



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

“IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GLUTENINAS COMO MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA
CALIDAD PANADERA EN DOS VARIEDADES DE TRIGO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL.

GENERACIÓN 37

PRESENTA:

EMMANUEL SEGUNDO URBINA

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

ASESORES:

DRA. DORA LUZ PINZÓN MARTÍNEZ

DRA. MARÍA DOLORES MARIEZCURRENA BERASAIN

CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS”, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

JULIO 2017.



AGRADECIMIENTOS

A mi madre por brindarme su cariño y su apoyo incondicional en todo momento, por sus consejos, por sus valores, por enseñarme que la humildad esta antes que nada. A mi padre, a pesar de nuestra distancia siento que estás conmigo, por el valor mostrado para salir adelante y sé que este momento es tan especial para ti como lo es para mí. A mis hermanos (José Manuel, Xochitl, Fidel, Maria Guadalupe, Francisco y María), por su apoyo contante.

A mis asesoras Dra. Dora Luz Pinzón Martínez y a la María Dolores Mariezcurrena Berasain por su apoyo y paciencia, por sus consejos y compromiso, por ser la base de este proyecto para lograr este proyecto.

A Jessica Cayetano Salinas por estar ahí siempre que te necesite por darme tu apoyo y no dejarme caer.

A mis compañeros de laboratorio de calidad de los productos agropecuarios, por sus guiarme y brindarme sus consejos y experiencias.

DEDICATORIAS

GRACIAS A MI FAMILIA, principalmente mis padres, hermanas y mi novia por estar a mi lado, su apoyo incondicional, por sus consejos, sus valores, por el ejemplo de perseverancia y constancia que me han brindado cada día y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor. Agradezco el sacrificio y esfuerzo constante para lograr este objetivo el cual también es suyo.

A MIS AMIGOS por el apoyo mutuo durante nuestra formación profesional así como en los momentos difíciles, por sus consejos, tiempo y cariño.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. JUSTIFICACIÓN	5
V. REVISIÓN DE LITERATURA	6
5.1 El trigo y su cultivo en el mundo	6
5.2 Origen y distribución	6
5.3 El trigo en México	7
5.3.1 Clasificación de los trigos en México	7
5.4 Planta de trigo	8
5.4.1 Morfología	9
5.4.2 Fenología del cultivo de trigo	9
5.5 Calidad industrial	10
5.5.1 Calidad panadera	10
5.5.2 Dureza del grano	11
5.5.3 Proteína	11
5.5.4 Gluten	12
5.6. Clasificación de las proteínas del gluten de trigo con base en su solubilidad y funcionalidad	13
5.6.1. Clasificación de las proteínas con base en su solubilidad	13
5.6.2 Clasificación de las proteínas con base en su funcionalidad	14
5.6.3 Gluteninas	17
5.7 Marcadores bioquímicos	17

5.7.1 Marcadores bioquímicos para calidad panadera.....	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Ubicación del sitio experimental.....	20
6.2 Material vegetativo.....	20
6.3 Extracción de proteínas (Gluteninas).....	20
6.4 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry <i>et al.</i> , (1951).	24
6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	25
6.5.1 Electroforesis.....	26
6.5.2 Reactivos para los geles de Electroforesis SDS-PAGE de gluteninas.....	26
6.5.3 Elaboración del gel separador.....	27
6.5.5 Elaboración del gel concentrador.....	27
6.5.6 Corrida del gel SDS-PAGE.....	28
6.5.7 Teñido y desteñido del gel.....	28
6.6 Análisis de los geles.....	29
6.7 Diseño experimental.....	30
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 Cuantificación de proteínas (gluteninas).....	31
7.2 Caracterización de GAPM y GBPM.....	31
7.3 Efecto en la calidad panadera por alelo y por combinación.....	33
VIII CONCLUSIÓN	36
IX SUGERENCIAS	37
X. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de trigo según el contenido de gluten.....	8
Cuadro 2. Control genético de las gluteninas (GAPM y GBPM).....	13
Cuadro 3. Clasificación de las proteínas del gluten con base en su solubilidad y funcionalidad.....	14
Cuadro 4. Clasificación de las proteínas del trigo con base en su funcionalidad.....	16
Cuadro 5. Alelos relacionados con calidad panadera.....	19
Cuadro 6. Buffer TRIS-HCl 0.08M, pH 8.0 (500 mL).....	21
Cuadro 7. Solución muestra para extracción de gluteninas, pH 6.8.....	21
Cuadro 8. Solución de muestra para extracción de gluteninas, pH 8.0.....	21
Cuadro 9. Buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.0.....	22
Cuadro 10. Gel de corrimiento 15%.....	25
Cuadro 11. Gel de aplicación 4.8%.....	25
Cuadro 12. Solución ácido tricloroacético.....	29
Cuadro 13. Alelos correspondientes al loci <i>Glu 1</i> y <i>Glu 3</i> , de las variedades utilizadas como Marcador Molecular.....	30
Cuadro 14. Concentración media de las muestras de proteína (gluteninas).....	31
Cuadro 15. Alelos y patrones genéticos de las subunidades de GAPM y GBPM en las	

variedades de trigo y en los testigos..... 33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo para la extracción de gluteninas (Singh <i>et al.</i> , 1991; Peña <i>et al.</i> , 2004).....	23
Figura 2. Curva estándar de la solución patrón de albúmina sérica de Bovino (1 mg/mL) para la cuantificación de gluteninas.....	24
Figura 3. Patrón de Bando de geles en SDS-PAGE para subunidades de GAPM y GBPM en las variedades RSM-Norman F-2008 y Matchett F-2011.....	32

RESUMEN

Las propiedades viscoelásticas y de fuerza de la masa de trigo, se encuentran principalmente relacionadas con la composición de gluteninas, las cuales, permiten sugerir una clasificación de los trigos en base a las características de tales proteínas. Los patrones genéticos que estas biomoléculas presentan, se han relacionado con diversos aspectos de la calidad panadera y del uso industrial de los materiales. Igualmente, estas proteínas han permitido clasificaciones de calidad, propuestas por Payne *et al.*, (1983) y Gupta y Shepherd, (1992). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar dos variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) Matchett F-2011 y RSM-Norman F-2008, para identificar la distribución de los loci *Glu-1* y *Glu-3* (gluteninas de alto y bajo peso molecular, respectivamente) relacionados con calidad panadera y sugerir su vocación industrial. Se identificaron 13 alelos diferentes en ambas variedades. Para el locus *Glu A1* (GAPM) los alelos encontrados fueron 2* (*Glu A1b*) y 1 (*Glu A1a*). Para *Glu-B1* (GBPM), 7+9 (*Glu-B1b*) y 17+18 (*Glu-B1i*) y del locus *Glu D1d*, 5+10. Para GBPM del locus *Glu A3*, se encontraron los alelos *c* y *d*; para el locus *Glu B3* los alelos *g* y *h* y el alelo *b*, para *Glu D3*. Los patrones genéticos formados para RSM-Norman F-2008 (*Glu A1b*, *Glu-B1c*, *glu-D1d*; *Glu-A3c*, *Glu-B3g*, *Glu- D3b*) y Matchett F-2011 (*Glu A1a*, *Glu-B1i*, *glu-D1d*; *Glu-A3d*, *Glu-B3h*, *Glu- D3b*) se han reportado para masas de gluten fuerte, excelente extensibilidad y aptas para la industria panadera mecanizada, principalmente por alelo *Glu-B3h*, indicado como un mejorador de masas débiles. Tales combinaciones, son reportadas con puntuaciones de 9 y 10 y de calidad moderada y alta. Así, se identificaron y analizaron los perfiles alélicos de GAPM y GBPM relacionados con calidad panadera en RSM-Norman F2008 y Matchett F2011 y se sugieren como trigos de gluten fuerte aptos para la industria panadera.

Palabras clave: Gluteninas, patrón genético, calidad panadera, trigo.

ABSTRACT

Viscoelastic and Strength wheat dough are mainly related to glutenin composition, which suggests a wheat classification based on those proteins. These genetic patterns present several bakery quality and industrial uses alleles. Then, these proteins allowed quality classification proposed by Payne *et al.*, (1983) and Gupta and Shepherd (1992). Therefore, the main objective of the present research was to study two advanced wheat lines (*Triticum aestivum* L.), Matchett F-2011 and RSM-Norman F-2008 to identify bakery quality of *Glu-1* and *Glu-3* (HMWG and LMWG glutenins, respectively) alleles distribution in order to suggest their possible industrial use. Thirteen different alleles were identified in both varieties. For *Glu A1* locus, 2 * (*Glu A1b*) and 1 (*Glu A1a*) alleles were found and for *Glu-B1* loci, 7+9 (*Glu-B1b*) and 17+18 (*Glu-B1i*) were also found together with *Glu D1d* locus (5+10). For GBPM, *Glu A3* locus, the alleles *c* and *d* were found; as well as for the *Glu B3*, the alleles *g* and *h*, and the allele *b*, for *Glu D3* were found. RSM-Norman (*Glu A1b*, *Glu-B1c*, *glu-D1d*; *Glu-A3c*, *Glu-B3g*, *Glu-D3b*) and Matchett F-2011 (*Glu A1a*, *Glu-B1i*, *glu-D1d*; *Glu-A3d*, *Glu-B3h*, *Glu- D3b*) genetic patterns have been reported for strong gluten, high extensibility and suitability for industrial bakery, especially for *Glu-B3h* allele presence well as a weak dough improvement. These allele combinations are reported with 9 and 10 score and high and moderate quality classes. Finally, HMWG and LMWG alleles related to bakery quality were identified and analyzed in RSM Norman F2008 and Matchett F2011 wheat varieties, which are suggested as strong gluten and good candidates for industrial bakery.

