

Genética del trigo

F. García Olmedo

Departamento de Bioquímica.
E.T.S. Ingenieros Agrónomos.
Universidad Politécnica de Madrid

Enrique Sárichea-Monge

Departamento de Genética. E.T.S.
Ingenieros Agrónomos.
Universidad Politécnica de Madrid

1. Los cereales. Biología molecular e ingeniería genética

Resumen

El presente artículo revisa sucintamente un conjunto de investigaciones sobre los cereales, realizadas en el Departamento de Bioquímica de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid. En dichas investigaciones se han utilizado técnicas bioquímicas, citogenéticas y de ingeniería genética para el conocimiento básico y la manipulación práctica del conjunto de especies cultivadas denominadas cereales. Los estudios realizados han abarcado los siguientes aspectos principales: purificación y caracterización de proteínas, caracterización y localización cromosómica de genes estructurales y reguladores involucrados en el control genético de la composición bioquímica del tejido, clonaje de genes de plantas en bacterias, y transferencia génica entre especies vegetales. Las aplicaciones prácticas derivadas

hasta ahora incluyen desde métodos para la identificación de especies, variedades y materias primas, a la transferencia de genes de interés agronómico desde especies silvestres a cultivadas. A medio plazo, los avances realizados en la manipulación *in vitro* de genes vegetales serán de utilidad práctica en la aplicación de la ingeniería genética a la mejora vegetal.

Introducción

Un sólo tejido, el endospermo del grano de los cereales (harinas, sémolas, arroz descascarillado, grits de maíz, etc.), ha constituido el sustrato nutritivo sobre el que se han iniciado y desarrollado las grandes civilizaciones. En la actualidad, los cereales cubren más de dos tercios de la superficie cultivada a escala mundial. El trabajo que pretendemos revisar y resumir en el presente artículo se inscribe en el área de aplicación de técnicas bioquímicas, citogenéticas y de ingeniería genética al conocimiento básico y la manipulación práctica de estas importantes cosechas. Nos limitaremos aquí a presentar e ilustrar para un público científico no especializado las investigaciones desarrolladas en nuestro departamento durante los últimos años y remitiremos al lector interesado en un descripción más detallada y rigurosa de dichas investigaciones a otras revisiones aparecidas recientemente (1-5).

Moléculas, genes y mapas genéticos

En términos globales, la composición química del endospermo de

las distintas especies de cereales es muy similar: almidón y otros hidratos de carbono (60-80 %), proteínas (8-15 %), lípidos (1,5-2,0 %), minerales (1,0-1,5 %), vitaminas (E, complejo B), etc. Sin embargo, la variabilidad intra e interespecífica de los componentes incluidos dentro de cada una de las fracciones mencionadas es considerable, especialmente para algunas de ellas, como la de proteínas o, en cierta medida, la de lípidos. La composición química del endospermo de una especie o variedad —lo que podemos denominar su fenotipo molecular— determina en gran medida sus usos potenciales. Así, por ejemplo, el trigo tetraploide es especialmente idóneo para la elaboración de pastas alimenticias, el hexaploide lo es para panificación, y sólo ciertas variedades de cebada son aptas para la elaboración de cerveza.

Las investigaciones sobre la composición bioquímica del endospermo de los cereales han sufrido un cierto retraso en comparación con las relativas a otros alimentos importantes, como la carne o la leche, pero en los últimos años han recibido un gran impulso gracias al esfuerzo de numerosos laboratorios. Estas investigaciones han servido de base para otros estudios, entre los que cabe señalar los relativos a la calidad nutritiva y la calidad tecnológica de este tejido, considerado como alimento o como materia prima, y los referentes al control genético y modificación práctica de su fenotipo molecular, ya sea por técnicas convencionales de mejora o por la

aplicación de la nueva tecnología de recombinación de DNA *in vitro*.

