

# SOBRE MOLECULAS, GENES Y PLANTAS *biología molecular del endospermo de los cereales*

*MOLECULAR BIOLOGY OF CEREAL ENDOSPERM ON MOLECULES, GENES AND PLANTS.*

F. GARCIA OLMEDO, P. CARBONERO, C. ARAGONCILLO\*\*,  
G. SALCEDO, C. HERNANDEZ LUCAS, R. SANCHEZ-MONGE,  
A. DELIBES, J. PAZ-ARES, F. PONZ

EL PRESENTE ARTICULO REVISA SUCINTAMENTE UN CONJUNTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LA BIOLOGIA MOLECULAR DE UN TEJIDO VEGETAL, EL ENDOSPERMO DE LOS CEREALES, QUE PUEDE CONSIDERARSE EL PRODUCTO COMESTIBLE MAS IMPORTANTE A ESCALA MUNDIAL. EN DICHAS INVESTIGACIONES SE HAN UTILIZADO TECNICAS BIOQUIMICAS, CITOGENETICAS Y DE INGENIERIA GENETICA PARA EL CONOCIMIENTO BASICO Y LA MANIPULACION PRACTICA DEL CONJUNTO DE ESPECIES CULTIVADAS DENOMINADAS CEREALES. LOS ESTUDIOS REALIZADOS HAN ABARCADO LOS SIGUIENTES ASPECTOS PRINCIPALES: PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PROTEINAS, CARACTERIZACION Y LOCALIZACION CROMOSOMICA DE GENES ESTRUCTURALES Y REGULADORES INVOLUCRADOS EN EL CONTROL GENETICO DE LA COMPOSICION BIOQUIMICA DEL TEJIDO, CLONAJE DE GENES DE PLANTAS EN BACTERIAS, Y TRANSFERENCIA GENICA ENTRE ESPECIES VEGETALES. LAS APLICACIONES PRACTICAS DERIVADAS HASTA AHORA INCLUYEN DESDE METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE ESPECIES, VARIETADES, Y MATERIAS PRIMAS, A LA TRANSFERENCIA DE GENES DE INTERES AGRONOMICO DESDE ESPECIES SILVESTRES A CULTIVADAS. A MEDIO PLAZO, LOS AVANCES REALIZADOS EN LA MANIPULACION *IN VITRO* DE GENES VEGETALES SERAN DE UTILIDAD PRACTICA EN LA APLICACION DE LA INGENIERIA GENETICA A LA MEJORA VEGETAL.

THIS IS A CONCISE REVIEW OF RESEARCH CARRIED OUT BY US ON THE MOLECULAR BIOLOGY OF A PLANT TISSUE, THE CEREAL ENDOSPERM, WHICH CAN BE CONSIDERED AS THE MOST IMPORTANT EDIBLE FOOD ON A WORLD SCALE.

BIOCHEMICAL, CYTOGENETIC AND GENETIC ENGINEERING TECHNIQUES HAVE BEEN USED TO ACQUIRE BASIC KNOWLEDGE AND PRACTICAL KNOW-HOW FOR THE GENETIC MANIPULATION OF A GROUP OF CULTIVATED SPECIES KNOWN AS CEREALS.

THE FOLLOWING ASPECTS HAVE BEEN STUDIED: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEINS, CHARACTERIZATION AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF STRUCTURAL AND REGULATOR GENES INVOLVED IN THE GENETIC CONTROL OF THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE TISSUE, CLONING OF PLANT GENES IN BACTERIA AND GENE TRANSFER AMONG PLANT SPECIES.

THE PRACTICAL APPLICATIONS OBTAINED SO FAR, RANGE FROM METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF SPECIES, VARIETIES, AND RAW MATERIALS, TO THE TRANSFER OF GENES WITH AN AGRONOMIC VALUE FROM WILD TO CULTIVATED SPECIES. IN THE NEAR FUTURE, ADVANCES IN THE "IN VITRO" MANIPULATION OF PLANT GENES WILL BE USEFUL IN CONNECTION WITH THE APPLICATION OF GENETIC ENGINEERING TO PLANT BREEDING.

F. García Olmedo, P. Carbonero, C. Aragoncillo\*\*, G. Salcedo, C. Hernández Lucas,  
R. Sánchez-Monge, A. Delibes, J. Paz-Ares, F. Ponz.  
Departamento de Bioquímica. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

\*\* Cátedra de Química General y Bioquímica. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.