Key words: Glutenin, genetic patterns, bakery quality, wheat.

I. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L) es el cereal de mayor importancia y el segundo grano básico para la alimentación mundial. Se produce extensivamente en el mundo por su importancia social y económica (Mondragón, 2006). En la actualidad en México, el trigo es el tercer cultivo de mayor importancia, después del maíz y el frijol. Este cereal se cultiva en más de 20 Estados de la República Mexicana. La calidad de grano es importante para los productores por las características que demanda el mercado. Por estas razones, la calidad adquiere mayor importancia en los programas de mejoramiento del trigo. Sobre todo en estos tiempos, en que México ha adoptado una economía de libre mercado y existe una demanda real de variedades de trigo que ofrecen la calidad requerida por la industria de alimentos de este cereal. Incrementar el potencial de rendimiento sin afectar la calidad de procesamiento es difícil, particularmente, por el hecho de que los aumentos en el rendimiento van acompañados generalmente por una disminución de contenido de proteína y consecuentemente, por una reducción de la calidad de panificación. Sin embargo, la producción global del trigo, se ha visto amenazada tanto por el cambio climático, como por el aumento en la demanda de las empresas harineras, debido al crecimiento de la población (Peña *et al.*, 2007). La parte proteica de este grano se denomina gluten y está compuesto principalmente por gliadinas y gluteninas. Diversos estudios han demostrado que las propiedades viscoelásticas de la masa de trigo se relacionan con la composición de estas proteínas. De las cuales, las gluteninas se consideran como las que tienen mayor influencia sobre dichas características. Por lo tanto, el presente proyecto propone caracterizar y analizar el perfil polimórfico de gluteninas presentes dos líneas avanzadas sembradas en el Valle de Toluca. Para lo cual, se siguió el método de Singh *et al.*, (1991) y Peña *et al.* (2004) basados en la diferente solubilidad de dichas proteínas. Para lograr visualizar estas

proteínas, se usó la electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar los polimorfismos de gluteninas (*Glu*) de variedades de trigo Matchet F-2011 y RSM-Norman F-2008, como marcadores bioquímicos de calidad panadera.

Objetivos específicos

Identificar los alelos de gluteninas presentes en las líneas Avanzadas de trigo mediante electroforesis SDA-PAGE.

Analizar los polimorfismos de gluteninas encontrados en las líneas avanzadas de trigo y relacionarlos con la calidad panadera o su posible uso industrial.

III. HIPÓTESIS

En las dos variedades de trigos Matchett F-2011 y RSM-Norman F-2008 sembrados en San Miguel Chapultepec, se encuentran los alelos *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*, relacionados con parámetros de calidad panadera.

IV. JUSTIFICACIÓN

El trigo es uno de los tres cereales más producidos globalmente, junto con el maíz y el arroz, es el más ampliamente consumido por el hombre desde la antigüedad. Este grano, es utilizado para una gran variedad de productos alimenticios y su cultivo puede producirse en diferentes regiones del país, debido a la gran diversidad de sus variedades, adaptables a climas templados y fríos. Lo cual, es una de las mayores ventajas para aumentar la producción en el Valle de Toluca.

La calidad del trigo es uno de los caracteres más complejos y es controlado principalmente por factores genéticos, junto con los factores ambientales, tales como el suelo, el clima, las técnicas de cultivo y almacenamiento. Los genes o variaciones genéticas (alélicas) de las proteínas del gluten, se han utilizado como marcadores moleculares o bioquímicos, para desarrollar genotipos que posean características de procesamiento y calidad de panificación más específica a la demanda de la industria.

La producción de trigo harinero en México no cubre la demanda interna, por lo que es necesario recurrir a la importación de más del 50% del trigo utilizado por la industria para elaborar alimentos. Por lo consecuente, el utilizar marcadores bioquímicos para calidad panadera puede ayudar a caracterizar líneas avanzadas e incrementar su producción. Por lo tanto, estas herramientas pueden fortalecer las evaluaciones agronómicas, con el fin de asistir en la selección de presuntos genotipos que puedan satisfacer las necesidades agronómicas del Estado de México.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 El trigo y su cultivo en el mundo

Trigo (*Triticum* spp.) es el término que designa al conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, que pertenecen al género *Triticum*. Son plantas anuales de la familia de las Gramíneas, ampliamente cultivadas en todo el mundo. *Triticum aestivum* L. (variedad mejor conocida como trigo harinero) es la especie más cultivada a nivel mundial. A partir de éste, se elaboran harinas con características apropiadas para la elaboración de pan. Este trigo, comprende diferentes variedades que son adaptadas a una amplia variedad de ambientes agroecológicos, lo cual es una característica favorable para esta variedad (Riquelme y Espitia, 2010).

5.2 Origen y distribución

El trigo es uno de los cereales que más aparecen en la literatura occidental, incluso en la biblia es citado hasta 40 veces, como en la parábola del sembrador donde se hace alusión a sus bondades. Su origen, se remonta a la antigua Mesopotamia: las evidencias más antiguas provienen de Siria, Iraq, Turquía y Jordania. Existen hallazgos de restos de grano de trigo que datan del año 6700 a. C. Fue introducido en México por los españoles en el año 1520 y llevado a las colonias (Gómez *et al.*, 2007). El trigo comenzó a domesticarse alrededor de los 10,000-15,000 años antes de Cristo en el Oriente Próximo, en la región comprendida entre el Tigris y el Éufrates. De lo cual, resultó de los primeros asentamientos de grupos humanos y determinó la evolución de los hombres de la fase cazador-recolector a la de agricultor (Bozzini, 1988).

5.3 El trigo en México

El cultivo de trigo en México alcanza un valor de 12 mil mdp, cifra que lo coloca como el 10° cultivo más importante, al contribuir con el 2.9% del valor de la producción agrícola. Después de la crisis alimentaria mundial de 2007 y 2008, tanto los precios como la producción en México disminuyeron, motivados por esta crisis. Entre 2011 y 2013, la superficie promedio dedicada a este cereal, alcanzó 660 mil hectáreas, con un volumen de producción de 3.4 millones de toneladas anuales. Este cereal se cultiva en 23 estados de la República concentrándose en la zona norte y noreste del país, principalmente Sonora, Baja California, Guanajuato, Michoacán, Chihuahua y Tlaxcala con el 89% del volumen. Los precios internacionales del trigo se incrementaron en 2012, debido a las sequías en Australia y EEUU. Así como al peor invierno que se vivió en Rusia en dos décadas, que provocaron una caída en la oferta mundial. Debido a lo anterior, el precio en México aumentó en cerca del 40% entre julio de 2011 y noviembre de 2012. Hacia 2013, una producción mundial más abundante disminuyó la presión sobre las cotizaciones, que cayeron entre 20-30%. Al mes de marzo de 2014, los precios se han mostrado volátiles y al alza, debido entre otras cosas, a la crisis en Ucrania y a factores climáticos adversos en algunas regiones productoras, aunque no se han disparado a los niveles mostrados en 2012 (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, 2014).

5.3.1 Clasificación de los trigos en México

En México, los trigos se clasifican en cinco grupos de acuerdo al tipo de gluten y sus usos, los cuales se muestran en el Cuadro 1. Esta clasificación, permite comercializar la producción nacional de acuerdo con los diferentes tipos de trigo que requiere el molinero. Una empresa puede preparar sus mezclas a partir de diferentes variedades, para producir harinas con usos industriales específicos y así, satisfacer las características de procesamiento necesarias en la fabricación de pan, galletas, pasteles y tortillas (Salazar, 2000).

Cuadro 1. Clasificación de trigo según el contenido de gluten

Trigo	Tipo de gluten	Textura de grano endospermo	Usos
Grupo 1	Fuerte (muy elástico) y extensible	Duro a semi duro	Industria mecanizada, mejorador de trigos debiles
Grupo 2	Medio fuerte (elástico) extensible	Duro a semiduro	Semi mecanizado, mejorador de trigos con gluten muy fuerte.
Grupo 3	Débil (Ligeramente elástico) y extendible	Suave (blando)	Para la panificación artesanal.
Grupo 4	Medio y tenaz (no extensible)	Duro a semiduro	No es panificable por su alta tenacidad, es utilizado para la industria pastelera
Grupo 5	Fuerte, tenaz y corto (no extensible)	Grano cristalino	No es panificable, industria de pastas alimenticias

CANIMOLT, 2014.

5.4 Planta de trigo

La planta de trigo requiere de ciertos aspectos para su desarrollo, tales como:

- **Clima:** Requiere un rango de temperatura 3 - 33 °C, y una temperatura óptima entre 10 y 25 °C.
- **Humedad:** Requiere una humedad relativa entre 40 y 70%, desde el espigamiento hasta la cosecha es la época que tiene mayores requerimientos en este aspecto, ya que exige una humedad relativa entre el 50 y 60% y un clima seco para su maduración.
- **Agua:** Este cereal tiene bajos requerimientos de agua, ya que se puede cultivar en zonas donde se registran precipitaciones entre 25 y 2800 mm³ anuales. Aunque el 75% del trigo crece entre 375-800 mm³ al año. La cantidad óptima para este cultivo es de 400-500 mm³/ciclo.