En relación con la calidad nutritiva pueden resaltarse dos problemas importantes: la baja proporción de aminoácidos esenciales, lo que limita severamente el aprovechamiento de la proteína por animales monogástricos y el hombre, en ausencia de otros componentes proteicos en la dieta, y la presencia de factores antinutritivos o tóxicos. En el caso del endospermo de la mayoría de los cereales el aminoácido esencial limitante es la lisina y se han descrito proteínas inhibidoras de la enzima digestiva tripsina y proteínas tóxicas para individuos genéticamente susceptibles a la denominada enfermedad celíaca.

La calidad tecnológica también depende de la composición química. Así, por ejemplo, determinadas variantes genéticas de una proteína de alto peso molecular y la proporción de un tipo concreto de lípidos polares (digalactosildiglicéridos) confieren a la harina de trigo la propiedad de dar un pan esponjoso con un alveolado regular.

Además de por su indudable interés económico, este tejido ha sido activamente estudiado desde un punto de vista básico por diversos laboratorios en relación con el esclarecimiento de problemas importantes de expresión génica y de biología de la diferenciación.

Una parte de nuestro trabajo en los últimos años ha consistido en la caracterización de lípidos y, muy especialmente, de proteínas, tanto de especies cultivadas, tales

como trigo, cebada, centeno y avena, como de especies silvestres relacionadas con éstas (*Agropyron* spp., *Aegilops* spp., etc). Se ha puesto especial énfasis en la purificación y en la determinación de relaciones de homología entre diversas proteínas abundantes de endospermo, investigando composición en aminoácidos, peso molecular, propiedades inmunológicas y, eventualmente, secuencias N-terminales.

Una cuestión crucial, en relación con los problemas básicos antes

esbozados y con las posibles aplicaciones prácticas, es el estudio del control genético de lo que hemos denominado el fenotipo molecular. En este contexto, nuestras investigaciones han cubierto tres aspectos principales: la variabilidad inter e intraespecífica de los distintos componentes, la herencia de las distintas variantes genéticas de los mismos, y la localización cromosómica de los genes que controlan su síntesis. Para el estudio de la variabilidad genética se han analizado por mé-