Un solo 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 una descripción más detallada y rigurosa de dichas investigaciones a otras revisiones aparecidas recientemente<sup>1-6</sup>.

### FENOTIPO MOLECULAR, CALIDAD NUTRITIVA Y CALIDAD TECNOLÓGICA

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 (1,0-15%), 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 solo 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 resaltar 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 inhibitorias 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<sup>7 8 12 16 20 21 23 25 29</sup> y, muy especialmente, de proteínas<sup>9 11 13 17 18 31 36 38 40 43 46 47 49 50 53 56 60</sup>, tanto de especies cultivadas, tales como trigo, cebada, centeno y avena, como de especies silvestres relacionadas con estas (*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 de elevado número de proteínas individuales. Esto ha permitido la tipificación de tres clases o proteínas importantes y comunes en distintas especies de cereales: las tioninas<sup>10 14 24 29 32 45</sup>, las proteínas CM<sup>13 17 18 36 43 47 50 53 60</sup> y las prolaminas de bajo peso molecular<sup>38 47 49</sup>.

### GENES Y MAPAS GENÉTICOS

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 métodos electroforéticos e inmunológicos un elevado número de cultivares de las especies cultivadas y de accesiones de las especies silvestres, representativas de las áreas geográficas de cultivo y distribución<sup>11 12 18</sup>. Estas prospecciones han contribuido al esclarecimiento de las relaciones evolutivas de las distintas especies<sup>13 19 22 26 35</sup> 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<sup>34 58</sup>.

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

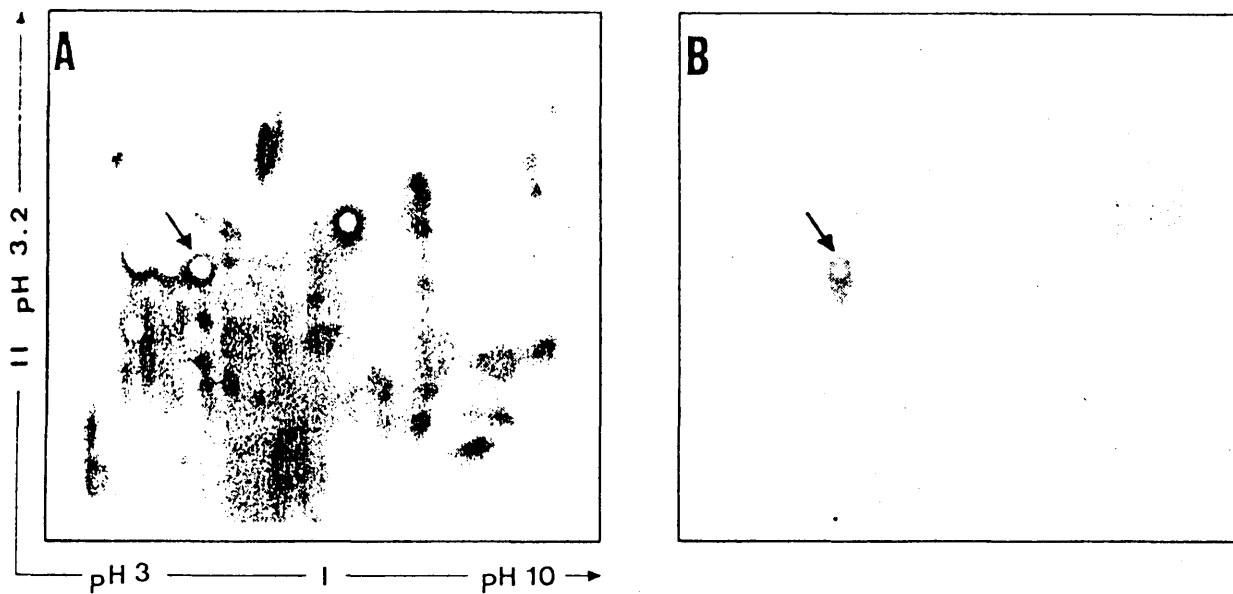


FIGURA 1

La purificación de proteínas implica separar componentes individuales de una mezcla muy heterogénea, mediante una serie de técnicas tales como extracción selectiva, precipitación por sales, filtración molecular, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis o electroenfoque preparativos y otras. En el ejemplo que presentamos en esta Figura se parte de un extracto salino de endospermo de cebada con numerosos componentes (A), que aquí se han analizado por electroenfoque (1.ª dimensión) x electroforesis (2.ª dimensión), y se obtienen componentes individuales, cuya pureza se comprueba por la misma técnica analítica (B).

