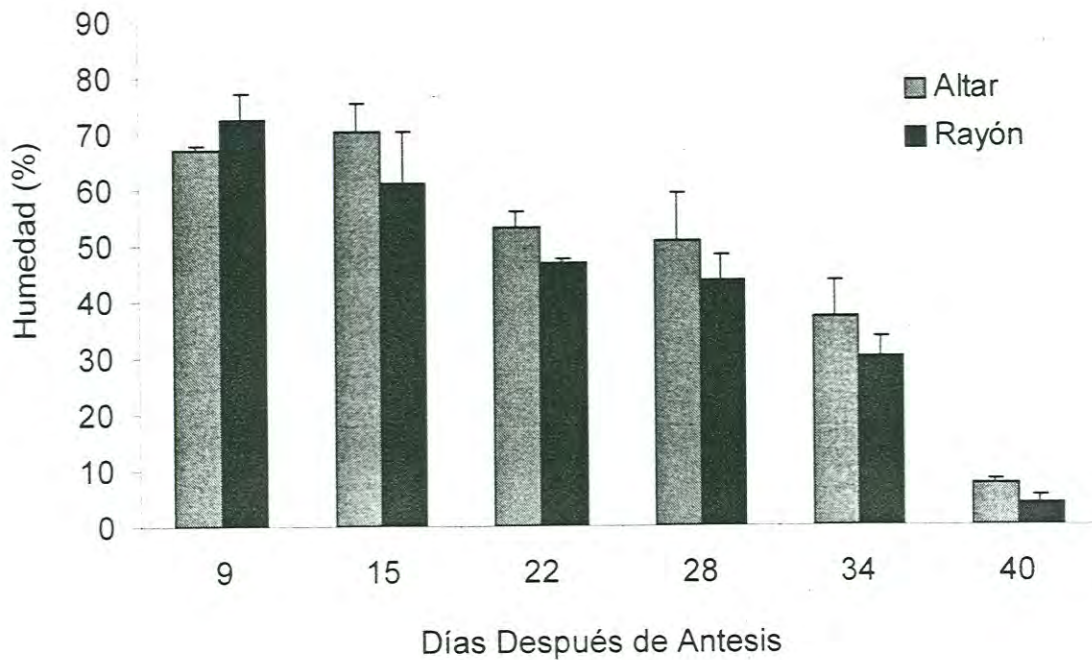


Figura 12. Contenido de humedad del grano de trigo de las variedades Altar y Rayón a diferentes días después de antesis. Las barras indican la desviación estándar.

intercatenarios entre las regiones repetitivas de las subunidades de glutenina, lo cual puede acercar a los grupos sulfidrilo libres en la glutenina lo suficientemente cerca como para formar puentes disulfuro adicionales.

### **Detección de Síntesis de Proteína por Cromatografía de Exclusión Molecular**

Las fracciones proteicas del grano de trigo que son capaces de participar en la formación de polímeros mayores por medio del establecimiento de enlaces disulfuro son las correspondientes a las tritricinas, albúminas de peso molecular alto pero principalmente las gluteninas (Gupta *et al.*, 1996). De esta proteína polimérica total a su vez se han reconocido dos fracciones: La fracción soluble en 0.5% SDS (a la cual se le atribuye menor tamaño molecular) y la fracción insoluble en 0.5% SDS (de mayor tamaño molecular) (Gupta *et al.*, 1996).

Con el objeto de establecer las condiciones apropiadas para eluir las distintas fracciones proteicas del grano de trigo en desarrollo, se empleó la metodología recomendada por Cinco (2001). Para contar con perfiles cromatográficos que identificaran las fracciones proteicas, se empleó una línea isogénica de trigo conteniendo las subunidades de peso molecular alto 1, 20x+20y y 5+10. Lo anterior fue debido a que en dicha línea isogénica se expresan las subunidades indicadas en los genomas A, B, y D, respectivamente, tal como corresponden a un trigo hexaploide apropiado para panificación. En la Fig. 13 se muestra un ejemplo de la separación de las fracciones proteicas. La primera sección de los cromatogramas (a) es la correspondiente a la proteína polimérica, mientras que la

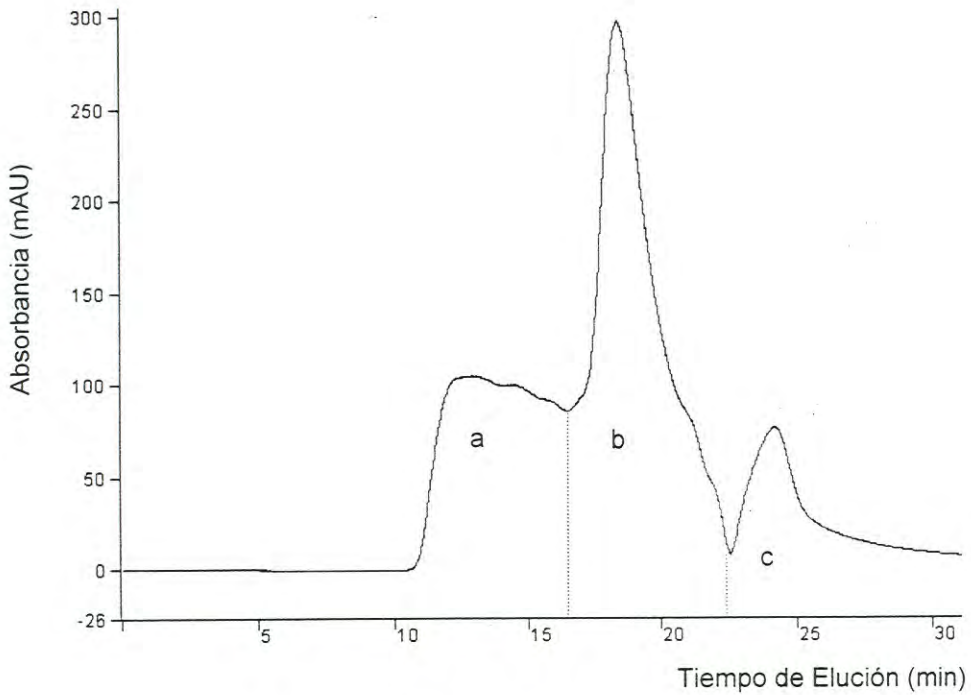


Figura 13. Perfil cromatográfico de exclusión molecular de extractos de proteína total de una línea isogénica conteniendo las subunidades (1, 20x+20y, 5+10) utilizando 0.5% SDS y sonicación. La zona (a) comprende a la proteína polimérica, la zona (b) a gliadinas y la zona (c) a albúminas y globulinas.



segunda fracción (b) es la correspondiente a gliadinas, albúminas y tricinas, y la tercer región es la correspondiente a las albúminas y globulinas (c) (Cinco, 2001).

Con los resultados anteriores fue posible identificar los tiempos de retención de las diferentes fracciones proteicas para así identificarles en las muestras de granos en desarrollo del presente estudio.

### **Detección de Síntesis de Proteína Polimérica Total en la Variedad Altar**

La primera fracción de proteína que es sintetizada en el grano de trigo es la correspondiente a albúminas y globulinas (pico 3), tal como se observa en la Fig. 14. Se detectó una alta concentración de las mismas en el día 3 DDA. En contraste, se observó que la proteína polimérica se empezó a sintetizar hasta el día 9 DDA. La fracción correspondiente a albúminas y gliadinas (pico 2) aparece desde el día 3 DDA y se incrementó rápidamente en el grano hasta el día 40 DDA, mientras que la fracción correspondiente a albúminas y globulinas disminuyó con el desarrollo del grano de trigo. La proteína polimérica (pico 1) detectada el día 9 permaneció constante hasta el día 15 DDA. A partir del día 22 DDA se detectó un incremento significativo (Tabla 8) en la proporción de proteína de peso molecular alto (pico 1), la cual se mantuvo constante hasta el día de la cosecha (Fig. 15).