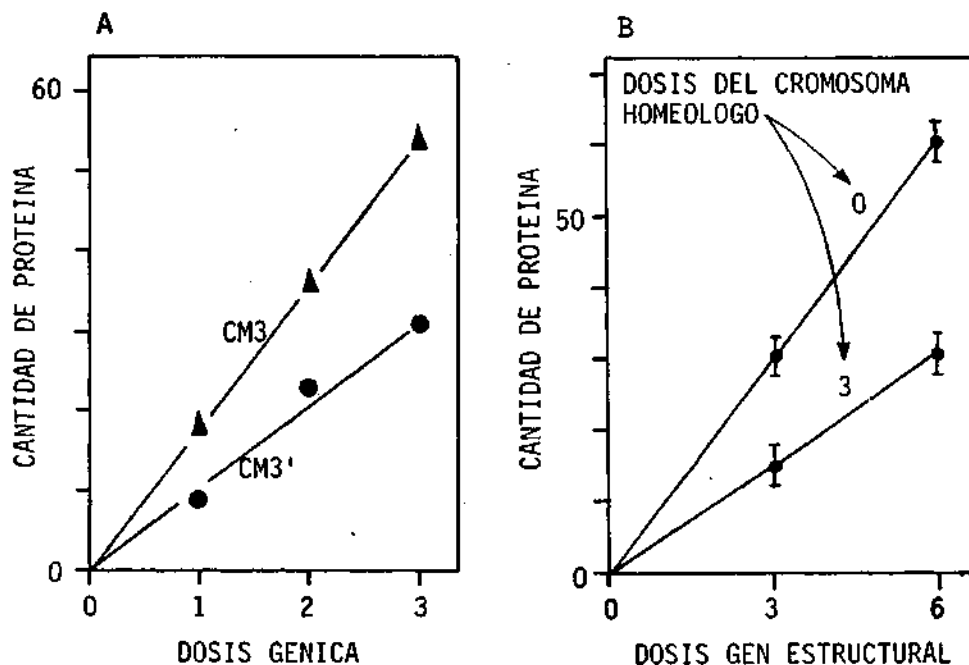


Figura 1. La cantidad de una proteína dada que se acumula en el endospermo del grano aumenta linealmente con el número de copias de su gen estructural. La respuesta a la dosis génica puede ser alterada: A) por elementos genéticos ligados al propio gen (G. Salcedo, C. Aragoncillo, M. A. Rodríguez Loperena, P. Carbonero y F. García Olmedo, *Genetics*, 89: 147-156, 1978); B) por elementos genéticos localizados en un cromosoma distinto del que incluye a dicho gen estructural (C. Aragoncillo, M. A. Rodríguez Loperena, G. Salcedo, P. Carbonero

y F. García Olmedo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 1446-1450, 1978). En A, una variante alélica de la proteína CM3, denominada CM3', se sintetiza y acumula en menor proporción (~50%) que dicha proteína. En B se muestra cómo la respuesta a la dosis génica es afectada por la presencia o ausencia de un cromosoma distinto al gen estructural. El conocimiento del control genético de la acumulación de las distintas proteínas permite la manipulación práctica de la composición final del tejido.

todos electroforéticos e inmunológicos un elevado número de cultivos de las especies cultivadas y de accesiones de las especies silvestres, representativas de las áreas geográficas de cultivo y distribución. Estas prospecciones han contribuido al esclarecimiento de las relaciones evolutivas de las distintas especies y han constituido un paso previo para el estudio del control genético de las distintas variantes, mediante la realización de los cruzamientos adecuados y el análisis de la distribución de dichas variantes en la descendencia.

El endospermo es un tejido altamente especializado que desempeña una función de reserva, siendo el sustrato nutritivo del embrión durante las fases iniciales de la germinación. En el desarrollo del endospermo caben distinguir dos fases bien diferenciadas. En la primera fase, que viene a durar unas dos semanas a partir de la polinización, tiene lugar una proliferación celular muy activa que genera todas las células que han de constituir el tejido maduro. La segunda fase consiste en un proceso de crecimiento celular, que dura hasta la desecación del grano, en el que tiene lugar una activa biosíntesis macromolecular, especialmente de almidón y de proteínas de reserva. En distintos momentos a lo largo del desarrollo del tejido se van activando distintas baterías de genes, según un determinado programa que especifica el tiempo y la intensidad de la expresión.

El análisis bioquímico y genético del tejido maduro ha permitido esclarecer algunos aspectos nota-

bles de la expresión de los genes que codifican para ciertas proteínas mayoritarias. Así, por ejemplo, para todas las proteínas investigadas se ha podido establecer que la cantidad del producto génico (proteína) varía linealmente con el número de copias del gen estructural. Sin embargo, la magnitud de la respuesta a la dosis génica puede ser alterada por factores genéticos localizados en el mismo (cis) o en distinto (trans) cromosoma que el gen estructural.

Con objeto de precisar nuestro conocimiento sobre la expresión génica en este tejido, hemos seguido el proceso de desarrollo, determinando los períodos de expresión y de los distintos grupos de genes, y hemos estudiado la biosíntesis, transporte y deposición de las correspondientes proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto ha implicado la purificación parcial de los RNA mensajeros que codifican a las proteínas y su traducción *in vitro*, la identificación de sus precursores y el estudio de su procesamiento y transporte mediante el uso de marcadores radiactivos y anticuerpos monoespecíficos. Se han esclarecido así aspectos básicos de la biología molecular de estos genes que permiten entender su expresión cuantitativa y que, por otra parte, constituyen una etapa obligada para posteriores manipulaciones prácticas, tales como su clonaje en bacterias o su expresión en otras plantas.