- Suelo: Los suelos óptimos para su crecimiento son profundos, fértiles, y con un pH entre 6.0 y 7.5 (SAGARPA, 2010).

5.4.1 Morfología

Las partes de la planta de trigo se pueden describir de la siguiente manera:

Raíz. El trigo posee una raíz fasciculada o raíz en cabellera, es decir, con numerosas ramificaciones, alcanzan en su mayoría una profundidad de 25 cm. Algunas de ellas alcanzan hasta un metro de profundidad.

Tallo: El tallo del trigo es de tipo herbáceo. Es una caña hueca con 6 nudos que se alargan hacia la parte superior, entre 0.5 a 2 m de altura y es poco ramificado.

Hojas: Las hojas del trigo tienen una forma linear-lanceolada (alargadas, rectas y terminadas en punta) con vaina, lígula y aurículas bien definidas.

Inflorescencia: La inflorescencia es una espiga compuesta por un raquis (eje escalonado) o tallo central de entrenudos cortos. Sobre el cual, van dispuestas de 20 a 30 espiguillas en forma alterna y laxa o compacta. Cada una contiene nueve flores, la mayoría de las cuales abortan, rodeadas por glumas, glumillas o glumelas, lodículos o glomélulas.

Granos: Los granos son cariósides que presentan forma ovalada con sus extremos redondeados. El germen sobresale en uno de ellos y en el otro hay un mechón de pelos finos. El resto del grano, denominado endospermo, es un depósito de alimentos para el embrión, que representa el 82% del peso del grano (SAGARPA, 2010).

5.4.2 Fenología del cultivo de trigo

El crecimiento de las plantas de trigo se mide en etapas, mismas que son afectadas por factores como el estrés y la sequía, de manera distinta. El desarrollo vegetal se puede definir como la secuencia de acontecimientos fenológicos, controlados por factores genéticos, ambientales y por el manejo

agronómico, mismos que determinan los cambios morfológicos y funcionales de la planta y que conducen a la acumulación de biomasa y formación de los componentes del rendimiento (Adams y Tazenda, 2013).

5.5 Calidad industrial

La calidad de trigo es un tema muy complejo, depende de características del grano de los cuales los más importantes son la dureza del endospermo, la composición de la proteína de almacenamiento (proteína del gluten) y la composición del almidón. Las variaciones en estos factores resultan en diferentes combinaciones y desempeños durante la molienda para obtener harinas y el procesamiento de estas últimas durante la elaboración de alimentos (Martínez *et al.*, 2012).

Las gluteninas de alto peso molecular (GAPM) y de bajo peso molecular (GBPM) son proteínas solubles en soluciones diluidas de ácido. Las gluteninas, comprenden aproximadamente del 35 al 45% de las proteínas del endospermo. Las gluteninas de APM representan el 20% aproximadamente del total de las mismas, y las de BPM el 80% restante. Las primeras, tienen pesos moleculares entre 90 y 150 kDa. Las segundas, tienen pesos moleculares entre 45 y 51 kDa (Martínez-Cruz *et al.*, 2014).

5.5.1 Calidad panadera

La cohesividad, viscosidad y elasticidad de la masa del trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) son propiedades reológicas que le confieren la fuerza y extensibilidad de la masa y, consecuentemente, determinan la calidad del producto final a obtener; panes, galletas, tortillas y pasteles. Estas características reológicas del gluten son controladas parcialmente por diversos alelos que codifican subunidades de proteínas (gluteninas y gliadinas). Se ha demostrado que las gluteninas de alto peso molecular, las gluteninas de bajo peso molecular y las gliadinas tienen efecto sobre la fuerza y extensibilidad de la masa del trigo harinero (Martínez *et al.*, 2012).

5.5.2 Dureza del grano

La dureza o textura del grano es el factor más importante que define el uso del trigo, con base principalmente en la capacidad de absorción de agua de las harinas que se producen. El trigo semiduro a duro es apropiado en la panificación, ya que la masa de sus harinas presenta alta absorción, lo cual es fundamental para un buen desempeño durante el desarrollo de la masa y alta retención de humedad de los productos de panificación. Por el contrario, el trigo suave es más apto para la producción de galletas ya que la baja absorción de agua de sus masas, permite una expansión simétrica de las galletas, las cuales a la vez deben retener baja humedad (Martínez-Cruz *et al.*, 2014).

5.5.3 Proteína

La cantidad de proteína en el grano de trigo, es controlada en gran medida por factores ambientales, como las condiciones de disponibilidad de agua durante la maduración, el contenido de nitrógeno en el suelo, manejo del cultivo y aplicación de fertilizantes nitrogenados (Martínez-Cruz *et al.*, 2014).

El contenido de esta biomolécula en el grano de trigo, varía de 8 a 20 % (en base seca), del total del contenido de esta proteína, del 78 al 85 % corresponde a las gluteninas de alto y bajo peso molecular, y a las gliadinas (alfa α , beta β , gamma γ , omega ω). Las cuales, se clasifican como insolubles en agua y solubles en soluciones salinas. Las albúminas y globulinas representan del 15 al 18 % restante (Peña *et al.*, 2002).

Las proteínas de reserva del trigo (glutenias y gliadinas), son únicas porque son también proteínas funcionales. La complejidad del sistema proteico expresado en este cereal se incrementa aún más por efecto del medio ambiente, pues la composición de prolaminas es afectada tanto por el clima, como por la composición del suelo (contenido de azufre, nitrógeno, fósforo, entre otros factores). Esto determina variaciones sutiles en las fracciones proteicas dentro de una misma variedad (Hoseney,

1991). Ambos tipos de proteínas, gliadinas y gluteninas, son producidos (codificados) por genes nombrados como polimórficos del griego *poli*, que significa muchos y *morfos*, forma. Por lo tanto, de cada una de estas proteínas, existen variantes proteicas codificadas por el mismo gen. Cada una de las variantes, difieren entre sí, a nivel de proteína, por el contenido de aminoácidos dentro de su estructura primaria. Las proteínas del trigo son deficientes principalmente en tres aminoácidos: lisina, treonina y metionina. El aminoácido lisina que es el más limitante, solamente puede ser incrementado mediante la manipulación genética. Los aminoácidos en mayor cantidad dentro de las proteínas del trigo son el ácido glutámico y la prolina (Espí, 2013).

5.5.4 Gluten

El conjunto de proteínas de reserva del endospermo es conocido como gluten. El cual, forma una red proteica al realizar el amasado de la harina con agua, así le confiere las propiedades visco-elásticas (elasticidad o fuerza y extensibilidad). El gluten es el principal componente que define la calidad de panificación o el tipo de pan que se puede producir de una variedad, con base en dichas propiedades visco-elásticas. A su vez, define el desempeño de una masa durante su desarrollo. En los procesos mecanizados, se requieren harinas con gluten muy elásticos, mientras que en la producción semi-mecanizada o manual del pan, se requieren trigos con menor elasticidad. Sin embargo, para la producción de cualquier tipo de pan, el trigo a utilizarse debe de poseer gluten extensible para obtener una textura y forma de pan aceptables (Branlard *et al.*, 2003).

La influencia de algunas combinaciones de gluteninas de alto y bajo peso molecular (GAPM y GBPM) sobre la calidad de panificación en líneas derivadas de cruza entre variedades mexicanas, ha sido estudiada ampliamente bajo diversos grupos de investigación. Así, se han identificado varios alelos y sus combinaciones adecuadas para obtener nuevas variedades con niveles deseables de fuerza y

extensibilidad (Martínez *et al.*, 2012). En el Cuadro 2, se muestra el control genético de las gluteninas de alto peso molecular y bajo peso molecular (GAPM y GBPM) (Espí, 2013).

Cuadro 2. Control genético de las gluteninas (GAPM y GBPM)

Gluteninas	Loci
	<i>Glu-A1</i>
GAPM	<i>Glu-B1</i>
	<i>Glu-D1</i>
	<i>Glu-A3</i>
GBPM	<i>Glu-B3</i>
	<i>Glu-D3</i>

GAPM= Gluteninas alto peso molecular, GBPM= Gluteninas bajo peso molecular (Peña, 2002).

5.6. Clasificación de las proteínas del gluten de trigo con base en su solubilidad y funcionalidad

Las proteínas de trigo pueden clasificarse con base en su solubilidad y funcionalidad.

5.6.1. Clasificación de las proteínas con base en su solubilidad

Esta clasificación fue desarrollada por Osborne (1924) y consiste en una serie de extracciones con: agua, solución de sal diluida, solución de alcohol y solución de ácidos o álcalis diluidos. Esta secuencia se utiliza para la separación de proteínas y a éstas se les pueden clasificar en albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas, respectivamente (Cuadro 3) (Goesaert *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Clasificación de las proteínas del gluten con base en su solubilidad y funcionalidad.

Fracción Osborne	Comportamiento en Solubilidad	Composición	Papel biológico	Papel funcional
Albúminas	Extraíbles en agua	Proteínas no del gluten (principalmente monoméricas)	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Globulinas	Extraíbles en sales diluidas	Proteínas no del gluten (principalmente monoméricas)	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Gliadinas	Extraíbles en soluciones de alcohol	Proteínas del gluten (principalmente monoméricas y polímeros de bajo peso molecular)	Proteínas de almacenamiento de la semilla tipo prolaminas	Viscosidad a la masa/extensibilidad
Gluteninas	Extraíbles en ácido acético diluido	Proteínas del gluten (principalmente polímeros de alto peso molecular)	Proteínas de almacenamiento de la semilla tipo prolaminas	Elasticidad a la masa/tenacidad
Residuo	Sin extraer	Proteínas del gluten (polímeros de alto peso molecular) y proteínas no del gluten poliméricas (Titricinas)	Proteínas de almacenamiento de la semilla, tipo prolaminas (gluten) y tipo globulinas (Titricinas)	Variable

Fuente: Goesaert *et al.*, (2005).