### **Detección de Síntesis de Proteína Polimérica Total en la Variedad Rayón**

En esta variedad se encontraron ciertas diferencias en la producción de las diferentes fracciones de proteína en el grano. En este caso la fracción de proteína

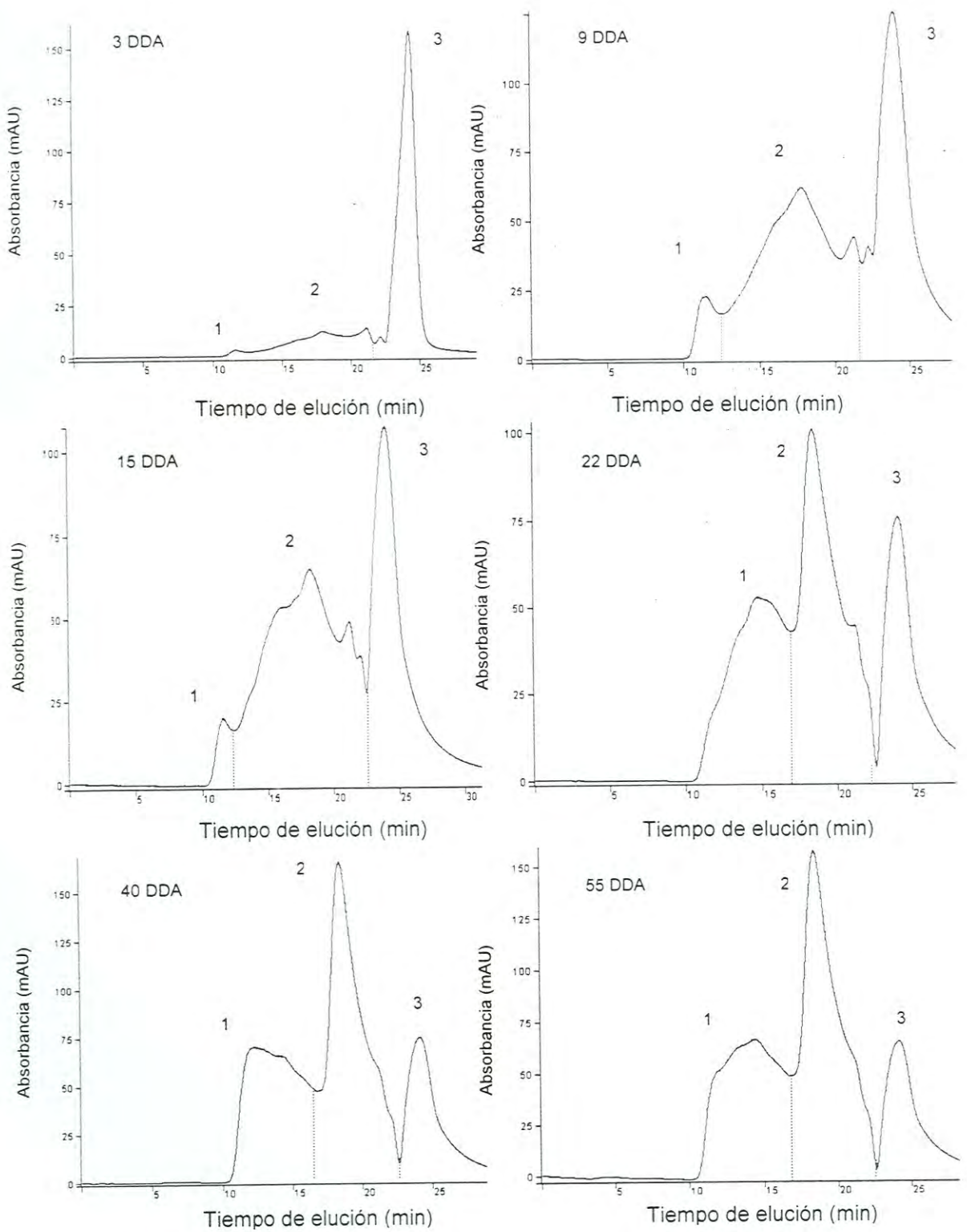


Figura 14. Perfiles cromatográficos de exclusión molecular de proteína total extraída de grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis. (1) Proteína polimérica; (2) gliadinas; (3) albúminas y globulinas.

Tabla 8. Análisis de varianza de la formación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Día después de antesis	7	27.59 *
Error	16	

<sup>1</sup> \* = Significativa a  $p < 0.05$ .

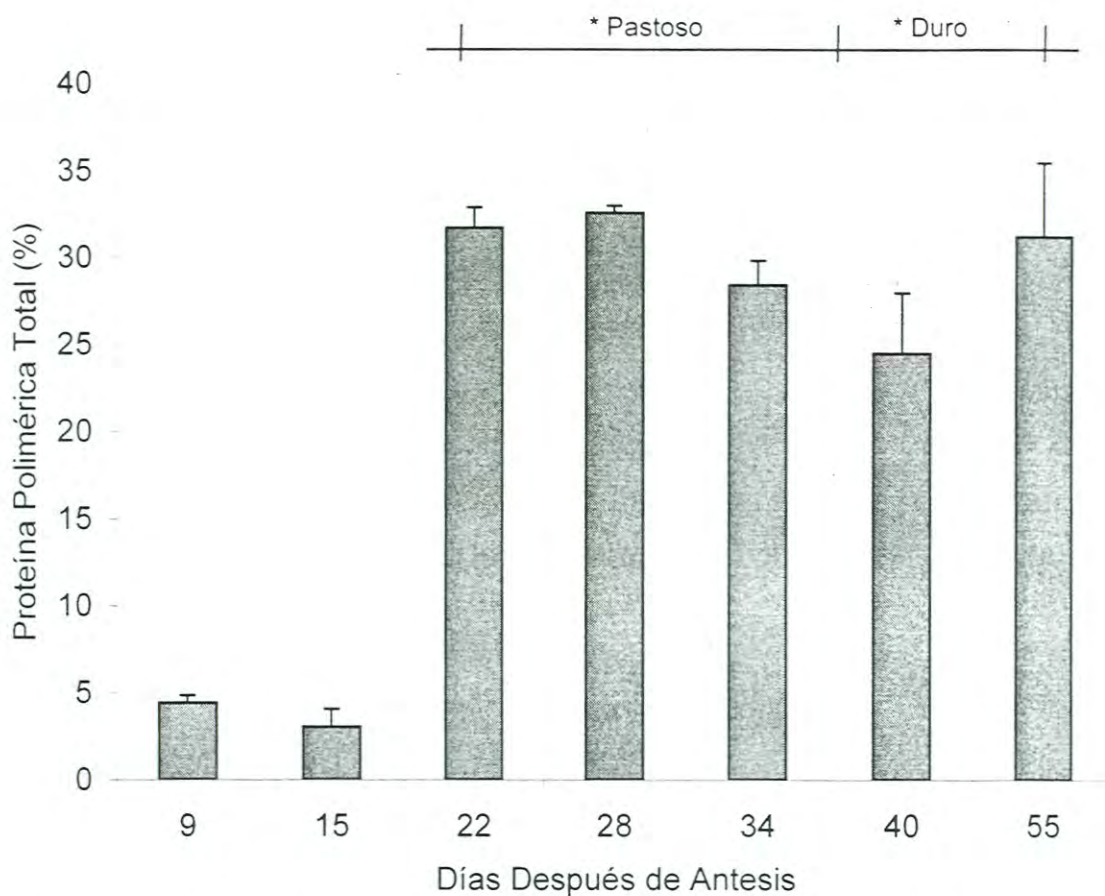


Figura 15. Perfil de acumulación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis. Las barras indican la desviación estándar. (\*) Indica el estado de madurez del grano.

correspondiente a las albúminas y globulinas es la que mayor proporción presentó desde el día 3 DDA, sin embargo, se observó que también apareció el pico correspondiente a las gliadinas, albúminas de peso molecular alto y tritricinas, y en menor medida, por la fracción correspondiente a la proteína de alto peso molecular (Fig. 16).

La proteína polimérica detectada desde el día 3 permaneció constante hasta el día 9 DDA. A partir del día 15 DDA se detectó un gran incremento significativo (Tabla 9) en la proporción de proteína de peso molecular alto, la cual se mantuvo constante hasta el día de la cosecha (55 DDA) (Fig. 17). De esta forma se encontró una diferencia en el perfil de formación de proteína polimérica entre ambas variedades analizadas, Altar y Rayón. La variedad hexaploide (Rayón) acumuló polímeros proteicos más tempranamente que la variedad tetraploide (Altar).

### **Comparación entre Porcentaje de Proteína Polimérica Total e Insoluble en 0.5% SDS**

En ambas variedades de trigo (Altar y Rayón) el porcentaje de proteína polimérica total (extraída por 0.5% SDS y sonicación) fue similar, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 10,  $P > 0.05$ ). Sin embargo, las diferencias fueron evidentes al determinar las fracciones de proteína polimérica insoluble. Utilizando el concepto establecido por Gupta *et al.*, (1996), donde los polímeros extraíbles o solubles en 0.5% SDS son de menor tamaño molecular promedio que los insolubles, se encuentra que la constitución