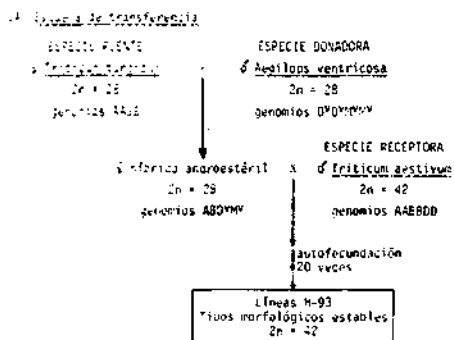
Los considerables avances realizados en el conocimiento de la citogenética de estas especies nos ha permitido un análisis genético del fenotipo molecular que no hu-

biera sido posible de otra forma. La disponibilidad de una completísima gama de líneas aneuploides, es decir, de líneas a las que se ha eliminado, sustituido o añadido distintos cromosomas, brazos o segmentos cromosómicos nos ha facilitado la identificación y localización de los genes estructurales que codifican a las distintas proteínas, así como la de los que regulan o modifican la expresión de dichos genes, y nos ha conducido a la elaboración de mapas genéticos más o menos detallados para estas especies.

Transferencia génica entre especies vegetales

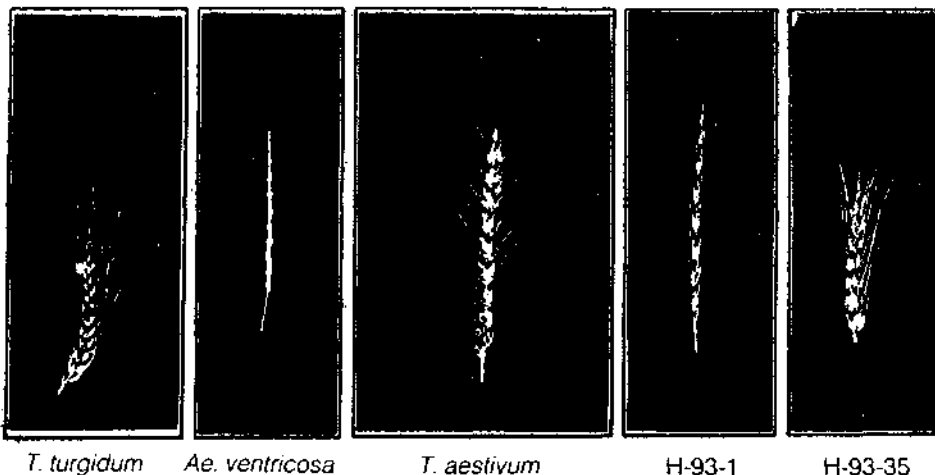
Con anterioridad al reciente desarrollo de las técnicas de transferencia génica *in vitro*, las cuales presentan todavía algunos problemas por resolver, nosotros hemos investigado activamente métodos de transferencia interespecífica e intergenérica, usando al límite la vía sexual. En ciertos casos, la polinización forzada con polen heterólogo (de una especie más o menos distante) produce, aunque con baja frecuencia, cigotos híbridos que dan lugar a embriones de desarrollo precario. Estos embriones pueden ser salvados mediante cultivo *in vitro* obteniéndose plantas híbridas adultas. Las plantas híbridas son en general androestériles y pueden rescatarse fecundándolas con polen homólogo o con polen heterólogo de una especie afín. De este modo es posible transferir genes entre especies más o menos distantes, ya sea directamente o a través de otra especie,