CROMOSOMA 4A DE TRIGO  
Gen CM3; Proteína CM3  
CROMOSOMA 4H DE CEBADA  
Gen CMd; Proteína CMd

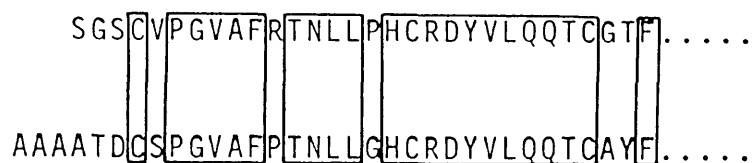


FIGURA 2

Las proteínas purificadas según se indica en la Figura 1, se caracterizan químicamente, determinándose sus pesos moleculares, su composición en aminoácidos y el orden o secuencia de éstos en la molécula. La localización cromosómica de los genes que codifican cada proteína puede investigarse aplicando la técnica analítica de la Fig. 1A, a series de líneas genéticas en las que faltan cromosomas o segmentos cromosómicos concretos y comprobando que la ausencia de un determinado segmento cromosómico está asociada a la ausencia de un producto génico (proteína) concreto. En esta Figura representamos las secuencias de aminoácidos amino-terminales de dos proteínas: una de trigo, CM3, cuyo gen está situado en el cromosoma 4A y otra de cebada, CMd, cuyo gen se localiza en el cromosoma 4H. La evidente homología entre las dos secuencias ha permitido establecer la equivalencia y origen común de los cromosomas 4A y 4H de trigo y cebada, respectivamente<sup>60</sup>. Cada letra representa un aminoácido. Las partes idénticas en ambas secuencias están recuadradas.

la expresión de dichos genes, y nos ha conducido a la elaboración de mapas genéticos más o menos rudimentarios para estas especies<sup>1-6 19 37 41 57 59</sup>.

### EXPRESION GENICA DURANTE EL DESARROLLO DEL GRANO

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 dife-

renciadas. 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.

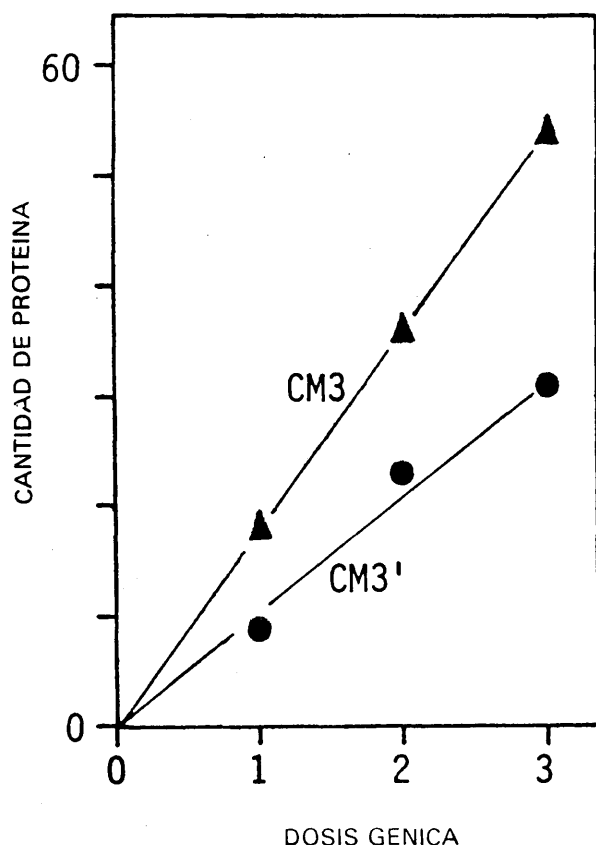


FIGURA 3

La cantidad de una proteína dada acumulada en el tejido aumenta linealmente con el número de copias de su gen estructural pero, tal como se muestra en el ejemplo presentado en esta Figura, la respuesta a la dosis genética puede ser alterada por elementos genéticos ligados al propio gen estructural. Una variante de la proteína CM3, denominada CM3', se sintetiza y acumula en menor proporción (~50%) que la proteína CM3. El conocimiento del control genético de la acumulación de las distintas proteínas ha de permitir la manipulación práctica de la composición final del tejido.