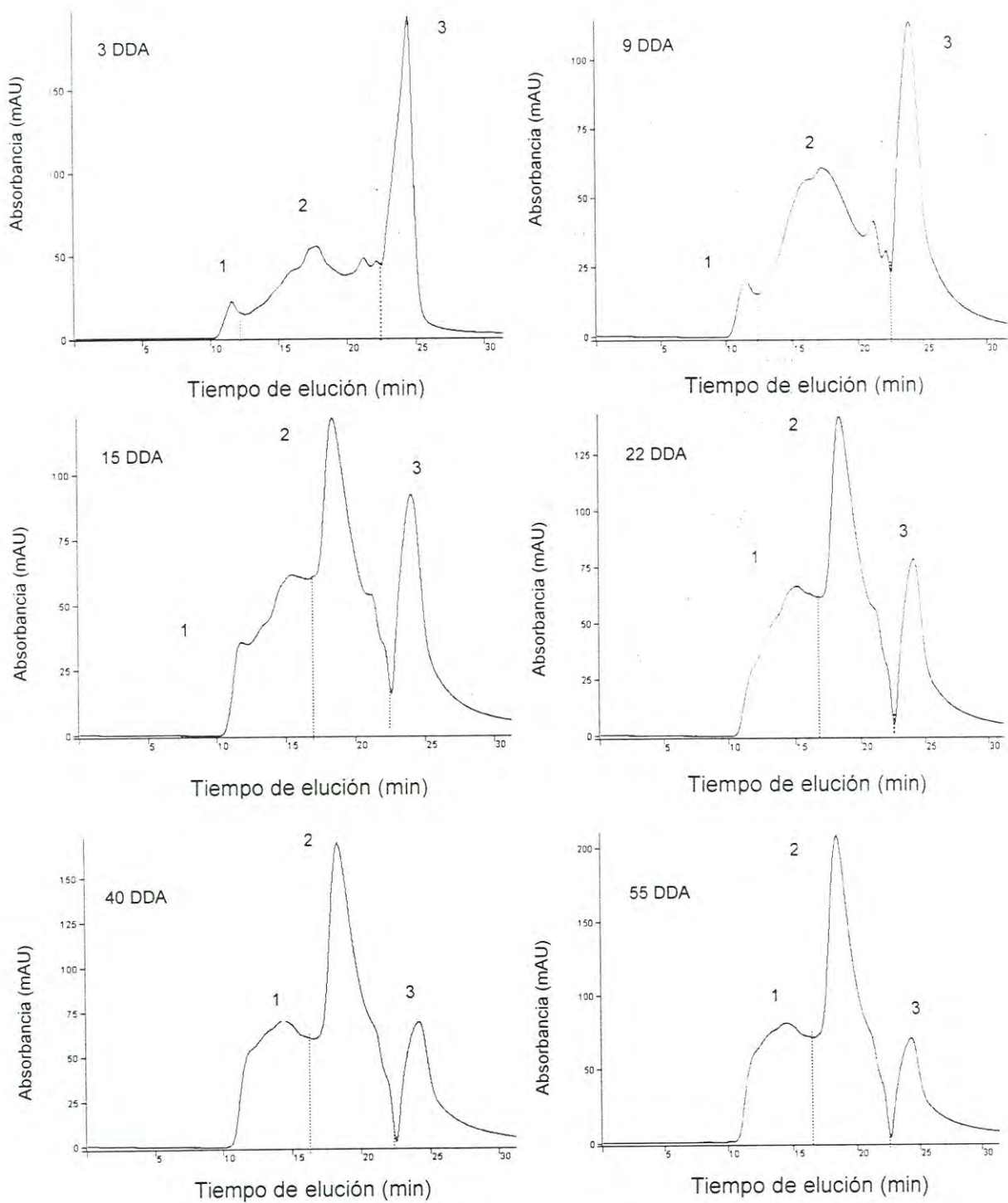


Figura 16. Perfiles cromatográficos de exclusión molecular de proteína total extraída de grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis. (1) Proteína polimérica; (2) gliadinas; (3) albúminas y globulinas.

Tabla 9. Análisis de varianza de la formación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Día después de antesis	7	371.54 *
Error	16	

<sup>1</sup> \* = Significativa a  $p < 0.05$ .

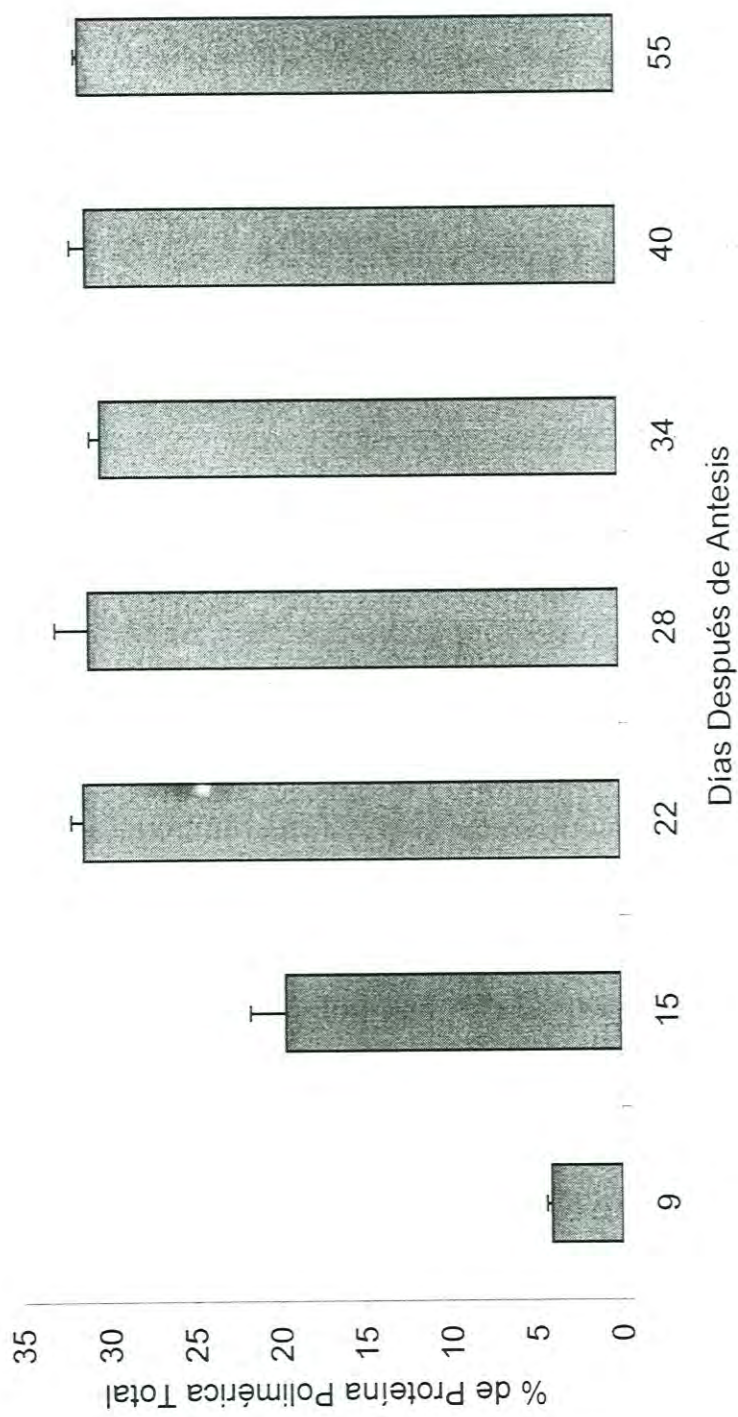


Figura 17. Perfil de acumulación de proteína polimérica total en grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0.05. Las barras indican la desviación estándar.



Tabla 10. Análisis de varianza de porcentaje de proteína polimérica total entre las variedades de trigo Altar y Rayón.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Variedad	1	1.2415 NS
Error	46	

<sup>1</sup> NS = No significativo a  $p < 0.05$ .

de la fracción de proteína polimérica en tamaños moleculares es diferente entre las variedades analizadas (Tabla 11). En las Figs. 18 y 19 se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes a proteína total extraída en 0.5% SDS mas sonicación, y la proteína soluble en 0.5% SDS. La región existente entre las dos curvas correspondientes a proteína total y soluble es la diferencia resultante y constituyen la fracción de proteína insoluble. Resulta clara la diferencia en las fracciones de proteína de alto peso molecular. En la variedad Altar el área correspondiente a la fracción de proteína polimérica insoluble en 0.5% SDS es mucho menor que la de la variedad Rayón. Lo anterior se observa mucho mejor en la Fig. 20, donde se muestran los porcentajes de proteína polimérica insoluble correspondiente a ambas variedades. De igual forma el patrón de acumulación de polímeros mayores es distinto en las variedades analizadas (Figs. 21 y 22). En la variedad Altar (tetraploide) durante los primeros 15 días de desarrollo del grano de trigo esta es prácticamente nula y realmente no se puede observar un patrón de acumulación posterior. Sólo existió un ligero incremento observado el día 28 después de antesis y éste tiende a permanecer constante durante el resto del período de desarrollo del grano de trigo (Fig. 21). Por otro lado, en la variedad Rayón (hexaploide) el patrón de acumulación de proteína polimérica insoluble fue muy distinto (Fig. 22). Los polímeros de proteína de mayor tamaño están presentes desde los tres días después de antesis, y durante los primeros 15 días del proceso de desarrollo del grano tiende a incrementarse lentamente, sin llegar a ser una diferencia significativa. Un aumento significativo ocurre a partir del día 22 después de antesis y a partir de entonces la tendencia en el grano de trigo es a incrementar la fracción de polímeros mayores.

Tabla 11. Análisis de varianza de porcentaje de proteína polimérica insoluble entre las variedades de trigo Altar y Rayón.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Variedad	1	20.43 *
Error	46	

1 \* = Significativo a  $p < 0.05$ .