2A. Esquema de transferencia



Tipología de espigas

2B. Morfología de espigas



2C. Constitución cromosómica

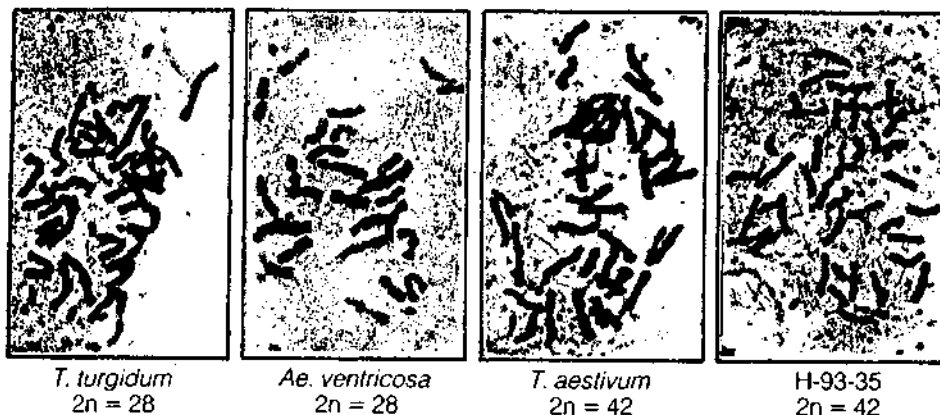


Figura 2. A) Esquema de obtención de las líneas de trigo H-93, portadoras de genes transferidos desde la especie *Aegilops ventricosa*. Del cruzamiento de la especie donadora y la especie puente se obtuvieron 10 individuos androestériles que fueron rescatados con polen de la especie receptora. Por autofecundaciones sucesivas se obtuvieron tipos morfológicos estables, la mayor parte de los cuales resultaron poseer 42 cromosomas (líneas H-93). En estas líneas se investigó la aparición de marcadores bioquímicos codificados por genes de los genomas D^V y M^V de la especie donadora. Debido a homología parcial entre cromosomas del genoma D^V de la especie donadora y del D de la receptora, la frecuencia de genes de D^V en las líneas H-93 fue mayor (30-60 %) que la de genes de M^V (<4 %). Las líneas H-93 fueron entonces ensayadas para resistencia al hongo *Pseudocercospora herpotrichoides* y una alta

proporción de ellas mostraron un alto nivel de resistencia. La línea H-93-70, resistente en estado de plántula y en estado adulto, fue cruzada con el trigo receptor. El híbrido presentó una meiosis regular. En su descendencia y en los retrocruzamientos apropiados, el carácter resistencia se transmitió como determinado por un sólo gen dominante (G. Doussinault, A. Delibes, R. Sánchez-Monge y F. García Olmedo, *Nature*, 303: 698-700, 1983). B) Morfología de las espigas. C) Constitución cromosómica.

que actúa de intermediaria (especie puente). El seguimiento de la transferencia de un gen, segmento cromosómico o cromosoma completo se realiza mediante el uso de marcadores bioquímicos de los cromosomas manipulados y mediante métodos citogenéticos. El conjunto de esta metodología se conoce desde hace tiempo bajo la denominación genérica de *ingeniería cromosómica*.

Usando estas técnicas, hemos estudiado en nuestro laboratorio la transferencia de genes para resistencia a ciertas enfermedades desde especies silvestres a cultivadas. Así, por ejemplo, hemos demostrado la transferencia desde *Aegilops ventricosa* a trigo cultivado, de un gen dominante que determina un alto nivel de resistencia al «mal de pie», enfermedad causada por el hongo *Pseudocercospora herpotrichoides*. Este hongo es responsable de considerables pérdidas de rendimiento en extensas áreas de cultivo de trigo en Europa, América del Norte y del Sur, Australia y Nueva Zelanda. El nivel de tolerancia de los actuales cultivares de trigo es muy bajo y no se había descrito hasta ahora ningún gen de resistencia en ninguna especie. Las líneas resistentes obtenidas pueden utilizarse para convertir en resistentes los culti-