El análisis bioquímico y genético del tejido maduro ha permitido esclarecer algunos aspectos notables sobre 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 de producto génico (proteína) varía linealmente con el número de copias del gen estructural<sup>33 34</sup>. Sin embargo, la magnitud de la respuesta a la dosis genética puede ser alterada por factores genéticos localizados en el mismo (cis) o en distinto (trans) cromosoma que el gen estructural<sup>33 34</sup>.

Con objeto de precisar nuestro conocimiento sobre la expresión génica en este tejido, hemos seguido el proceso de desarrollo, determinando los períodos de expresión de los distintos grupos de genes, y hemos estudiado la biosíntesis, transporte y deposición de las correspondientes proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>48 52 54 55</sup>. 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 mono-específicos<sup>52 55</sup>. 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.

## CLONAJE DE GENES DE PLANTAS EN BACTERIAS

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 métodos diferentes: clonando un DNA transcrito *in vitro* de un RNA mensajero parcialmente purificado (cDNA) mediante un vector plasmídico (p.ej. plásmido pBR322), o clonando directamente DNA del genoma vegetal en un vector fágico (p.ej. fago λ). Siguiendo el primer tipo de metodología se han clonado en nuestro laboratorio los cDNA correspondientes a algunas de las proteínas más importantes estudiadas por nosotros [<sup>52 55</sup>, y manuscritos en preparación]. 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.

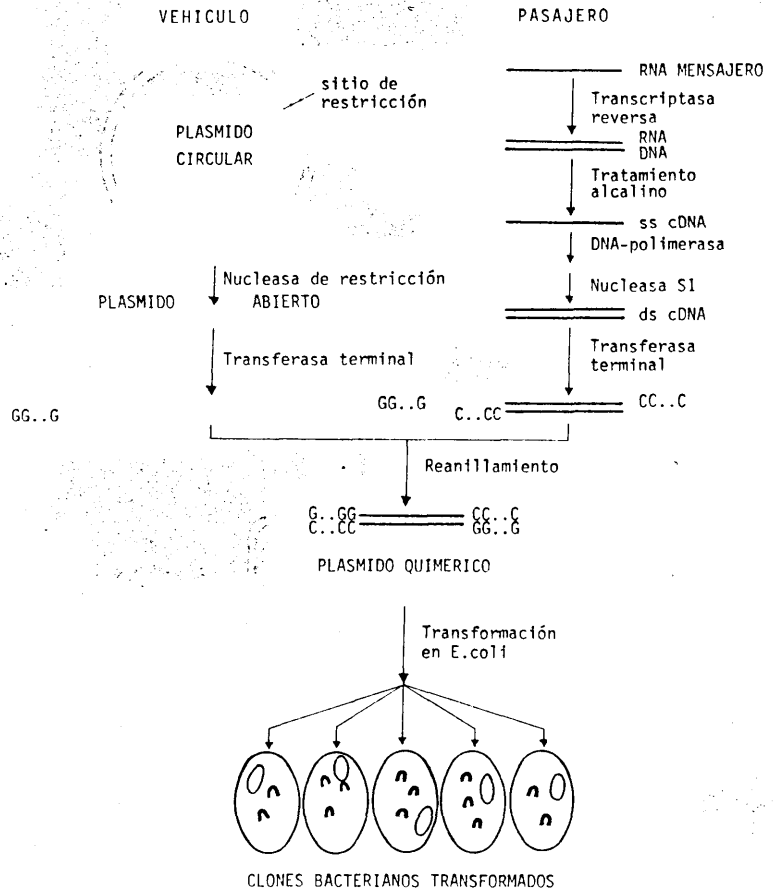
La disponibilidad de genes de cereales clonados en bacterias nos da la posibilidad de producirlos en cantidades sustanciales de forma pura, de modificarlos *in vitro* y, eventualmente, de reinsertarlos en plantas, usando los vectores adecuados. También debe permitir el estudio de los mecanismos reguladores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

## TRANSFERENCIA GENICA ENTRE ESPECIES VEGETALES

Con anterioridad al desarrollo de las técnicas de transferencia génica *in vitro* que acabamos de esbozar y que todavía presentan algunos problemas por resolver, nosotros veníamos investigando 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