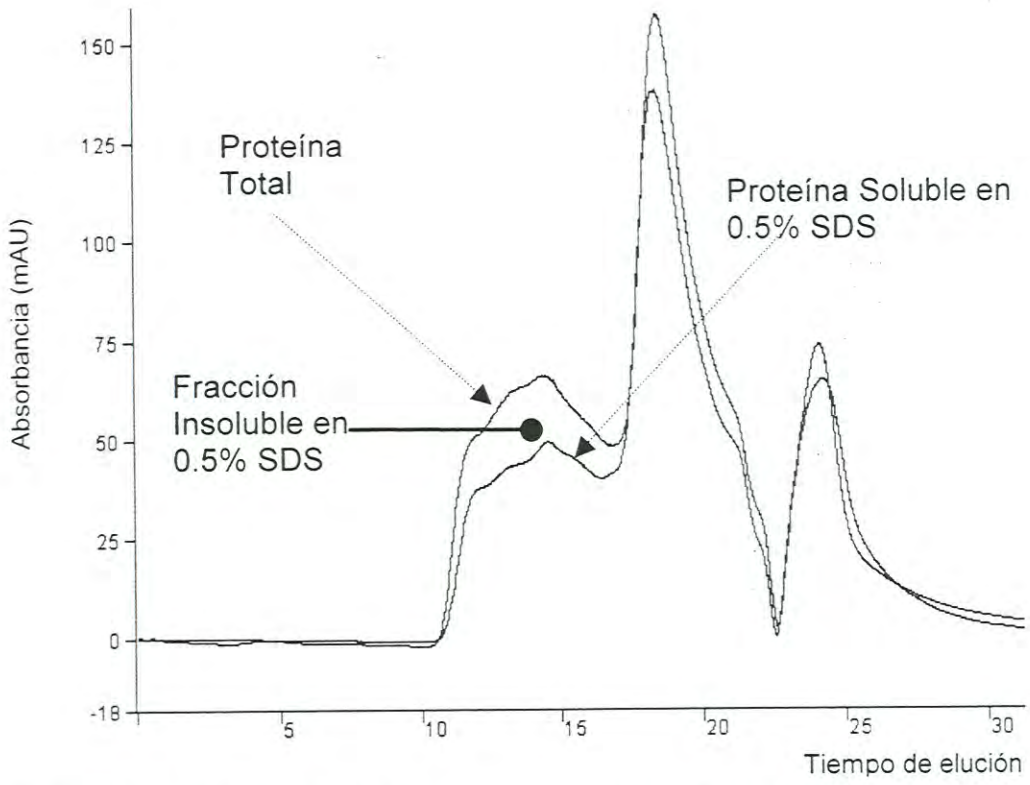


Figura 18. Perfiles cromatográficos de proteína total extraída en 0.5% SDS mas sonicación y de proteína soluble en 0.5% SDS correspondientes a la variedad Altar.

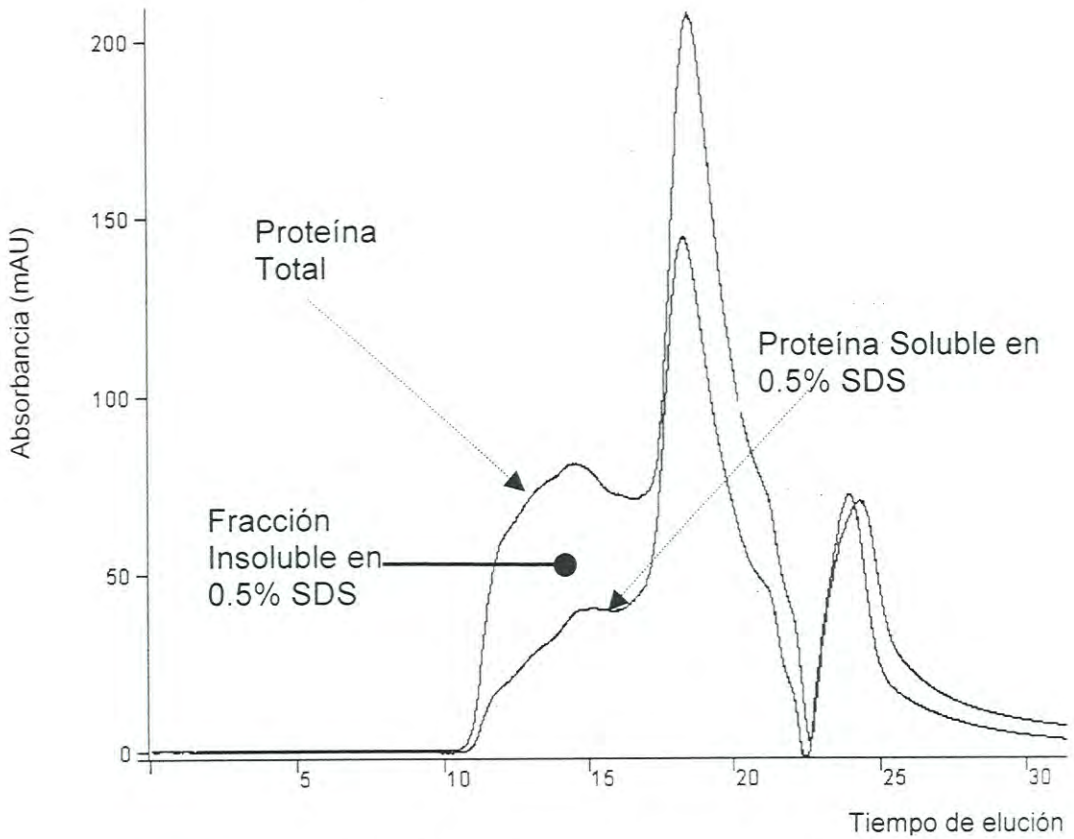


Figura 19. Perfiles cromatográficos de proteína total extraída en 0.5% SDS mas sonicación y de proteína soluble en 0.5% SDS correspondientes a la variedad Rayón.

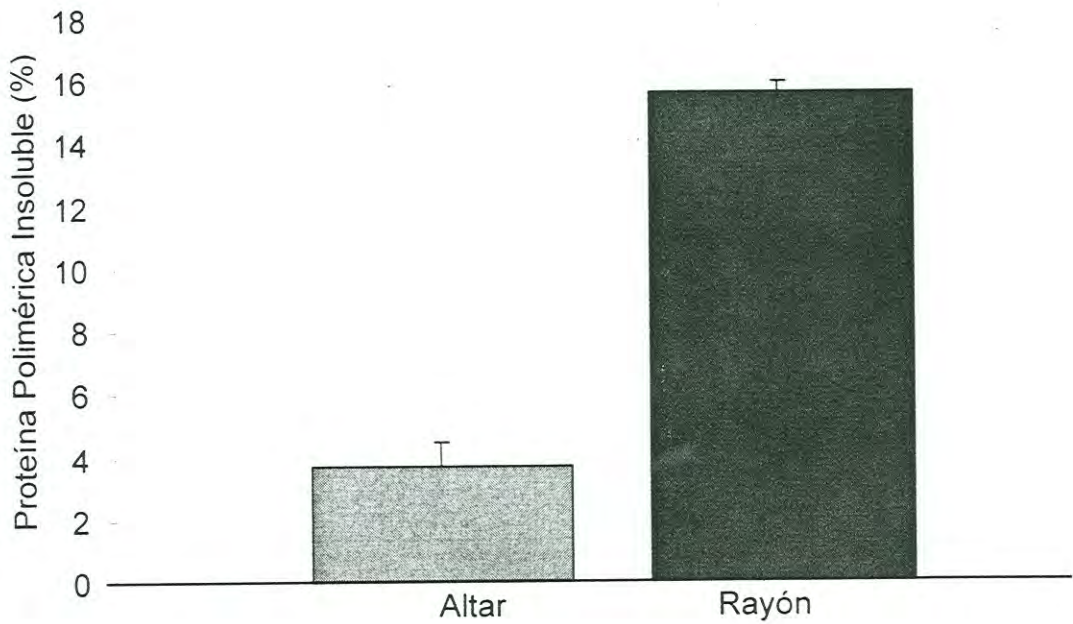


Figura 20. Fracción de proteína polimérica insoluble en 0.5% SDS presente en grano de trigo de las variedades Altar y Rayón correspondientes a grano maduro. Las barras indican la desviación estándar.

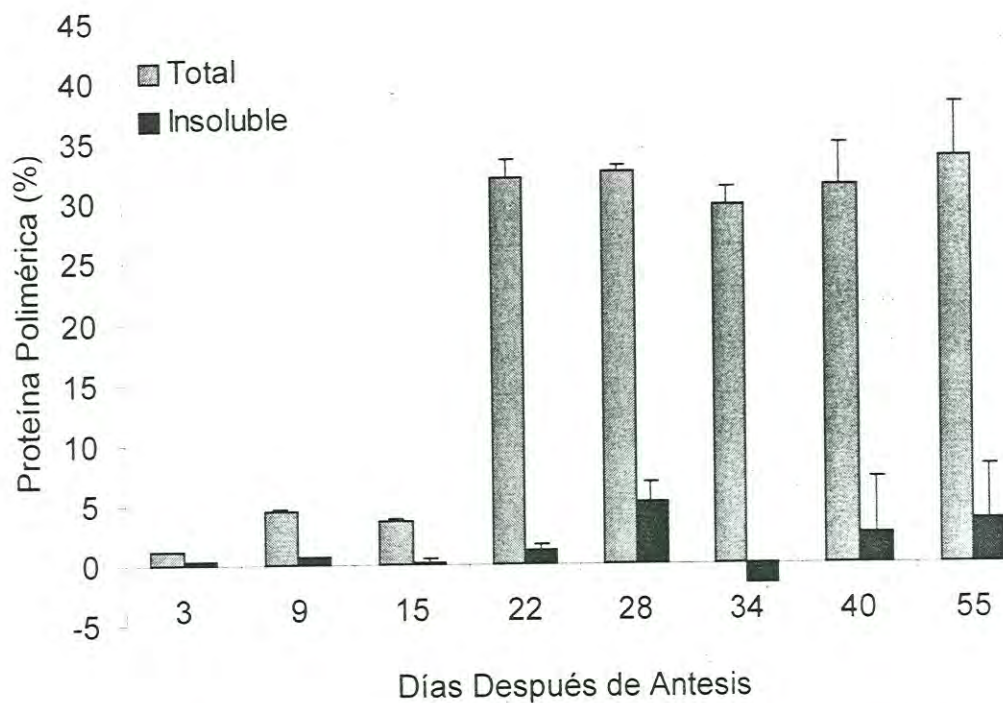


Figura 21. Patrón de formación de proteína polimérica total e insoluble en 0.5% SDS en grano de trigo variedad Altar a diferentes días después de antesis. Las barras indican la desviación estándar.