5.6.2 Clasificación de las proteínas con base en su funcionalidad

Desde el punto de vista de la funcionalidad de las proteínas, se pueden distinguir dos grupos de proteínas de trigo. Proteínas pertenecientes al gluten con un desempeño muy importante en la elaboración del pan y proteínas no pertenecientes al gluten, con un desempeño secundario en la

elaboración del pan. Las proteínas no pertenecientes al gluten, representan entre un 15–20% del total de las proteína del trigo, principalmente, se encuentran en las capas externas del grano de trigo y en bajas concentraciones en el endospermo. Estas proteínas son extraídas en soluciones de sales diluidas y por lo tanto se encuentran en las fracciones de Osborne de albúminas y globulinas. En su mayor parte son proteínas monoméricas, estructurales o fisiológicamente activas (enzimas). No obstante, a estas proteínas también pertenecen un grupo secundario de proteínas poliméricas de almacenamiento, llamadas tritricinas, que pertenecen a la clase globulinas de las proteínas de almacenamiento de la semilla. Están relacionadas con la mayoría de las proteínas de almacenamiento de legumbres y en otros cereales, como la avena y el arroz. Las proteínas del gluten representan entre un 80–85 % del total de las proteínas del trigo y representan la mayor parte de las proteínas de almacenamiento. Estas moléculas, pertenecen a la clase de prolaminas (Shewry y Halford, 2002). En el Cuadro 4, se muestra la clasificación de las proteínas del gluten, con base en su funcionalidad.

Cuadro 4. Clasificación de las proteínas del trigo con base en su funcionalidad.

Clasificación de acuerdo a su funcionalidad	Ubicación en el grano.	Composición en la harina de trigo %	Proteínas monoméricas	Proteínas poliméricas
Proteínas no pertenecientes al gluten	Principalmente en las capas externas del grano de trigo, y muy bajas concentraciones en el endospermo	15-20	Albúminas Globulinas	Triticinas
Proteínas pertenecientes al gluten	En el endospermo del grano del trigo	80-85	Gliadinas	Gluteninas

Fuente: Shewry y Halford (2002).

Por otra parte, las gluteninas son una mezcla heterogénea de polímeros con pesos moleculares que varían desde aproximadamente 80,000 hasta varios millones de kDa. Las gluteninas están entre las proteínas más grandes encontradas en la naturaleza y están constituidas por subunidades que están unidas a través de enlaces disulfuro. Estas subunidades de gluteninas pueden liberarse reduciendo enlaces disulfuro con agentes tales como el β -mercaptoetanol o ditioneitol. Las subunidades de gluteninas están bioquímicamente relacionadas con las gliadinas y son solubles en soluciones de alcohol en agua (Shewry y Halford, 2002).

5.6.3 Gluteninas

Las gluteninas de alto y bajo peso molecular comprenden aproximadamente del 35 al 45% de las proteínas del endospermo. Las primeras tienen pesos moleculares entre 90 y 150 kDa y las segundas, entre 45 y 51 kDa (Martínez *et al.*, 2012; Martínez-Cruz *et al.*, 2014).

La función de las gluteninas dentro del gluten, se relacionan con su peso molecular. Las de GAPM, contribuyen principalmente a la elasticidad del gluten, mientras que las de BPM tienen su mayor efecto en la extensibilidad (Martínez *et al.*, 2012; Martínez-Cruz *et al.*, 2014). Dicha característica de las gluteninas, es derivada principalmente por los puentes disulfuro que forman una red proteica extensa o polimérica. La existencia de los puentes disulfuro (S-S) intermoleculares y grupos sulfhidrilo (SH), permiten entrecruzamientos con otros polímeros para formar agregados moleculares de gran tamaño (2 a 3 millones de Da). El tamaño del polímero y su fuerza, varía de acuerdo a la capacidad de las subunidades para interactuar. Lo cual, es producido por los residuos de cisteína en su estructura primaria, produciendo uniones covalentes intra o intercatenarias, mediante dichos puentes para establecer extensas mallas poliméricas de polipéptidos (Shewry y Halford; MacRitchie, 1994). La contribución de las gluteninas de GAPM y BPM es de mayor relevancia en asociación, ya que se resalta en el tamaño de la red polimérica, fuerza y extensibilidad del gluten.

5.7 Marcadores bioquímicos

Para las características reológicas del gluten, existen métodos bioquímicos que permiten estimar el comportamiento del trigo en relación a estas características, de acuerdo a la composición de gluteninas y gliadinas con la calidad panadera. Por ello, se han desarrollado varios métodos para identificar las subunidades de las proteínas (Martínez-Cruz *et al.*, 2014). El uso de proteínas de almacenamiento en sistemática y diversidad genética se basa en el hecho que las proteínas de

diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes, debido a la presencia de diversos alelos originados por el polimorfismo de las mismas.

Las proteínas de reserva son caracterizadas en geles, por medio de técnicas generales de tinte. El polimorfismo de las proteínas de reserva en semillas, ha sido utilizado para identificar y distinguir genotipos cultivados y silvestres en numerosas especies, tales como: frijoles (*Phaseolus vulgaris*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), arveja (*Pisum sativum*) y maíz (*Zea mays*) (Martínez-Cruz *et al.*, 2014).

5.7.1 Marcadores bioquímicos para calidad panadera

Un gen polimórfico como su nombre indica, proviene del *poli*= muchos y *morfos*= formas. Por lo tanto, la literatura indica que un gen polimórfico es aquel gen que presenta variantes, cada variante de dicho gen, se le llama alelo. Por lo tanto, una proteína polimórfica es aquella que es codificada por genes polimórficos, por lo que ese gen se expresa con diferentes proteínas como variantes de esa misma proteína polimórfica (diferentes alelos). Un locus, es un lugar en un cromosoma, donde se encuentra un gen polimórfico o genes de interés, como serían los Marcadores Moleculares. El término "Loci" es el plural de locus, es decir, un Loci alberga o se refiere a diferentes genes en un cromosoma, es decir, varios locus (Peña *et al.*, 2004). Las Gluteninas, son proteínas polimórficas que codifican para varias subunidades proteicas, varios alelos, algunos de éstos se han reportado como relacionados fuertemente con la calidad panadera (Peña *et al.*, Martínez *et al.*, 2014).

Martínez *et al.* (2012) analizó 98 líneas recombinantes utilizando como progenitores a "Bacanora T88" y "Salamanca S75", como progenie derivada de su cruce se obtuvieron 98 líneas recombinantes, en los cuales se encontraron las combinaciones 2*, 7+9, 5+10, c, g, b, la cual presentó un gluten fuerte y de excelente extensibilidad apto para la panificación.

De la O *et al.*, (2010) reportó que para mejorar la cantidad de proteína del gluten es necesario encontrar las siguientes combinaciones de alelos 2*, 17+18, 5+10 *Glu -A3c*, *Glu -B3g*, *Glu -D3b* y 1, 17+18, 5+10 *Glu -A3e*, *Glu -B3g*, *Glu -D3b*. de igual manera también reporto a las siguientes combinaciones 1, 17+18, 5+10, *Glu -A3c*, *Glu -B3g*, *Glu -D3b*, 1, 17+18, 5+10, *Glu -A3c*, *Glu -B3h*, *Glu -D3b*; y 2*, 17+18, 5+10, *Glu -A3c*, *Glu -B3g*, *Glu -D3b* con valores elevados en tiempo de amasado la cual es una de las variables más evaluadas para determinar el destino final del trigo. En el Cuadro 5 se presentan los alelos que se han encontrado tienen relación con la calidad panadera.

Cuadro 5. Alelos relacionados con calidad panadera.

<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="background-color: red; color: white; padding: 5px;">Mala</div> <div style="background-color: yellow; padding: 5px;">Buena</div> <div style="background-color: green; padding: 5px;">Excelente</div> </div>			Características de calidad	Referencias
<i>Glu A1</i>	<i>Glu B1</i>	<i>Glu D1</i>		
1	17+18	5+10	Excelente calidad	Ibrahim <i>et al.</i> , 2013
1	7+8	5+10		
2*	7+9	2+12		
	17+18		Fuerza de la masa	Gao <i>et al.</i> , 2016
2*	7+9	5+10	Gluten fuerte y excelente extensibilidad	Martínez <i>et al.</i> , 2012
1	17+18	5+10	Mejorar cantidad de proteína del gluten	De la O <i>et al.</i> , 2010
Mala calidad			Buena calidad	
Excelente calidad				

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del sitio experimental

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Calidad de los Productos Agropecuarios, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México; mismo que se ubica en el Campus Universitario “El Cerrillo”, Piedras Blancas, Municipio de Toluca, Estado de México. Parte de la elaboración e interpretación de los geles se realizó en el Laboratorio de Química y Calidad de Trigo, del Centro de Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ubicado en el km 45, carretera México-Veracruz, El Batán, Estado de México.

6.2 Material vegetativo

Se evaluaron dos variedades de trigo Matchett F-2011 y RSM-Norman F-2008 del Programa de Mejoramiento Genético de la Empresa “Resource Seeds International S. A. de C. V.”. Durante el ciclo otoño-invierno 2015, en la localidad de San Miguel Chapultepec, Municipio de Toluca, Estado de México.