FIGURA 4

Se representa un esquema simplificado para clonar DNA que codifica para proteínas de cebada. Partiendo de un RNA mensajero purificado, se obtiene un DNA de cordón sencillo (ssDNA) complementario al mensajero, y a continuación se obtiene un DNA de doble cordón (ds cDNA). A este ds cDNA se le añaden prolongaciones homopoliméricas de cordón sencillo (poli C). El plásmido pBR322, que va a actuar como vehículo o vector, es cortado con una nucleasa de restricción específica y, una vez linealizado, se le añaden prolongaciones homopoliméricas complementarias de las añadidas al ds cDNA que va a hacer de "pasajero" (poli G). Guanina (G) es complementaria de citosina (C), lo que permite el reanillamiento de vector y pasajero. A continuación, el plásmido quimérico producido por reanillamiento es introducido en la bacteria *Escherichia coli* (transformación), donde se replica autónomamente y se transmite a la descendencia de tal modo que cada célula transformada dará lugar a un clon portador del DNA pasajero. Se comprueban aquellos clones que efectivamente llevan un DNA complementario al RNA mensajero inicial por hibridación RNA (radiactivo) DNA: en condiciones apropiadas, sólo los clones portadores retendrán la sonda radiactiva y podrán ser detectados por autoradiografía.



híbridas adultas. Las plantas híbridas son en general andoestériles 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, 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*<sup>15 27 28 30 44 51 60</sup>. 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 cultivares 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 y 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<sup>22</sup>.

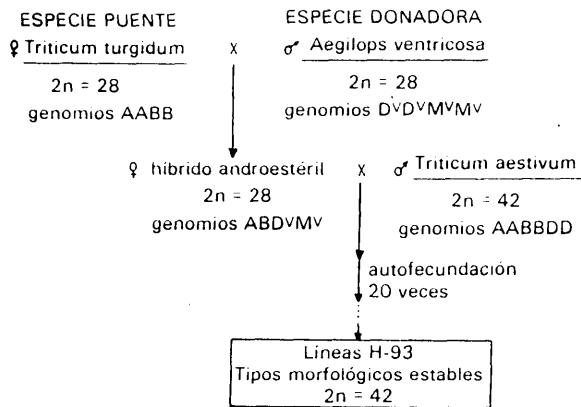
codón de iniciación

ATG	GTG	TGT	TTA	CTT	ATA	CTG	GGG	TTG	GTT	CTC	GAA	CAG	GTG	CAA	GTA
	<b>LYS</b>	<b>SER</b>	<b>CYS</b>	<b>CYS</b>	<b>ARG</b>	<b>SER</b>	<b>THR</b>	<b>LEU</b>	<b>GLY</b>	<b>ARG</b>	<b>ASN</b>	<b>CYS</b>	<b>TYR</b>	<b>ASN</b>	
GAA	GGC	AAG	AGT	TGC	TGC	AGG	AGC	ACC	CTA	GGA	AGA	AAC	TGC	TAC	AAC
<b>LEU</b>	<b>CYS</b>	<b>ARG</b>	<b>VAL</b>	<b>ARG</b>	<b>GLY</b>	<b>ALA</b>	<b>GLN</b>	<b>LYS</b>	<b>LEU</b>	<b>CYS</b>	<b>ALA</b>	<b>GLY</b>	<b>VAL</b>	<b>CYS</b>	<b>ARG</b>
CTT	TGC	CGC	GTC	CGT	GGT	GCT	CAG	AAG	TTA	TGC	GCA	GGC	GTC	TGT	AGG
<b>CYS</b>	<b>LYS</b>	<b>LEU</b>	<b>THR</b>	<b>SER</b>	<b>SER</b>	<b>GLY</b>	<b>LYS</b>	<b>CYS</b>	<b>PRO</b>	<b>THR</b>	<b>GLY</b>	<b>PHE</b>	<b>PRO</b>	<b>LYS</b>	<b>LEU</b>
TGT	AAA	CTC	ACA	AGT	AGC	GGA	AAA	TGC	CCT	ACA	GGC	TTC	CCC	AAA	TTG
<b>ALA</b>	<b>LEU</b>	<b>VAL</b>	<b>SER</b>	<b>ASN</b>	<b>SER</b>	<b>ASP</b>	<b>GLU</b>	<b>PRO</b>	<b>ASP</b>	<b>THR</b>	<b>VAL</b>	<b>LYS</b>	<b>TYR</b>	<b>CYS</b>	<b>ASN</b>
GCC	CTT	GTG	TCC	AAC	TCA	GAT	GAA	CCA	GAC	ACC	GTC	AAG	TAT	TGC	AAC
<b>LEU</b>	<b>GLY</b>	<b>CYS</b>	<b>ARG</b>	<b>ALA</b>	<b>SER</b>	<b>MET</b>	<b>CYS</b>	<b>ASP</b>	<b>TYR</b>	<b>MET</b>	<b>VAL</b>	<b>ASN</b>	<b>ALA</b>	<b>ALA</b>	<b>ALA</b>
TTG	GGG	TGT	AGG	GCT	TCC	ATG	TGT	GAC	TAC	ATG	GTC	AAC	GCA	GCT	GCT
<b>ASP</b>	<b>ASP</b>	<b>GLU</b>	<b>GLU</b>	<b>MAT</b>	<b>LYS</b>	<b>LEU</b>	<b>TYR</b>	<b>LEU</b>	<b>GLU</b>	<b>ASN</b>	<b>CYS</b>	<b>GLY</b>	<b>ASP</b>	<b>ALA</b>	<b>CYS</b>
GAC	GAC	GAA	GAA	ATG	AAA	CTC	TAT	TTG	GAA	AAT	TGT	GGT	GAT	GCT	TGT
<b>VAL</b>	<b>ASN</b>	<b>PHE</b>	<b>CYS</b>	<b>ASN</b>	<b>GLY</b>	<b>ASP</b>	<b>ALA</b>	<b>GLY</b>	<b>LEU</b>	<b>THR</b>	<b>SER</b>	<b>LEU</b>	<b>THR</b>	<b>ALA</b>	<b>STOP</b>
GTC	AAT	TTC	TGC	AAC	GGT	GAT	GCT	GGC	CTC	ACA	TCC	CTT	ACT	GCC	TAA...