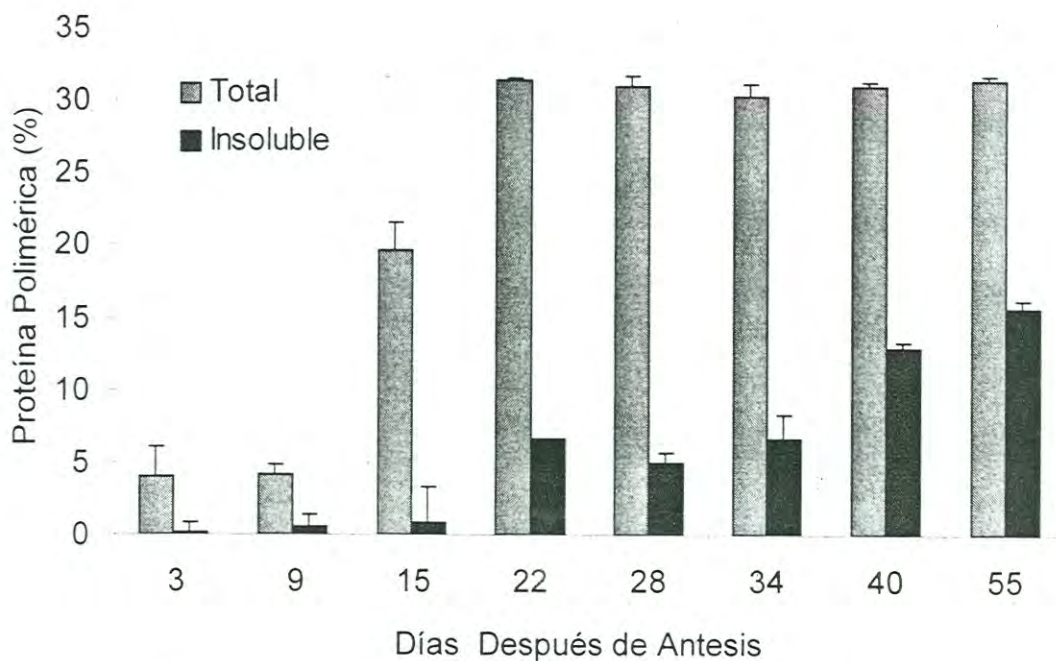


Figura 22. Patrón de formación de proteína polimérica total e insoluble en 0.5% SDS en grano de trigo variedad Rayón a diferentes días después de antesis. Las barras indican la desviación estándar.



Tomando la clasificación de las proteínas del grano de trigo han sido como de almacenamiento (gliadinas y gluteninas) y como metabólicas y estructurales (albúminas y globulinas) (Gupta *et al.*, 1996) basadas en sus funciones metabólicas, se tiene que las proteínas de almacenamiento actúan como una fuente de alimento para el grano durante la germinación y primeras etapas de crecimiento, debido a que disminuyen rápidamente durante la germinación del grano y se acumulan progresivamente durante el desarrollo del mismo (Dell'Aquila *et al.*, 1983).

Como fue encontrado en este trabajo, la presencia de proteínas de almacenamiento (gliadinas y gluteninas) aumenta con el tiempo de desarrollo del grano. La primer fracción presente en el grano de trigo desde los primeros días después de antesis es la correspondiente a las albúminas y globulinas. Esto indica una gran actividad enzimática al inicio del período de llenado del grano. Conforme se desarrolla el grano se van incorporando las proteínas de almacenamiento y la formación de polímeros mayores resulta ser un proceso que inicia una vez que se ha alcanzado cierto nivel de desarrollo del grano. La distribución de proteína polimérica resulta de diversos mecanismos, de acuerdo a lo reportado por Rhazi *et al.*, (2003). Primero, la formación de proteína polimérica extraíble durante la división y elongación celular, dependiendo de la composición genética de subunidades de glutenina y su síntesis, las subunidades de peso molecular alto y bajo podrían formar polímeros covalentes por un mecanismo lento (Rubin *et al.*, 1992; Shani *et al.*, 1993 y Galili *et al.*, 1996). La posición de los enlaces disulfuro podría ser determinada por la conformación y tipo de subunidad de glutenina, por ejemplo, número y posición de grupos sulfhidrilo reactivos (Kasarda, 1999). Esta

agregación podría estar determinada por la presencia de subunidades individuales y podría dirigir a la formación de un modelo de glutenina ramificado (Lindsay y Skerritt, 1999) cuya existencia ha sido confirmada por los resultados de Lindsay y Skerritt (2000). En este modelo, una estructura básica se formaría por la asociación covalente de subunidades de glutenina. Las ramificaciones se formarían por subunidades de glutenina de peso molecular alto y, debido a un residuo adicional de cisteína capaz de formar enlaces disulfuro intermoleculares.

El segundo nivel de agregación es concerniente a la formación de agregados mayores y se refiere a la fracción insoluble de proteína polimérica. Se trata de un proceso de “enredo” estabilizado por puentes de hidrógeno y puentes disulfuro adicionales (por ejemplo, la oxidación de subunidades de glutenina de bajo peso molecular localizadas en las estructuras ramificadas) el cual dirigiría a la formación de una red de proteína (Rhazi *et al.*, 2003). Durante condiciones naturales, este fenómeno ocurre durante la maduración del grano. La disecación del grano promueve la formación de agregados solubles al facilitar la formación puentes de hidrógeno intracatenarios entre las regiones repetitivas de subunidades de glutenina, las cuales pueden liberar glutenina libre y grupos sulfidrilo accesibles en un menor espacio para formar puentes disulfuro intermoleculares adicionales (Rhazi *et al.*, 2003).

En este trabajo se encontraron dos niveles de agregación. El primero comprende la formación de agregados poliméricos de glutenina que son solubilizados en 0.5% SDS, y el segundo, que comprende la fracción insoluble en 0.5% SDS y está formada por agregados proteicos de mayor tamaño (Gupta *et al.*, 1996). Estos niveles de agregación (referidos por Rhazi *et al.*, 2003) fueron

encontrados dependientes de la variedad. Teniendo en cuenta que la diferencia genética en constitución de subunidades de glutenina de peso molecular alto entre ambas estriba en la presencia de las correspondientes al genoma D, se puede implicar su importancia en la formación de polímeros mayores. La variedad Altar (de composición genómica AABB) presentó una concentración de proteína polimérica total similar a la variedad Rayón (de composición genómica AABBDD). Sin embargo, el segundo nivel de agregación referido por Rhazi *et al.*, (2003) y que resulta en la formación de polímeros mayores, ocurre con mayor intensidad en la variedad de trigo Rayón. La contribución del genoma D (en este estudio manifestada por la presencia del par de subunidades 5+10) sobre el grado de polimerización radica en la presencia de grupos sulfidrilo extra disponibles para la formación de mayor número de enlaces intermoleculares en la red de gluten. En las condiciones de este estudio, la tendencia del grano de trigo fue el de incrementar su proporción de proteína polimérica insoluble durante el desarrollo del grano y hasta su madurez. De acuerdo a lo anterior, la etapa de llenado de trigo es determinante en la formación de la estructura de glutenina. Debido a que la glutenina es el centro de las propiedades de calidad de la masa, la formación de polímeros de mayor tamaño determina las propiedades funcionales que ésta tendrá. De tal forma, la importancia de los resultados generados en este trabajo de investigación radica en la determinación del patrón de formación de proteína polimérica total y de proteína polimérica insoluble. Este conocimiento será de mucha utilidad debido a que puede ser empleado para discriminar variedades, así como monitorear el estado general de un cultivo en desarrollo y predecir las

características de calidad que tendría el grano de trigo maduro, lo cual sería muy valioso en programas de generación de nuevas variedades de trigo.