6.3 Extracción de proteínas (Gluteninas)

Para la extracción de las gluteninas, se procedió mediante el protocolo de Singh *et al.*, 1991 y Peña *et al.*, 2004. Para lo cual, los granos de cada una de las variedades se molieron en un molino de laboratorio (Nixtamatic NCMI, INMEZA, México) y se hicieron pasar por un Tamiz Núm. 80. Para la extracción de gluteninas, se procedió a separar primeramente a las gliadinas, las cuales, por su solubilidad son removidas al inicio de la metodología utilizada (Figura 1). Una vez extraídas las gluteninas, las muestras se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su proceso. Las soluciones para la extracción se muestran en los cuadros 6 al 9.

Cuadro 6. Buffer TRIS-HCl 0.08M, pH 8.0 (500 mL).

Reactivo	Cantidad
Tris base	4.84 g
SDS	20 g

Cuadro 7. Solución muestra para extracción de
gluteninas, pH 6.8.

SDS	20%
Glicerol (p/v)	40%
Azul de Bromofenol	0.02%

Cuadro 8. Solución de muestra para extracción de
gluteninas, pH 8.0.

SDS	20%
Glicerol (p/v)	40%
Azul de Bromofenol	0.02%

Cuadro 9. Buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.0.	
Solución Stock 1.	
39 mL	27.2 g KH_2PO_4 en 1 L de agua (0.2 M)
Solución Stock 2.	
61 mL	45.6 g K_2HPO_4 en 1 L de agua (0.2 M)

Soluciones para la extracción de proteínas por el método de Singh *et al.*, (1991).

Solución A: Propanol 50 %

Solución B: Propanol 50 %, Tris-HCl pH 8.0, M 0.08M 50%

Solución C: SDS 2% (p/v), Glicerol 40 % (p/v).

Solución de Vinilpiridina (VP4) (preparar en fresco): 1.4 % (v/v) en Solución B.

Solución de Ditiotrietol (preparar en fresco): 1% (p/v) en solución B.

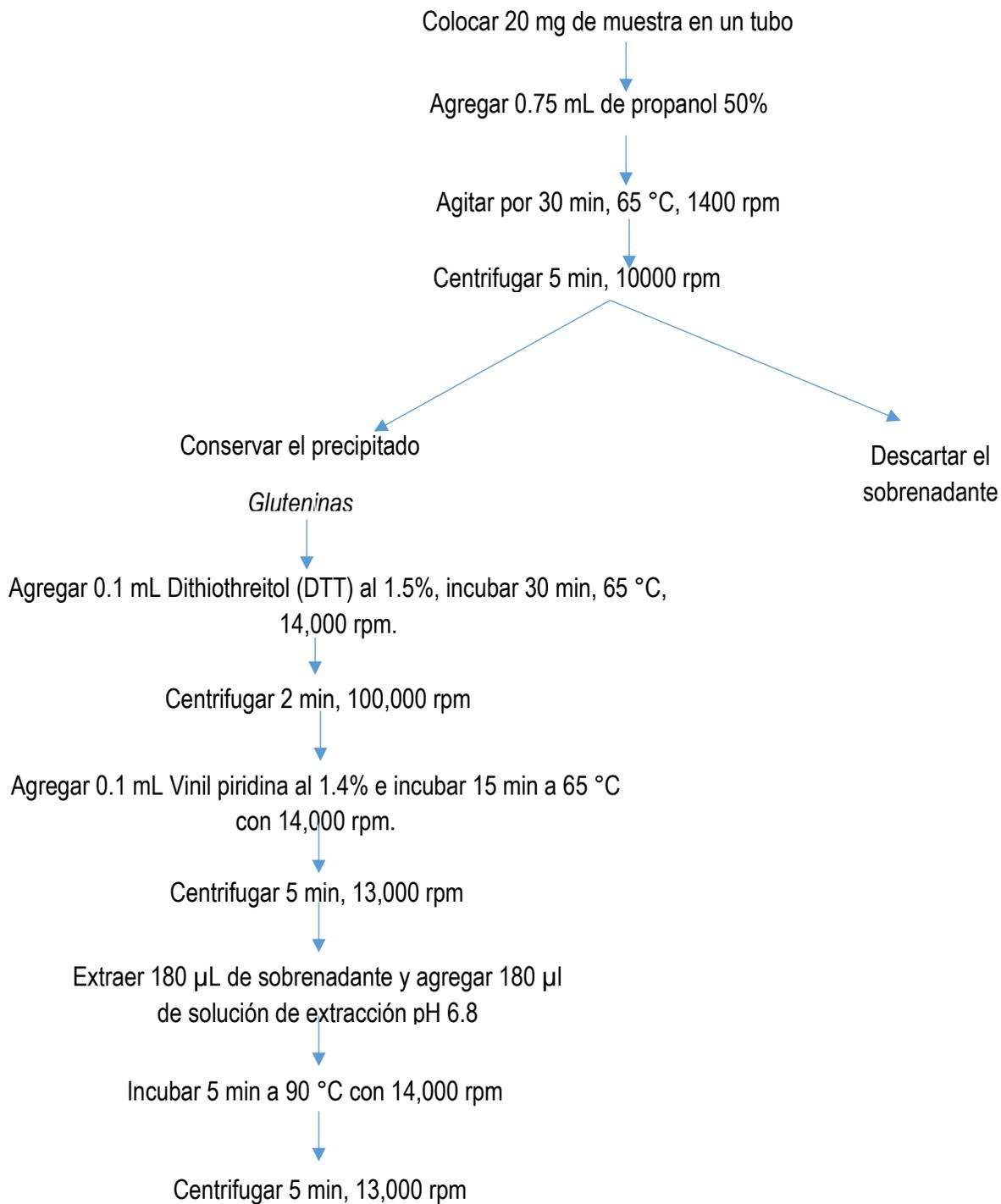


Figura 1. Diagrama de flujo para la extracción de gluteninas (Singh *et al.*, 1991; Peña *et al.*, 2004).

6.4 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry *et al.*, (1951).

Una vez extraídas las gluteninas, se procedió a determinar la concentración de cada una de las muestras obtenidas, mediante el Método de Lowry *et al.* (1951). Lo anterior, con la finalidad de poder colocar en los pozos de los geles de electroforesis SDS-PAGE, la misma masa de gluteninas. Así como, el rectificar el método de tinción más adecuado para la concentración de las muestras y la correcta visualización de las bandas de las subunidades proteicas. El método de Lowry *et al.* (1951), es una técnica espectrofotométrica que se basa en la cuantificación de proteínas a partir de la medición del color originado por la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu, por un complejo proteína-cobre. Para esta determinación, se utilizó una curva patrón de albúmina bovina sérica (1 mg/mL). La concentración final de la muestra, se determinó mediante una ecuación de regresión lineal en la curva patrón como muestra la Figura 2. La cuantificación de proteínas se realizó para confirmar la concentración de las muestras para teñirlas mediante el colorante de Azul de Coomassie R250.

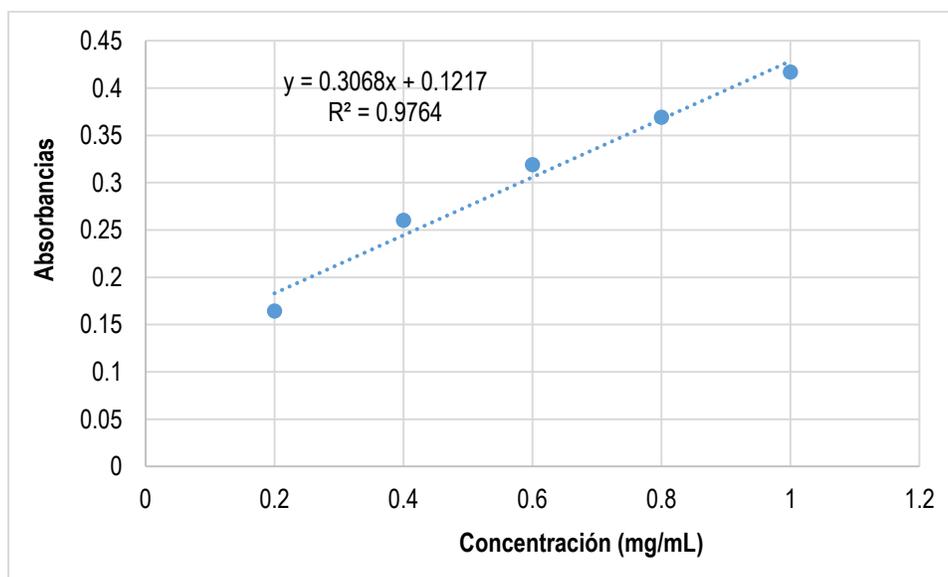


Figura 2. Curva estándar de la solución patrón de albúmina sérica de Bovino (1 mg/mL) para la cuantificación de gluteninas

6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Para visualizar el perfil polimórfico de las gluteninas, se emplearon geles de 20 x 22.3 cm, con separadores de 1 mm de grosor. Para el gel separador, se utilizó una solución de poliacrilamida al 15% y para el gel concentrador, se utilizó a una concentración del 4.8% de poliacrilamida. Los cuadros 10 y 11 presentan las formulaciones para los genes de corrimiento y de aplicación.

Cuadro 10. Gel de corrimiento 15%.