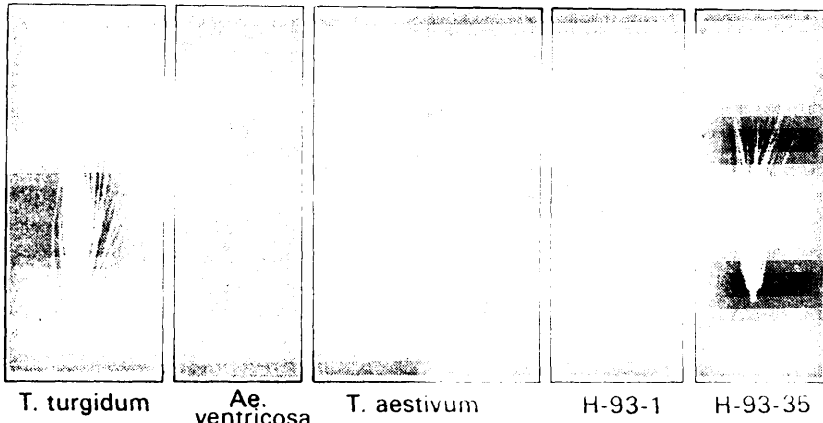
FIGURA 5

Un cDNA clonado según se indica en la Figura 4 puede ser producido en cantidades grandes y su secuencia de bases purinicas y pirimidinicas (A, T, G, C) puede ser determinada. En el ejemplo de esta Figura, mostramos la secuencia de un cDNA (letras negras) correspondiente a una proteína de cebada. Utilizando la clave genética se ha deducido la secuencia de aminoácidos de la correspondiente proteína. En letras rojas se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína madura, que ha sido determinada de forma directa. Dicha proteína se sintetiza, por tanto, como un precursor de mayor tamaño, del que sabemos que es procesado en dos etapas: en la primera se elimina la secuencia en azul y en la segunda se elimina la secuencia en verde. A = adenina; T = timina; G = guanina; C = citosina; cada aminoácido está representado por tres letras derivadas de su nombre en inglés.