RESISTENCIA A ERYSIYPHE GRAMINIS

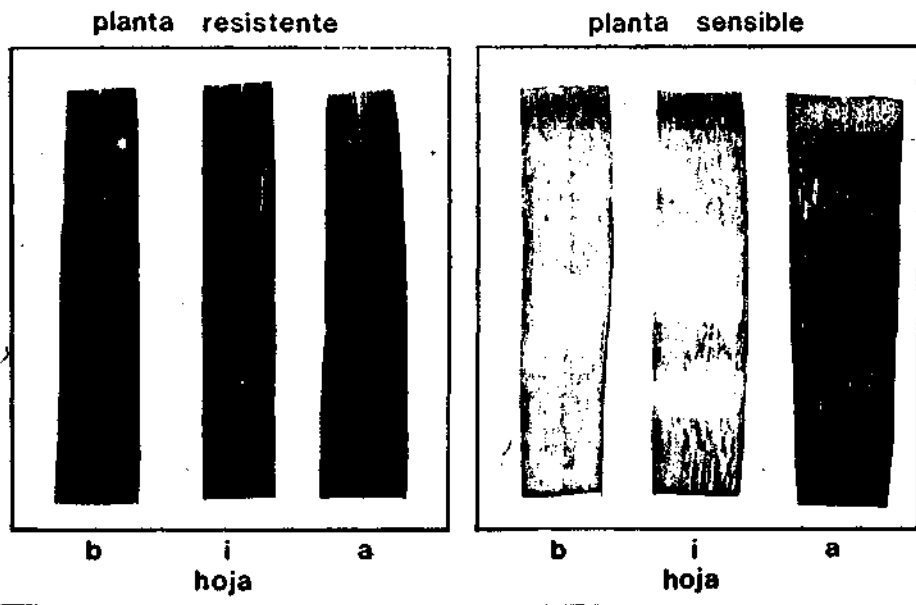


Figura 3. Resistencia al oidio (*Erysiphe graminis*) en trigo por transferencia génica desde *Aegilops ventricosa* según la estrategia esquematizada en la figura 2. En el panel de la izquierda se muestran segmentos de hojas apicales (a), intermedias (i), y basales (b) de una planta de trigo portadora del gen transferido. El panel de la derecha corresponde a una planta sensible, en la que pueden apreciarse las lesiones causadas por el hongo.

vares comerciales actuales. La misma metodología ha sido empleada por nosotros para demostrar la transferencia de un gen para resistencia a *Erysiphe graminis* (oidio) desde *Ae. ventricosa* a trigo para resolver el problema de insertar un pequeño segmento interno de un cromosoma de *Agropyron elongatum*, portador de un gen para resistencia a *Puccinia recondita* (roya de la hoja), en un cromosoma de trigo.

De cebada a patata pasando por intermediarios bacterianos

Gracias a la nueva tecnología para la recombinación de DNA *in vitro* (Ingeniería Genética) es posible hoy transferir, ampliar y expresar información genética de organismos eucarióticos (incluidas las plantas superiores) en bacterias

tales como *Escherichia coli*. Las modernas técnicas de clonaje molecular permiten realizar tal transferencia por dos tipos de métodos diferentes: clonando un DNA transcrito *in vitro* de un RNA mensajero parcialmente purificado (cDNA) mediante un vector plas-

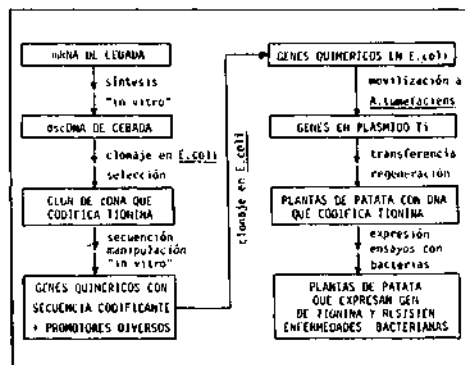


Figura 4. Transferencia por ingeniería genética de un gen que codifica un péptido tóxico para bacterias fitopatógenas, desde cebada a patata pasando por intermediarios bacterianos.

mídico (p. ej. plásmido pBR322), o clonando directamente DNA del genoma vegetal en un vector fágico (p. ej. fago λ). Este clonaje molecular nos ha permitido caracterizar detalladamente los mensajeros genéticos, determinando su secuencia de bases (Adenina, Timina, Guanina, Citosina; ATGC) por métodos enzimáticos y químicos, y constatar la correspondencia entre la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos, determinada separadamente. Además se ha podido deducir la estructura de las proteínas precursoras (productos génicos iniciales) que por un procesamiento posterior dan lugar a las proteínas maduras que se acumulan en el grano.