Tris pH 8.5	74.1 mL
Stock acrilamida	73.15 mL
SDS al 10%	1.95 mL
Aguan destilada	41.90 mL
Persulfato de amonio	3.90 mL
TEMED	0.09 mL

Cuadro 11. Gel de aplicación 4.8%.

Tris pH 6.8	3.2 mL
Stock acrilamida	3.15 mL
SDS al 10%	0.26 mL
Aguan destilada	18.35 mL
Persulfato de amonio	1.14 mL
TEMED	0.03 mL

6.5.1 Electroforesis

Los geles 20 x 22.3 cm con 1 mm de grosor se corrieron en una cámara de electroforesis (PROTEAN II xiand XL Cells, Biorad), por 20 h con una carga de 12.5 mA por gel. Una vez corridos los geles, se desmoldaron y se colocaron en la solución de teñido por 4 h. La solución de teñido se preparó al mezclar 400 mL de metanol con 100 mL de ácido acético glacial y 500 mL de agua destilada. Transcurrido este tiempo, los geles se retiraron de la solución de teñido y se colocaron en un recipiente con agua destilada, en agitación constante por 24 h, con tres o cuatro cambios de agua (Peña *et al.*, 2004).

6.5.2 Reactivos para los geles de Electroforesis SDS-PAGE de gluteninas

Para la elaboración de los geles, se prepararon las siguientes soluciones y se colocaron en recipientes ámbar. Las soluciones se almacenaron temperaturas de 3 a 4 °C, por no más de 30 días.

Buffer Tris-HCl 1M, pH 8.8. Disolver 30.75 g de TRIS en 220 mL de agua destilada. Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado y almacenar en refrigeración.

Buffer Tris-HCl 1M, pH 6.8. Disolver 12.11 g de TRIS en 80 mL de agua destilada. Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado.

Solución de SDS 10%. Disolver 5 g de SDS en 40 mL de agua destilada. Almacenar a una temperatura de 15 a 30 °C.

Solución Stock de Acrilamida para geles de corrimiento y de aplicación. Pesar 0.52 g de bis-Acrilamida y 39.48 g de Acrilamida. Disolver en 70 mL de agua destilada, homogenizar y filtrar antes de usar.

Buffer de extracción pH 6.8. Disolver 12 g de glicerol en 36 ml de agua destilada. Adicionar 0.757 g de TRIS, 4g de SDS, 750 mg de DTT (Ditiotreitol) y 6 mg de azul de bromofenol. Determinar el pH, ajustar pH a 6.8 con una solución 1 M de HCl concentrado.

Buffer de corrida Tris-glicina. Agregar 30 g de Tris en un vaso de precipitado de 1000 mL. Adicionar 887 mL de agua destilada y agitar. Mientras la solución está en agitación, adicionar 144 g de glicina y 10 g de SDS. El pH de la solución deberá ser de 8.3. Si el pH es más alto no ajustarlo con HCl.

La elaboración de las soluciones, geles y corridas electroforéticas se realizaron con el uso de guantes de nitrilo, mascarilla y bata, en todo momento.

6.5.3 Elaboración del gel separador

Este gel se preparó a 15%, para lo cual, se emplearon los siguientes reactivos en las proporciones y orden mostrados a continuación:

1. 24.67 mL de TRIS pH a 8.8
2. 24.39 mL de Acrilamida Stock para gel de corrimiento
3. 0.65 mL de SDS al 10 %
4. 13.97 mL de agua destilada.

La mezcla se degasificó con un sifón conectado a un grifo de agua de 2 a 4 min. Posteriormente, se adicionó 1.3mL de persulfato de amonio a 1.5% (Preparado en fresco). Finalmente, se adicionó 30 μ L de TEMED a la mezcla preparada se homogenizó suavemente por 5 seg. Posteriormente, la mezcla se colocó en el molde para el montaje del gel previamente ensamblado. Para un gel de 20 x 22.3 cm de 1 mm de grosor, se necesitaron aproximadamente 38 mL de solución por gel. Inmediatamente, se añadió 1 mL de alcohol butílico en el borde del gel, para evitar la formación de burbujas (el alcohol se aplicó lentamente con una jeringa).

6.5.5 Elaboración del gel concentrador

Para la formulación del gel concentrador se mezclaron los siguientes reactivos, respetando el orden presentado, la concentración final fue de 4.8%:

1. 6.12 mL de agua destilada.
2. 1.10 mL de TRIS stock pH a 6.8.
3. 1.05 mL de Acrilamida stock para el gel de aplicación.
4. 0.09 mL de SDS al 10 %.
5. 0.38 mL de 1.5 % persulfato de amonio (Preparado inmediatamente antes de usarse).

Una vez mezclados los reactivos anteriores en el orden y proporción mencionada, se adicionó 0.1 mL de TEMED. Pevio a colocar esta solución, se removi6 el alcohol butílico del borde del gel separador. Una vez hecho esto, se coloc6 encima del gel separador la solución previa mencionada y se coloc6 el peine que gener6 una vez seca la solución los pocillos del gel. Se dej6 secar de 30-60 min (Peña *et al.*, 2004).

6.5.6 Corrida del gel SDS-PAGE

Para correr los geles se retir6 el peine, se agreg6 el buffer de corrida y se colocaron los geles dentro de la cámara de electroforesis. Se cargaron 8 μ L de cada muestra en cada uno los pocillos del gel. Posteriormente, se cubrieron los pocillos con la buffer de corrida para colocar la tapa de la cámara. Una vez armada la cámara, se conectaron las mangueras para el agua del enfriador, ya que por el tiempo de corrida se evita el sobrecalentamiento de ésta misma, así la temperatura se mantuvo a 15 °C. Los geles se corrieron con una carga de 12.5 mA por gel, en un tiempo aproximado de 20 h (Peña *et al.*, 2004).

6.5.7 Teñido y desteñido del gel

La solución de teñido se prepar6 a partir de 400 mL de metanol más 100 mL de ácido acético glacial, 0.1 g azul de Coomassie R250 y 500 mL de agua destilada. Esta solución, se no se almacen6 por más de 8 días. Pevio al teñido, los geles se sumergieron en una solución de ácido tricloroacético al 12%

(Cuadro 12) durante 5 min. Posteriormente, se colocaron los geles en la solución de tinción por 4 h con agitación constante.

Ácido tricloroacético	120 g
Agua	1 L

Para desteñir los geles, se usó agua destilada por 24 h, con cambios frecuentes. Una vez realizadas las corridas electroforéticas se procedió a conservar los geles mediante dos procedimientos. El primero, consistió en prensar los geles en papel celofán y colocarlos en una corriente de aire suave durante 5 a 6 h para retirar el exceso de humedad (Peña *et al.*, 2004) y se almacenaron a temperatura ambiente. En el segundo procedimiento, los geles se resguardaron en protectores de hojas de acetatos, con aproximadamente 1 mL del buffer de corrida y se resguardaron a 4 °C.

6.6 Análisis de los geles

Para la identificación de los alelos relacionados con calidad panadera en las Líneas Avanzadas RSM-Norman F-2008 y Matchett F-2011, se identificaron las bandas correspondientes con las nomenclaturas propuestas por Payne y Lawrence (1983) para las subunidades de gluteninas de alto peso molecular y para las subunidades de bajo peso molecular, por Jackson *et al.* (1996) y Branlard *et al.* (2003). Para lo cual, se emplearon como marcador de peso molecular, tres variedades donadas por el CIMMYT, mismas que han sido caracterizadas exhaustivamente en cuanto a la identificación de los diversos alelos reportados con calidad panadera. De las cuales, la variedad Pitic 62 contiene los alelos 1, 7+18, 7+12, para el locus *Glu-1* y *c*, *b*, *d* para el locus *Glu-3*. La variedad Opata M 85 contiene los alelos 2*, 17+18, 2+12 del locus *Glu-1*, así como para el *Glu-3*, los alelos *b*, *i* y *a*, la tercera variedad, Pavon 76, con los alelos 2*, 17+18 y 5+10 para el locus *Glu-1* y *b*, *h*, *b* del locus *Glu-3*.

A continuación en el Cuadro 13 se presentan los alelos correspondientes al loci *Glu 1* y *Glu 3*, de las variedades utilizadas como Marcador Molecular.

Cuadro 13. Alelos correspondientes al loci *Glu 1* y *Glu 3*, de las variedades utilizadas como Marcador Molecular.

Variedades testigo	Loci <i>Glu 1</i>			Loci <i>Glu 3</i>		
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Glu-D3</i>
Opata M85	2*	13+16	2+12	<i>b</i>	<i>i</i>	<i>a</i>
Pitic 62	1	7+8	7+12	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>d</i>
Pavon 76	2*	17+18	5+10	<i>b</i>	<i>h</i>	<i>b</i>

6.7 Diseño experimental

Se estudiaron dos Líneas Avanzadas de trigo (Matchett F-2011 y RSM Norman F-2008) y el trabajo se dividió en dos partes. La primera parte consistió hasta la cuantificación de las gluteninas. Para esta parte, se ocupó estadística descriptiva para analizar los resultados de la cuantificación de proteína y se usó a la media, como medida de tendencia central y a la desviación estándar, como medida de variabilidad. La segunda parte del trabajo, se determinó bajo el criterio de presencia o ausencia del patrón de bandeo para la identificación de los alelos relacionados con calidad panadera (Cuadro 6). En Ambos casos, las muestras se procesaron por duplicado.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cuantificación de proteínas (gluteninas)

El resultado de la cuantificación de proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951) permitió colocar en cada pocillo del gel, la misma cantidad de masa de gluteninas por cada muestra y su duplicado. Igualmente, dichos resultados rectificaron la elección del método de tinción para los geles SDS-PAGE por Coomassie R250 (Cuadro 14). Los resultados obtenidos de dicho análisis mostraron una concentración de 2.51 - 3.09 mg/mL de gluteninas en las variedades evaluadas, RMS-Norman F-2008 y Matchett F-2011, respectivamente. El contenido de gluteninas resultó más alto en la variedad RSM-Norman F2008.