## **Influencia de la Localidad de Cultivo en la Concentración de Proteína Polimérica**

### **Variedad Altar**

Las semillas utilizadas para la siembra en esta variedad provinieron de las localidades de Navojoa y Valle del Yaqui. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteína polimérica total (Tabla 12), así como en proteína polimérica insoluble (Tabla 13), donde se destaca la semilla utilizada para siembra (Progenitor) proveniente de Navojoa (9.92 %) (Fig. 23). Por su parte, la muestra proveniente de Navojoa (Progenie) presentó la mayor concentración de proteína polimérica total (36.66%) ( $P>0.05$ ). También se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de proteína polimérica entre las semillas utilizadas como progenitores. Por ejemplo, la muestra proveniente del Valle del Yaqui, área 2 (progenie), presentó una menor concentración de proteína polimérica total e insoluble en las muestras cosechadas ( $P>0.05$ ). Lo mismo se encontró en la muestra proveniente del Valle del Yaqui, Región 4 ( $P>0.05$ ). La tendencia fue similar para la muestra proveniente de Navojoa, pero a diferencia de las anteriores, la concentración de proteína polimérica insoluble es mayor en la muestra cosechada ( $P>0.05$ ).

Tabla 12. Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica total en muestras de trigo variedad Añtar provenientes de diferentes localidades de cultivo.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Localidad	5	8.51*
Error	12	

1 \* = Significativo a  $p < 0.05$ .

Tabla 13. Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica insoluble en muestras de trigo variedad Altar provenientes de diferentes localidades de cultivo.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Localidad	5	4.12*
Error	12	

1 \* = Significativo a  $p < 0.05$ .

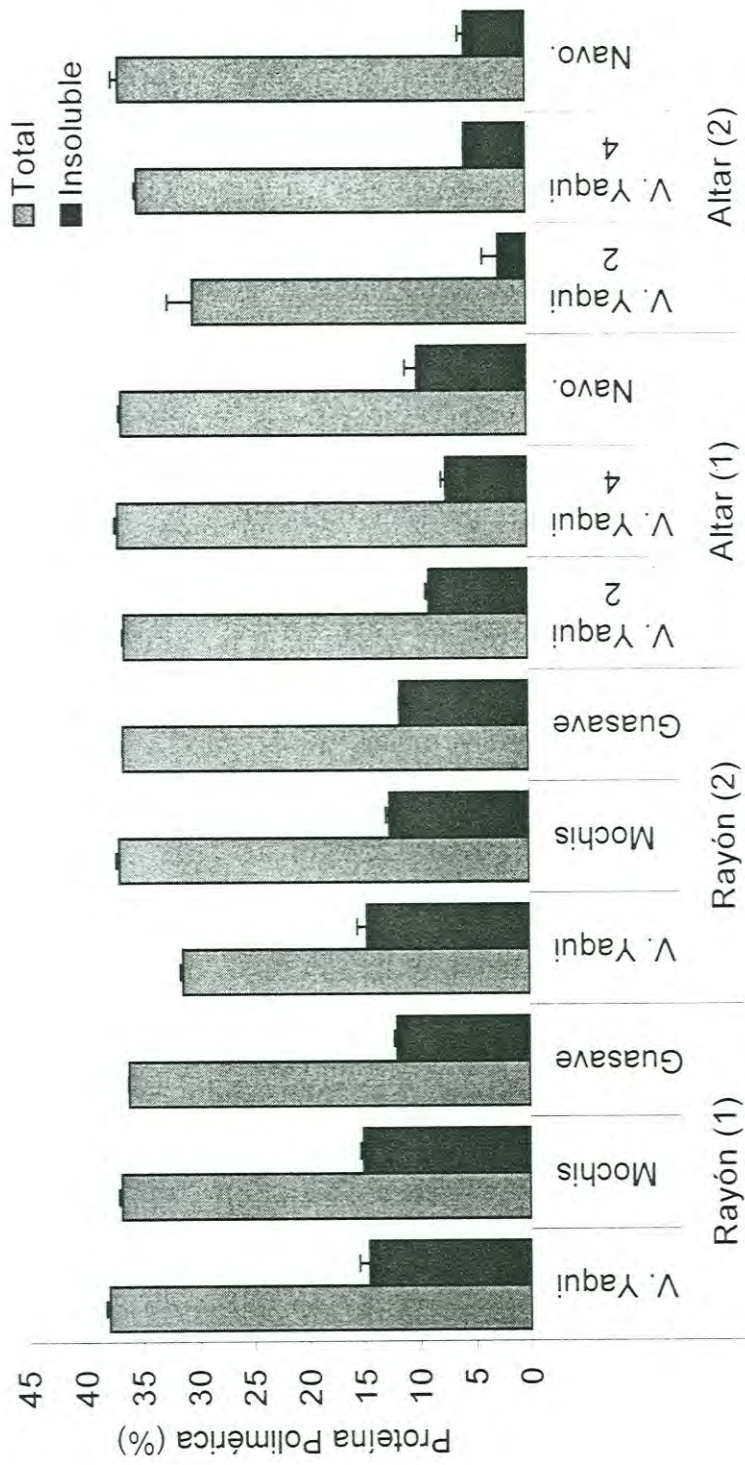


Figura 23. Porcentajes de proteína polimérica total e insoluble en 0.5% SDS en granos de trigo maduros de las dos variedades analizadas provenientes de diferentes regiones agrícolas. (1) Semilla utilizada para la siembra (progenitor). (2) Semilla cosechada (progenie). Las barras indican la desviación estándar.

## Variedad Rayón

Las semillas utilizadas para la siembra (progenitores) en esta variedad provinieron de las localidades de Guasave, Los Mochis y Valle del Yaqui. Entre ellas existieron diferencias significativas de concentración de proteína polimérica total (Tabla 14), siendo la semilla proveniente del Valle del Yaqui la que presentó una mayor concentración. También se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína polimérica insoluble (Tabla 15). En este aspecto la semilla proveniente de Los Mochis presentó la mayor concentración de proteína polimérica insoluble.

Las muestras cosechadas (progenie) tuvieron un comportamiento similar. La semilla proveniente de Los Mochis fue la que mostró mayor concentración de proteína polimérica total (36.91%) mientras que en la proteína polimérica insoluble destacó la semilla proveniente del Valle del Yaqui (14.73%).

Una situación distinta se observó en la muestra proveniente del Valle del Yaqui, la cual presentó una mayor concentración de proteína polimérica total en la muestra original, pero en la muestra cosechada la concentración de proteína polimérica insoluble fue mayor. En el caso de la muestra proveniente de Los Mochis no se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína polimérica total, pero la concentración de proteína polimérica insoluble fue mayor en la muestra original (semilla utilizada para la siembra) ( $P > 0.05$ ) (Fig. 23). En la muestra proveniente de la localidad de Guasave, la semilla utilizada para la siembra contiene mayores concentraciones de ambos tipos de proteína polimérica (total e insoluble) que la muestra cosechada (Fig. 23).



Tabla 14. Análisis de Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica total en muestras de trigo variedad Rayón provenientes de diferentes localidades de cultivo.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Localidad	5	359.53*
Error	12	

1 \* = Significativo a  $p < 0.05$ .

Tabla 15. Análisis de Análisis de varianza del porcentaje de proteína polimérica insoluble en muestras de trigo variedad Rayón provenientes de diferentes localidades de cultivo.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor de F
Localidad	5	24.62*
Error	12	

1 \* = Significativo a  $p < 0.05$ .

## CONCLUSIONES

1. No se detectaron diferencias significativas en rendimientos de cosecha de las diferentes variedades de trigo cosechadas.
2. La formación de proteína polimérica inicia desde los primeros días después de antesis, alcanzando una proporción máxima en el grano a partir del día 22 DDA para luego mantenerse constante hasta la maduración.
3. La formación de subunidades de glutenina de peso molecular alto inició en etapas tempranas del desarrollo del grano de trigo. En este estudio esto fue encontrado a los 15 DDA para la variedad Rayón y 22 DDA para la variedad Altar.
4. La producción de proteína polimérica insoluble es dependiente de la constitución genética de los tipos de trigo empleados en este estudio. La variedad hexaploide sintetiza proteínas poliméricas a etapas más tempranas, mientras que la variedad tetraploide lo hace a etapas más tardías.
5. La presencia del genoma D se relaciona con la formación de polímeros de mayor tamaño, los cuales están relacionados con las características de calidad. De tal forma, la variedad Rayón (AABBDD) produce una mayor proporción de proteína polimérica insoluble que la variedad Altar (AABB).
6. Los estudios preliminares de comparación de proporción de proteína polimérica sugieren que la localidad en que se desarrolla un cultivo podría

afectar la formación y concentración de proteína polimérica total e insoluble en el grano de trigo en desarrollo.

7. El monitoreo de la formación de proteína polimérica total e insoluble durante el desarrollo del grano de trigo proporcionó información valiosa de las características de calidad de la proteína presentes en el mismo. Esta información podría utilizarse en la predicción de características de calidad de un cultivo y podría constituirse en una ayuda fundamental en la generación de nuevas variedades.