La disponibilidad de genes de cereales clonados en bacterias nos da la posibilidad de producirlos en cantidades sustanciales de forma pura, de modificarlos *in vitro* y, eventualmente, de reinsertarlos en plantas, usando los vectores adecuados. También debe permitir el estudio de los mecanismos reguladores de la expresión específica y cuantitativa de estos genes.

A título de ejemplo, describiremos brevemente un proyecto en curso en nuestro laboratorio, que consiste en la transferencia a patata, y expresión en ella, de un gen que

codifica una toxina peptídica de cebada con propiedades bactericidas frente a un amplio espectro de bacterias fitopatógenas de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* y *Corynebacterium*. Una vez que se establecieron las propiedades bactericidas de la toxina, que se denomina hor-dotionina, se procedió al clonaje y caracterización de las secuencias de DNA que la codifican (plásmido pBR322 en *E. coli*). Seguidamente se están construyendo por recombinación de DNA *in vitro*, genes quiméricos que poseen las secuencias codificantes de cebada unidas a secuencias reguladoras (promotores) que determinan distintas formas de expresión: constitutiva general o específica de tejido, inducible por lesión, choque térmico, anaerobiosis, etc. Estos genes quiméricos se volverán a clonar en *E. coli* y se transferirán a patata por intermedio de vectores basados en los plásmidos Ti de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Finalmente, habrá que determinar si se produce la síntesis de la toxina en la especie receptora y si se confiere la esperada resistencia a enfermedades bacterianas.

Reconocimientos

El equipo de investigación está constituido actualmente por las siguientes personas: F. García Olmedo y Pilar Carbonero (catedráticos); G. Salcedo, C. Hernández Lucas, R. Sánchez-Monge, J. A. Pintor, A. Delibes, I. López Braña, J. J. López Fando y M. J. Carmona (prof. titulares); A. Lázaro, C. Mañana, P. Rodríguez Palenzuela y M.

Mena (doctorandos); J. García Guijarro y C. Rojas (maestros de laboratorio); D. Lamonedá, A. García Herranz y F. García Arroyo (ayudantes técnicos).

Los trabajos aquí resumidos han sido realizados con ayudas de las siguientes instituciones: U.S.D.A.; I.N.I.A.; Min. Ed y C.; C.A.I.C.Y.T.; F.A.O./I.A.E.A.; Fundación March; Fundación Areces; Caja de Ahorros de Madrid; J.E.N.

Referencias bibliográficas

1. García Olmedo, F., Carbonero, P., Salcedo, G., Aragoncillo, C., Hernández Lucas, C., Paz-Ares, J. y Ponz., F. Chromosomal location and expression of genes encoding low molecular weight proteins in wheat and related species. *Kulturpflanze* 32, 21-32. 1984.
2. García Olmedo, F., Carbonero, P. El control genético de las proteínas del trigo. *Investigación y Ciencia* (Scientific American), 81, 96-104, 1983.
3. García Olmedo, F., Carbonero, P. y Jones, B. L. Chromosomal location of genes that control wheat endosperm proteins. En *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. V, pp. 1-47. Am. Assoc. Cereal Chem. Inc.: St. Paul, MN, U.S.A., 1982.
4. García Olmedo, F., Carbonero, P., Aragoncillo, C. y Salcedo, G. chromosomal control of wheat endosperm proteins. A critical review. En *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*, pp. 555-566. Int. Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 1975.
5. García Olmedo, F., Carbonero, P., Aragoncillo, C., Fernández de Caleyá, R. y Torres, J. V. Expression of homoeologous molecular systems in wheat allopolyploids. En *Heterosis in Plant Breeding*, pp. 51-57. EUCARPIA, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, 1976.