Cuadro 14. Concentración media de las muestras de proteína (gluteninas).

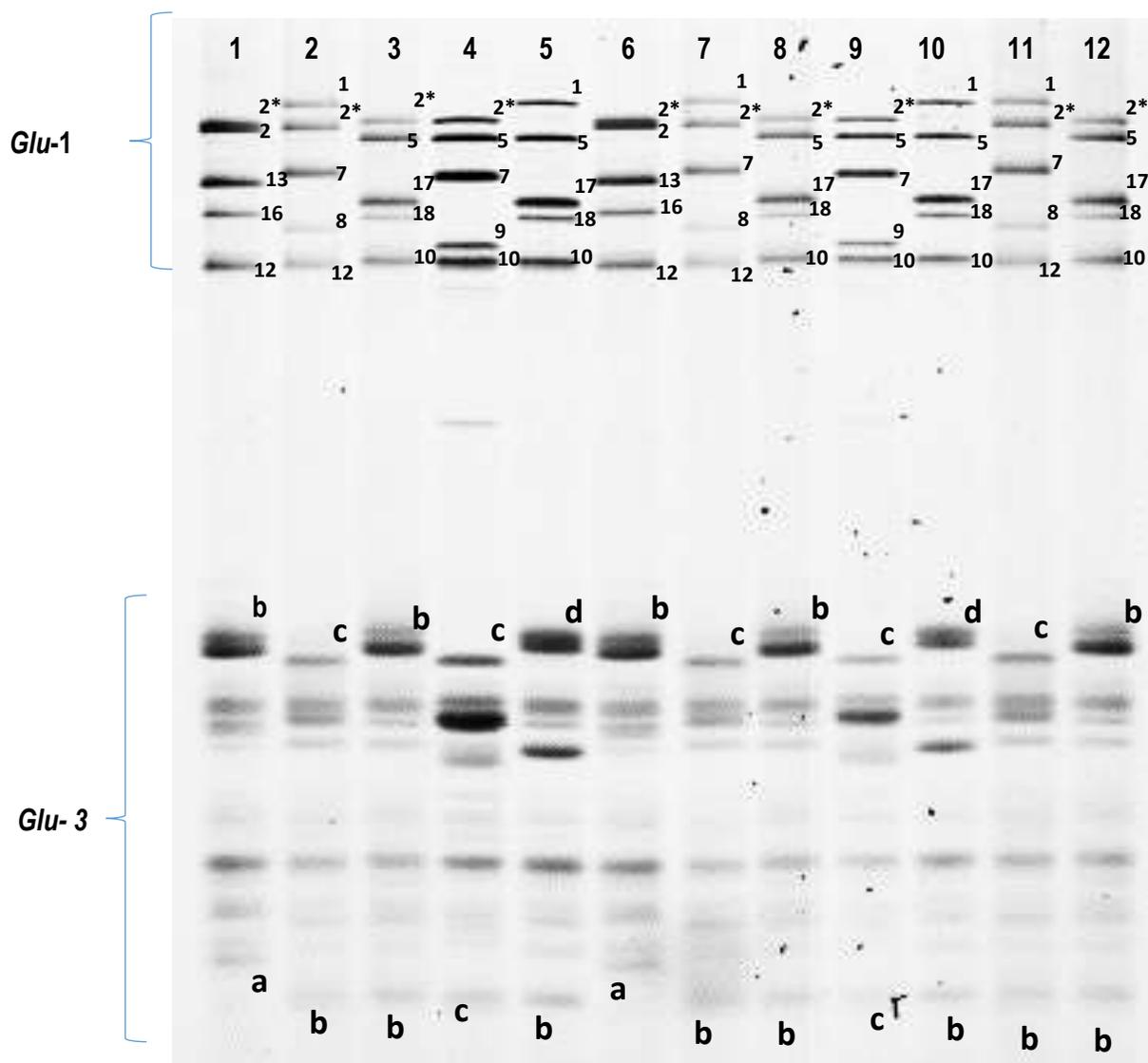
Variedad	Absorbancias 660 nm	Concentración media mg/mL gluteninas	Desviación estándar
RSM-Norman F-2008	0.35	3.09	0.01
Matchett F-2011	0.31	2.51	0.00

Debido a que la concentración de gluteninas obtenida en las dos variedades, se encontró dentro de un rango mayor de 0.5 µg, se sugirió utilizar como técnica de tinción el azul de Coomassie (R205) y no otra tinción con mayor sensibilidad (Pinzón, 2011).

7.2 Caracterización de GAPM y GBPM

Como resultado de las corridas de electroforesis en condiciones no disociantes, se obtuvieron los geles correspondientes. En los cuales, se identificaron las bandas de los alelos correspondientes para

GAPM y GBPM relacionados con calidad panadera, mediante la comparación con las variedades testigo (Figura 3).



Carril 1-12: Carril 1: Opata M85, carril 2: Pitic 62, carril: 3 Pavon 76, carril: 4 RSM-Norman F-2008, carril 5: Matchett F-2011, carril 6: Opata M 85, carril 7: Pitic 62, carril 8: Pavon 76, carril 9: RSM-Norman F-2008, carril 10: Matchett F-2011, carril 11: Pitic 62, carril 12: Pavon 76. Alelos correspondientes al loci *Glu 1* (1, 2*, 7+9, 17+18, 5+10, 13+16, 17+18, 7+8)-y *Glu 3* (a, b, c, y d, respectivamente)

Figura 3. Patrón de Bando de geles en SDS-PAGE para subunidades de GAPM y GBPM en las variedades RSM-Norman F-2008 y Matchett F-2011.

En el Cuadro 15, se muestran los patrones genéticos que se formaron para las dos variedades, una vez identificados los alelos visualizados en el gel. Se identificaron 13 alelos diferentes para las 2 variedades. Para el locus *Glu A1*, de las GAPM los alelos encontrados fueron 2* y 1. Para el locus *Glu B1*, los alelos encontrados fueron 7+9 y 17+18 y el locus *Glu D1*, 5+10. Para las subunidades de bajo peso molecular correspondientes al locus *Glu A3*, se encontraron los alelos *c* y *d*; así como para el locus *Glu B3* a los alelos *g* y *h* y el alelo *b*, para *Glu D3*.

Cuadro 15. Alelos y patrones genéticos de las subunidades de GAPM y GBPM en las variedades de trigo y en los testigos.

Variedades	Gluteninas de alto peso molecular			Gluteninas de bajo peso molecular		
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Glu-D3</i>
RSM-Norman F-2008	2*	7+9	5+10	<i>c</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Matchett F-2011	1	17+18	5+10	<i>d</i>	<i>h</i>	<i>b</i>

7.3 Efecto en la calidad panadera por alelo y por combinación

El alelo 17+18 que presenta la variedad Matchett F-2011 ha sido relacionado con conferir fuerza a la masa (Gao *et al.*, 2016). Los alelos encontrados en RSM Norman F-2008 para el locus *Glu-B1* y *Glu-D1*, a 7+9 y 5+10, respectivamente, son asociados con características que favorecen a la extensibilidad y fuerza de la masa. El alelo *g* que pertenece al locus *Glu-B3*, de la variedad RSM-Norman F-2008, ha sido reportado con una con excelente extensibilidad y con valores de gluten fuerte (Martínez *et al.*, 2012).

Ibrahim (2013), clasificó a las combinaciones de los alelos de GAPM y GBPM de las variedades de un banco de Gemoplasmas, al utilizar los puntajes y clases de calidad para los Loci *Glu-1* y Loci *Glu-3*, respectivamente, propuestos por Payne *et al.* (1983) y Gupta y Sheperd (1992). En el cual, los patrones genéticos encontrados en la variedad Matchett F-2011 de 1, 17+18 y 5+10 junto con *Glu-A3d*, *Glu-B3h* y *Glu-D3b*, así como en RSM Norman F-2008, de 2*, 7+9 y 5+10 y *Glu-A3c*, *Glu-B3g* y *Glu-D3b* contienen alelos reportados como fortalezas (aptos para panificación) en otros materiales, tales como Rebeca F200 y Bacanora T88. El patrón genético de la variedad RSM Norman F-2008, fue reportada por otros autores en otros materiales (Rebeca F200 y Bacanora T88), en los cuales se relacionó con trigos de gluten fuerte (Martínez *et al.*, 2012; Bellil *et al.*, 2014). Por lo que esta variedad, es propuesta como apta para la industria mecanizada o para corrección de masas débiles (Martínez *et al.*, 2012; Bellil *et al.*, 2014). Las puntuaciones encontradas para Matchett F2011, para los alelos del patrón del Loci *Glu-1* en esta variedad, han sido reportados con una calidad de 10 y de acuerdo, a la puntuación de Payne *et al.*(1983) y Gupta y Sheperd (1992), ésta valor corresponde a la puntuación más alta, en un rango de 0-10. Lo cual, pudiera proponer a dicho material vegetativo con alta calidad panadera. El patrón observado en RSM Norman F2008 (*Glu-A1b*, *Glu-B1c*, *Glu-D1d*) también se ha indicado con una alta calidad panadera. Debido a la combinación de los alelos *Glu-D1d* (5+10), *Glu-B1c* (7+9), junto con *Glu-A1b* (2*), que se han relacionado con alta extensibilidad y fuerza de la masa. La combinación de RSM-Norman F2008 para las GBPM (*GluA3c*, *Glu-B3g*, *Glu-D3b*) y la de la variedad Marchet F2011 (*Glu-A3d*, *Glu-B3h*, *Glu-D3b*) contienen alelos que en otros reportes se han citado con una alta calidad o de gran fuerza para la masa, principalmente el alelo *Glu-B3h*, indicada como un mejorador en la calidad del trigo (Izadi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2013; Gulia y Khatkar, 2014; Bellil *et al.*, 2014). Por lo tanto, si las variedades analizadas en el presente trabajo se sugieren con excelente extensibilidad y fuerza en la masa, éstas mismas pudieran

clasificarse dentro del grupo de trigos de gluten fuerte y apto para panificación mecanizada, mismas que hasta el momento no han sido citadas con vocación industrial (CANIMOLT, 2014).