## RECOMENDACIONES

1. Continuar con el monitoreo de las variedades de trigo seleccionadas para este estudio, con el objetivo de comparar la variación de contenido de proteína polimérica de un ciclo de cultivo a otro.
2. Realizar análisis de cromatografía de fase reversa a granos de trigo en desarrollo de diferentes variedades para lograr la cuantificación de las subunidades de glutenina de peso molecular alto.
3. El análisis de formación de enlaces disulfuro permitiría obtener una mejor idea del mecanismo de síntesis de proteína polimérica durante el período de llenado del grano de trigo.
4. Continuar con el programa de generación de nuevas variedades de trigo mediante la selección de las muestras que presentaron mayor proporción de proteína polimérica en este estudio, y el empleo de líneas isogénicas con características similares.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, O.D., and Green, F.C. 1989. The Characterization and Comparative Analysis of High-Molecular-Weight Glutenin Genes from Genomes A and B of a Hexaploid Bread Wheat. *Theor. Appl. Genet.* 77:689-700.
- Antes, S. and Wiesser, H. 2001. Effects of High and Low Molecular Weight Glutenin Subunits on Rheological Dough and Bread Making Quality of Wheat. *Cereal Chem.* 78(2):157-159.
- Atwell, W.A. 2001. An Overview of Wheat Development, Cultivation, and Production. *Cereals Food World* 46(2):59-62.
- Axford, D.W.E., McDermott, E., and Redman, D.G. 1978. Small-Scale Test of Bread-Making Quality. *Milling Feed and Fertilizer.* 66:18-20.
- Bean, S.R., and Lookhart, G.L. 2001. Optimizing Quantitative Reproducibility in High-Performance Capillary Electrophoresis (HPCE) Separations of Cereal Proteins. *Cereal Chem.* 78(5):530-537.
- Bekés, F., and Gras, P.W. 1999. In Vitro Studies on Gluten Protein Functionality. *Cereals Food World* 44(8):580-586.
- Benetrix, F., Kaan, F., and Autran, J.C. 1994. Changes in Protein Complexes of Durum Wheat in Developing Seed. *Crop Science.* 34: 462-468.
- Bietz, J.A. 1984. Analysis of Wheat Gluten Proteins by High-Performance Liquid Chromatography. I. Baker's Digest. 58(1):15-32.
- Bietz, J.A., and Simpson, D.G. 1992. Electrophoresis and Chromatography of Wheat Proteins: Available Methods and Procedures for Statistical Evaluation of the Data. *J. Chrom.* 624:53-80.

- ✓ Branlard, G., and Dardevet, M. 1985. Diversity of Grain Protein and Bread Wheat Quality. II. Correlation between High Molecular Subunits of Glutenin and Flour Quality Characteristics. *J. Cereal Sci.* 3:345-354.
- Burnouf, T., and Bietz, J.A. 1998. Rapid Purification of Wheat Glutenin for Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography: Comparison of Dimethyl Sulfoxide with Traditional Solvents. *Cereal Chem.* 66(2):121-127.
- Bushuk, W., and Wrigley, C.W. 1971. Glutenin in Developing Wheat Grain. *Cereal Chem.* 48: 448-455.
- Cinco, M. F.J. 2001. Methodology for Determining Glutenin Subunit Composition of Isogenic Wheat Lines Varying in the Number of High Molecular Weight Glutenin Subunits. Tesis de Doctorado. Kansas State University. Manhattan, Kansas. USA.
- Corella, M. A. G. 2002. Hidrofobicidad Superficial de las Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta de Trigos Panaderos y su Relación con Calidad de Panificación. Tesis de Doctorado. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- ✓ Dachkevitch, T., and Autran, J.C. 1989. Prediction of Baking Quality of Bread Wheats in Breeding Programs by Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem.* 66:448-456.
- Dell'Aquila, A., Colaprico, G., Taranto, G., Carella, G. 1983. Endosperm Protein Changes in Developing and Germinating *T. aestivum*, *T. turgidum* and *T. monococcum* Seeds. *Cereal Research Communication.* 11:107-113.

- Færgestad, E.M., Molteberg, E.L., and Magnus, E.M. 2000. Interrelationships of Protein Composition, Protein Level, Baking Process and the Characteristics of Hearth Bread and Pan Bread. *J. of Cereal Sci.* 31:309-320.
- Galili, G., Shimoni, Y., Giorini-Silfen, S., Levanony, H., Altschuler, Y., and Shani, N. 1996. Wheat Storage Proteins: Assembly, Transport and Deposition in Protein Bodies. *Plant Physiology and Biochemistry.* 34:245-252.
- Gianibelli, M.C., Masci, S., Larroque, O.R., Lafiandra, D., and MacRitchie, F. 2002. Biochemical Characterization of a Novel Polymeric Protein Subunit from Bread Whead (*Triticum aestivum* L.). *J. of Cereal Sci.* 35:265-276.
- Gianibelli, M.C., Larroque, O.R., MacRitchie, F., and Wrigley, C.W. 2001. Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and its Components Subunits. *Cereal Chem.* 78(6):635-646.
- Gil, I.S., and Zárata, G.P. 1998. Métodos Estadísticos. Ed. Trillas. México, D.F. PP. 401-428.
- Gupta, R.B., and MacRitchie, F. 1991. A Rapid One-Step One-Dimensional SDS-PAGE Procedure for Analysis of Subunit Composition of Glutenin in Wheat. *J. Cereal Sci.* 14:105-109.
- Gupta, R.B., Khan, K., and MacRichtie, F. 1993. Biochemical Basis of Flour Properties in Bread Wheats. I. Effects of Variation in the Quantity and Size Distribution of Polymeric Protein. *J. Cereal Sci.* 18:23-41.
- Gupta, R.B., and MacRichtie, F. 1994. Allelic Variation at Glutenin Subunit and Gliadin Loci, Glu-1, Glu-3, and Gli-1 of Common Wheats. II. Biochemical Basis of the Allelic Effects on Dough Properties. *J. Cereal Sci.* 19:19-29.



- Gupta, R.B., Masci, S., Lafiandra, D., Bariana, H.S., and MacRitchie, F. 1996. Accumulation of Protein Subunits and their Polymers in Developing Grains of Hexaploid Wheats. *J. of Experimental Botany* 47:1337-1385.
- Hsam, S.L.K., Kieffer, R., and Zeller, F.J. 2001. Significance of *Aegilopus tauschii* Glutenin Genes on Breadmaking Properties of Wheat. *Cereal Chem.* 78(5):521-525.
- Huebner, F.R., Kaczpowski, J., Bietz, J.A. 1990. Quantitative Variation of Wheat Proteins from Grain at Different Stages of Maturity and from Different Spike Locations. *Cereal Chem.* 67:464-470.
- Kasarda, D.D. 1999. Glutenins Polymers: The in Vitro to in Vivo Transition. *Cereal Foods World.* 44:566-571.
- Kasarda, D.D., King, G., and Kumosinski, T.F. 1994. Comparison of Spiral Structures in Wheat High Molecular Weight Glutenin Subunits and Elastin by Molecular Modeling. Pages 209-220. In: *Molecular Modeling: From Visual Tools to Reality*. T.F. Kumosinski and M.N. Liebman, Eds. ACS Symp. Ser. No. 576. Am. Chem. Soc.: Whashington, D.C.
- Khatkar, B.S., Fidot, R.J., Tatham, A.S., and Schofield, J.D. 2002a. Functional Properties of Wheat Gliadins. I. Effects on Mixing Characteristics and Bread Making Quality. *J. of Cereal Sci.* 35:299-306.
- Khatkar, B.S., Fidot, R.J., Tatham, A.S., and Schofield, J.D. 2002b. Functional Properties of Wheat Gliadins. II. Effects on Dynamic Rheological Properties of Wheat Gluten. *J. of Cereal Sci.* 35:307-313.
- Kruger, J.E., and Marchylo, B.A. 1990. Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Changes in High Molecular Weight

- Subunit Composition of Wheat Storage Proteins during Germination. *Cereal Chem.* 67(2):141-147.
- Laemmli, U.K. 1970. *Nature*, 227, 680 en: Mini-Protean II Electrophoresis Gel. Instruction Manual. Biorad.
- Lindsay, M.P., and Skeritt, J.H. 1999. The Glutenin Macropolymer of Wheat Flour Doughs: Structure-Function Perspectives. *Trends in Food Science and Technology*. 10:247-253.
- Lindsay, M.P., and Skeritt, J.H. 2000. Immunocytochemical Localization of Gluten Proteins Uncovers Structural Organization of Glutenin Macropolymer. *Cereal Chemistry*. 77:360-369.
- MacRitchie, F. 1999. Wheat Proteins: Characterization and Role in Flour Functionality. *Cereal Foods World*. 44:188-193.
- MacRitchie, F., and Lafiandra, D. 2001. Use of Near-Isogenic Wheat Lines to Determine Protein Composition-Functionality Relationships. *Cereal Chem.* 78(5):501-508.
- MacRitchie, F., and Lafiandra, D. 1997. Structure-Function Relationships of Wheat Proteins. In: *Food Proteins and Their Applications*. Srinivasan, Ed. Damodaran & Alain P. Marcel Dekker, Inc. PP. 298.
- Mecham, D.K., Fullington, J.g., and Greene, F.C. 1981. Gliadin Proteins in the Developing Wheat Seed. *J. of Food Sci. and Agriculture*. 32:773-780.
- Miller, T.D. 1992. Estadíos de Crecimiento del Cultivo del Trigo. In: *Better Crops with Plant Food*. Potash and Phosphate Institute, Norcross, GA, USA.
- Moonen J.E., Aukescheepstra, and Graveland, Aris. 1982. Use of the SDS-Sedimentation Test and SDS-Polyacrylamidegel Electrophoresis For

Screening Breeder's Samples of Wheat for Bread-Making Quality. *Euphytica*. 31:677-690.