VIII CONCLUSIÓN

- Se identificaron los alelos de los loci *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1* para las GAPM y para las GBPM, de *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*, relacionados con calidad panadera en las dos variedades estudiadas. Lo cual, las propone como trigos de gluten fuerte aptos para la industria panadera.

IX SUGERENCIAS

Los patrones genéticos encontrados en los materiales estudiados, los sugieren aptos para panadería, por lo que el realizar pruebas de calidad de textura del pan, altura de la masa o pruebas de fermentación de las masas, podrían resultar o relevantes para corroborar los resultados obtenidos. Igualmente, el utilizarlos como mejoradores de masas con otros tipos de cereales, para establecer un esquema alternativo para obtención de panes funcionales.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams S. y Tazenda M., 2013. ¿Cuáles son las seis etapas del ciclo de vida de una planta de trigo? (En línea) Disponible en: <http://www.ehowenespanol.com/cuales-son-seis-etapasdel-ciclo-vida-planta-trigo-lista-91333/>. Consultado en Septiembre 2016.
2. Bellil I. Hamdi O., and Khelifi D. 2014. Allelic variation in *Glu-1* and *Glu-3* Loci of bread Wheat (*Triticum Aestivum* ssp. *Aestivum* L. em. Thell.) Germplasm cultivated in Algeria. Laboratories de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. University Constantine 1, Constantine 25000. Algeria. 42: 648-657.
3. Branlard G., Dardevet M., Amiour N., and Igrejas G. 2003. Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetic Resources and Crop Evolution. 50: 669-679.
4. CANIMOLT (Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo). 2014. Reporte estadístico al 2014. México. CANIMOLT. México. 98 p.
5. Espí P. 2013. Tesis de Doctorado. Estudio molecular de Gluteninas de alto y bajo peso molecular en *Triticum aestivum* ssp. *Vulgare* L. y su relación con la calidad panadera. 26-35.
6. Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural, Forestal y Pesquero. (FND) 2014. Panorama del trigo en México. (En línea). Disponible en <http://www.fnd.cob.mx/>. Consultado en Septiembre de 2016.
7. Gao X., Liu T. J., Yu L., Li Y. F., and Li X. 2016. Influence of high-molecular-weight glutenin subunit composition at *Glu-B1* locus on secondary and micro structures of gluten in wheat (*Triticum aestivum* L.) Food Chemistry. 197: 1184-1190.
8. Goesaert H., Bris K., Veraberbeke W. S., Courtin C. M., Gebruers K., and Delcour J. A. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. Trends in Food Science & Technology. 16: 12-30.

9. Gómez P. M., León. A. E., y Rosell. C. M. 2007. Trigo, de tales harinas tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Córdoba, Argentina: Ediciones Báez. 17-72 p.
10. Gulia N. and Khatkar S. B. 2014. Quantitative and qualitative assessment of wheat gluten proteins and their contribution to instant noodle quality. *International Journal of Food Properties*. 18: 1648-1663.
11. Gupta R.B. and Shepherd K.W. 1992. Two-steps one dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theoretical and Applied Genetics*. 80:65-74.
12. Hosney R. C. 1991. *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 119-124 p.
13. Ibrahim A. I. Z. 2013. Gene Stacking of High Molecular Weight Glutenin Genes in Bread Wheat Using Molecular Markers. 25 p.
14. Izadi D. A. and Yazdi S. B. 2012. Marker assisted selection of high molecular weight glutenin alleles related to bread making quality in Iranian common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Academy of Science*. 91: 193-198.
15. Jackson E. A., Morel M. H., Sontag S. T., Branlard G., Metakovsky E. V., and Redaelli R. 1996. Proposal for combining the classification systems of alleles of *Gli-1* and *Glu-3* loci in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 50: 321-336.
16. Jin H., Zhang Y., Li G., Mu P., Fan Z., Xia X., and He Z. 2013. Effects of allelic variation of HMW-GS and LMW-GS on mixograph properties and Chinese noodle and steamed bread qualities in a set of Aroona near-isogenic wheat lines. *Journal of Cereal Science*. 57: 146-152.
17. Lowry O. H., Rosebroug N.J., and Farr A. L. 1951. Randall R. *Journal Biological Chemistry*. 193: 265-275.

18. MacRitchie F. 1994. Role of polymeric proteins in flour functionality. In: wheat kernel proteins: molecular and functional aspects. Bitervo, Italy: Universita degli studi della Tuscia, pp 145-150.
19. Martínez E., Espitia R., Villaseñor H. E., Hortelano H. E., Rodríguez G. M. F., and Peña R. J. 2014. La calidad industrial de la masa y su relación con diferentes loci de gluteninas en trigo harinero (*Triticum aestivum* L.). *Agrociencia*. 48: 403-4011.
20. Martínez E., Espitia R., Villaseñor H. E., and Peña R. J. 2012. Contribución de los loci *Glu-B1*, *Glu-D1* y *Glu-B3* a la calidad de la masa del trigo harinero. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35: 135-142.
21. Mondragón S. L. 2006. Parámetros de estabilidad para evaluar trigo cristalino en el Estado de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. 73 p.
22. Osborne T.B. 1924. The vegetable proteins. London. Longmans, Green. pp 440.
23. Payne P. I., Nightingale M. A., Krattiger A.F., and Holt L. M. 1983. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *Cereal Research Communications* 40:51-65.
24. Peña R. J., González S. H., and Cervantes F. 2004. Relationship between *Glu-D1* / *Glu-B3* allelic combinations and bread-making quality-related parameters commonly used in wheat breeding. In: Masci S., Lafiandra, D. (eds.). Proceedings of the 8th Gluten Workshop. Bitervo, Italy 156-157 p.
25. Peña R. J., Pérez H. P., Villaseñor E., Gómez V. M. M., Mendoza L. M. A., y Monterde G. R. 2007. Calidad de la cosecha del trigo en México. Ciclo otoño-invierno 2005-2006. Publicación Especial del CONASIST, Av. Cuauhtémoc No. 1617, Mezzanine, Col. Sta. Cruz Atoyac, México, D. F. 24 p.

26. Peña R. J., Pérez H. P., Villaseñor. E., Gómez V. M. M., y Mendoza L. M.A. 2008. Calidad de la cosecha de trigo en México. Ciclo primavera-verano 2006. Publicación Especial del CONASIST CONATRIGO, Tajín No. 567. Col. Vértiz Narvarte, Delegación Benito Juárez C.P. 03600 México, D.F. 28 p.
27. Peña R. J., Trethowan R., Pfeiffer W. H., and Ginkel M. V. 2002. Quality improvement in Wheat. Compositional, genetic and environmental factors. *Journal Crop Productions*. 5. 1-17
28. Pinzón M. D. L. 2011. Tesis doctoral. Obtención de genes de lipasas mediante genotecas de ambientes termales. Septiembre. Instituto Tecnológico de Veracruz. 45 p.
29. Riquelme B. I. y Espitia R. E. E. 2010. Diferencias reológicas de la masa de trigo en líneas recombinantes. II. Relación con combinaciones de los Loci *Glu-1* y *Glu-3*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valle de México. 56230. Chapingo, Estado de México. *Agrociencia*. 44: 187-195.
30. SAGARPA 2010. El cultivo del trigo. (En línea). Disponible en: <http://www.oeidrussbc.gob.mx/sispro/trigobc/Descargas/ElCultivoTrigo.pdf>. Consultado en Enero. 2016.
31. Salazar Z. A. 2000. Calidad industrial del trigo para su Comercialización. En: Villaseñor Mir H. E. y Espitia Rangel. El trigo de temporal en México. INIFAP Campo Experimental Valle de México. Chapingo, Estado de México. México. 289-311 p.
32. Shewry P. R., and Halford N. G. 2002. Genetics of wheat gluten proteins *Advances in Genetics*. 49: 111-184.
33. Singt N. K., Shepherd K. W., and Cornish B. G. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science* 14: 203-208.
34. Zhang X., Jinl H., Zhang Y., Liu D., Li G., Xia X., Hel Z., and Zhang A. 2012. Composition and functional analysis of low-molecular weight glutenin alleles whit Aroona near isogenic lines of bread wheat. *BMC Plant Biology* 12: 243.