Nagamine, T., Kai, Y., Takayama, T., Yanagisawa, T., and Taya, S. 2000. Allelic Variation at the Glu-1 And Glu-3 Loci in Southern Japanese Wheats and its Effects on Gluten Properties. *J. of Cereal Science*. 32:129-135.

Nakamura, H., and Fujimaki, H.F. 2002. Specific Glu-D1 Allele Frequency of Japanese Common Wheat Compared with Distribution of Glu-1 Alleles in Chinese Wheat. *Cereal Chem*. 79(4):486-490.

Örnebro, J., Wahlgren, M., Eliasson, A.C., Fido, R.J., and Tatham, A.S. 1999. Adsorption of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -Gliadins on to Hydrophobic Surfaces. *J. of Cereal Sci*. 30:105-114.

Patacchini, C., Madci, S., and Lafiandra, D. 2001. A New Method to Purify Y-Type High Molecular Weight Glutenin Subunits from Wheat. *J. of Cereal Sci*. 34:135-139.

Payne, P.I., and Lawrance, G.J. 1983. Catalogue of Alleles for the Complex Gene Loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for the High-Molecular-Weight Subunits of Glutenin in Hexaploid Wheat. *Cereal Res. Commun*. 11:29-35.

Payne, P.I., Holt, L.M., Jackson, E.A., and Law, C.N. 1984. Wheat Storage Proteins: Their Genetics and Potential for Manipulation by Plant Breeding. *Phils. Trans. R. Soc. London Ser.* 304-395. En: MacRitchie, F., and Lafiandra, D. 1997. Structure-Function Relationships of Wheat Proteins. In: *Food Proteins and their Applications*. Srinivasan, Ed. Damodaran & Alain P. Marcel Dekker, Inc. PP.293-298.

- Payne, P. I., Nightingale, M. A., Krattiger, A.F., and Holt, L.M. 1987. The Relationship between HMW Glutenin Subunit Composition and the Bread-Making Quality of British-Grown Wheat Cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 40:51-65.
- Pomeranz, Y. 1988. Composition and Functionality of Wheat Flour Components. Pages 219-370 in: *Wheat: Chemistry and Technology*. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.
- Popineau, Y., Cornec, M., Lefevbre, J., and Marchylo, B. 1994. Influence of High Molecular Weight Glutenin Subunits on Glutenin Polymers and Rheological Properties of Glutens and Gluten Subfractions of Near-Isogenic Lines of Wheat Sicco. *J. Cereal Sci.* 19:231-241.
- Rhazi, L., Cazalis, R., and Aussenac, T. 2003. Sulfhydryl-disulfide Changes in Storage Proteins of Developing Wheat grain: Influence on the SDS-Unextractable Gluteini Polymer Formation. *J. of Cereal Sci.* 38 (1): 3-13.
- Rubin, R., Levannony H., Galili, G. 1992. Evidence for the Presence of two different types of Protein Bodies in Wheat Endosperm. *Plant Physiology* 99:718-724.
- Sánchez, R.R. 1986. *Genética Elemental y Fitomejoramiento Práctico*. Ed.Limusa. PP.:41-44.
- SAS Institute Inc. 2001. *JMP: A Bussines Unit of SAS*. Version 4.0.4.
- Shani, N., Rosenberg, N., Kasarda, D., and Galili, G. 1993. Mechanisms of Assembly of Wheat High Molecular Weight Glutenins Inferred from Expression of Wild-Type and Mutant Subunits in Transgenic Tobacco. *The Journal of Biological Chimistry.* 12:8924-8930.

- Shewry, P.R., Halford, N.G., and Tatham, A.S. 1992. High Molecular Weight Subunits of Wheat Glutenin. *J. of Cereal Sci.* 15: 105-120.
- Singh, N.K., Donovan, G.R., Batey, I.L, and MacRichtie, F. 1990a. Use of Sonication and Size-Exclusion HPLC in the study of Wheat Flour Protein. I. Dissolution of total Protein in Unreduced Form. *Cereal Chem.* 67:150-161.
- Singh, N.K., Donovan, G.R., Batey, I.L, and MacRichtie, F. 1990b. Use of Sonication and Size-Exclusion HPLC in the study of Wheat Flour Protein. II. Relative Quantity of Glutenin as a Measure of Breadmaking Quality. *Cereal Chem.* 67:161-170.
- Singh, H., and MacRichtie, F. 2001. Use of Sonication to Probe Wheat Gluten Structure. *Cereal Chem.* 78(5):526-529.
- Southan, M., and MacRichtie, F. 1999. Molecular Weight Distribution of Wheat Proteins. *Cereal Chem.* 76(6):827-836.
- Stevenson, S.G., and Preston, K.R. 1996. Flow Field-Flow Fractionation of Wheat Proteins. *J.Cereal Sci.* 23:121-131.
- Tatham, A.S., Mifflin, B.J., and Shewry, P.R. 1985. The Beta-Turn Conformation in Wheat Gluten Proteins: Relationship to Gluten Elasticity. *Cereal Chem.* 62:405-442.
- Tatham, A.S., Drake, A.F., and Shewry, P.R. 1990. Conformational Studies of Synthetic Peptides Corresponding to the Repetitive Region of the High Molecular Weight (HMW) Glutenin Subunits of Wheat. *J. Cereal Sci.* 11:189-200.
- Trautz, D., and Jantsch, P. 2000. Informationen zu Einkorn und Emmer. Beschreibung des Forschungsvorhabens: "Die Einführung von Einkorn

(*Triticum monococcum*) und Emmer (*Triticum dicoccum*) in den Ökologischen Landbau-Andbau, Ertrag, Qualität". Fachbereich Agrarwissenschaften–Fachgebiet Umweltschonende Landwirtschaft. Fachhochschule Osnabrück: Am Krümpel 31;49090 Osnabrück.

Toothaker, L.E., and Miller, L. 1996 . Introductory Statistics. Brooks/Cole Ed. 2nd. Ed. Pacific Grove, CA. USA. PP. 449-480.

Tronsmo, K.M., Færgestad, A., Longva., Schofield, J.D., and Magnus, E.M. 2002. A Study of how Size Distribution of Gluten Proteins, Surface Proteins of Gluten and Dough Mixing Properties Relate to Baking Properties of Wheat Flours. J. of Cereal Sci. 35:201-214.

Ueno, T., Stevenson, S.G., Preston, K.R., Nightingale, M.J., and Marchylo, B.M. 2002. Simplified Dilute Acetic Acid Based Extraction Procedure for Fractionation and Analysis of Wheat Flour Protein by Size Exclusion HPLC and Flow Field-Flow Fractionation. Cereal Chem. 79(1):155-161.

Veraverbeke, W.S., Larroque, O.R., Békés, F., and Delcour, J.A. 2000. In Vitro Polymerization of Wheat Glutenin Subunits with Inorganic Oxidizing Agents. I. Comparison of Single-Step and Stepwise Oxidations of High Molecular Weight Glutenin Subunits. Cereal Chem. 77(5):582-588.

Vereijken, J.M., Klostermann, V.L.C., Beckers, F.H.R., Spekking, W.T.J., and Graveland, A. 2000. Intercultivar Variation in the Proportions of Wheat Protein Fractions and Relation to Mixing Behaviour. J. of Cereal Sci. 32:159-167.

- Vergruggen, I.M., Veraverke, W.S., and Delcour, J.A. 2001. Significance of LMW-GS and HMW-GS for Dough Extensibility: Addition versus Incorporation Protocols. *J. of Cereal Sci.* 33:253-260.
- Wahlund, K.G., Gustavsson, M., MacRitchie, F., Nylander, T., and Wannerberger, L. 1996. Size Characterization of Wheat Proteins, particularly Glutenin, by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *J. of Cereal Sci.* 23: 113-119.
- Waynard, B.J. 2000. Sonochemistry. Pages 17-22 in: *Chemistry*. ACS: Washintong, D.C.
- Weegels, P.L., van de Pijpekamp, A.M., Graveland, A., Hamer, R.J., and Schofield, J.D. 1996. Depolymerization and re-Polymerization of Wheat Glutenin During Dough Processing. I. Relationships between Glutenin Macropolymer Content and Quality Parameters. *J. of Cereal Sci.* 23: 103-111.
- Wesley, I.J., Larroque, O., Osbornet, B.G., Azudin, N., Allen, H., and Skerit, J.H. 2001. Measurement of Gliadin and Glutenin Content of Flour by NIR spectroscopy. *J. of Cereal Sci.* 34:125-133.
- Wieser, H., and Kieffer, R. 2001. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours determined on a Micro-Scale. *J. of Cereal Sci.* 34:19-27.
- Wiesser, H., Antes, S., and Selmeier, W. 1998. Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Cereal Chem.* 27:53-60.
- Wiesser, H., Seilmeier, W., and Kieffer, R. 1994. Relationship between the Amount of Gluten Protein Types and the Rheological Properties of different Wheat

Cultivars. PP.: 141-150 in: *Gluten Proteins*, 1993. Assoc. Cereal Res.:  
Detmold, Germany.

Wrigley, C.W., and Bekés, F. 1999. Glutenin-Protein Formation during the  
Continuum from Anthesis to Processing. *Cereals Food world* 44(8).