## A. ESQUEMA DE TRANSFERENCIA



## B. MORFOLOGIA DE ESPIGAS



## C. CONSTITUCION CROMOSOMICA

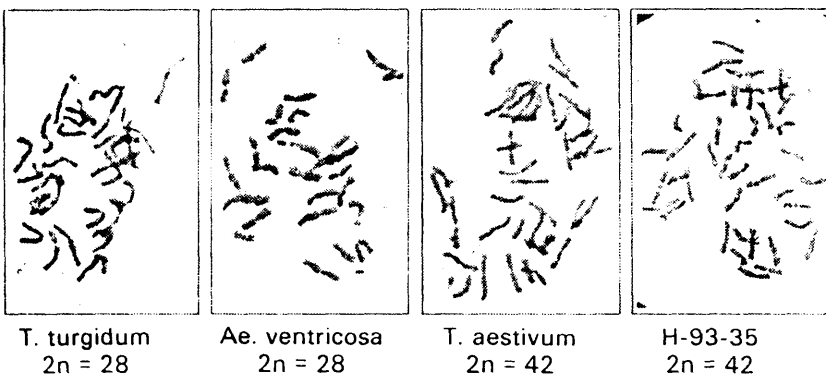


FIGURA 6

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 DV y MV de la especie donadora. Debido a homología parcial entre cromosomas del genoma DV de la especie donadora y del D de la receptora, la frecuencia de genes de DV en las líneas H-93 fue mayor (30-60%) que la de genes de MV (< 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 (adaptado de ref. 51). B) Morfología de las espigas. C) Constitución cromosómica.

## APLICACIONES PRACTICAS: PRESENTE Y FUTURO

El interés práctico inmediato de los resultados reseñados en el apartado anterior es evidente y ha sido refrendado por los comentarios editoriales de revistas científicas y técnicas importantes<sup>6,2</sup> y por las demandas de material obtenido por nosotros, recibidas de mejoradores institucionales y de prestigiosas empresas internacionales de semillas<sup>6,3-6,4</sup>.

Los estudios sobre la constitución bioquímica del endospermo y sobre su variabilidad intra e interespecifica han dado lugar a diversas aplicaciones en relación con la certificación de semillas, la identificación de variedades, y la protección de los derechos de obtentor, así como en la detección e identificación legal de materias primas en productos elaborados<sup>7-12, 39</sup>.

La irrupción de las nuevas técnicas de ingeniería genética en la manipulación de plantas cultivadas puede llegar a ser revolucionaria. Sólo muy recientemente se ha logrado la inserción y expresión en plantas de los primeros genes foráneos y este acontecimiento abre perspectivas insospechadas para el conocimiento básico y la mejora práctica de las plantas cultivadas. Aparte de su interés intrínseco, nuestros estudios sobre expresión génica durante el desarrollo y sobre el clonaje de genes de plantas en bacterias constituyen etapas obligadas en esta apasionante nueva aventura.

## AGRADECIMIENTO:

Los trabajos aquí resumidos han sido realizados con ayudas de las siguientes instituciones: USDA; INIA; Min.Ed. y C.; CAICYT; FAO/IAEA; Fundación March; Fundación Areces; Caja de Ahorros de Madrid; JEN. La asistencia técnica ha estado a cargo de C. Rojas, J. García, D. Lamoneda, F. García y A. García.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. F. García Olmedo y P. Carbonero. 1983. El control genético de las proteínas del trigo. INVESTIGACION Y CIENCIA (Scientific American) 81, 96-104.
2. F. García Olmedo, P. Carbonero y D.L. Jones. 1982. 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, USA.
3. F. García Olmedo, P. Carbonero, C. Aragoncillo y G. Salcedo. 1978. 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.
4. F. García Olmedo, P. Carbonero, C. Aragoncillo, R. Fernández de Caley y J.V. Torres. 1976. Expression of homoeologous molecular systems in wheat allopolyploids. En HETEROISIS IN BREEDING, pp. 51-57. EUCARPIA, Akademiai Kiado, Budapest, Hungría.
5. D.D. Kasarda, J.E. Bernardin y C.C. Nimmo. 1976. Wheat proteins. En ADVANCES IN CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, Vol. I, pp. 158-236. Am. Assoc. Cereal Chem. Inc.: St. Paul, MN, USA.
6. C.F. Konzak. 1977. Genetic control of the content, amino acid composition, and processing of proteins in wheat. ADVANCES IN GENETICS, 19, 407-582.
7. R. García Faure, F. García Olmedo y J.M. Vallejo. 1969. J. SCI. FOOD AGRIC. 19, 322-324.
8. F. García Olmedo. 1969. NATURE 220, 1144-1145.
9. R. García Faure, J.M. Merck y F. García Olmedo. 1969. CEREAL CHEMISTRY 46, 621-625.
10. P. Carbonero y F. García Olmedo. 1969. EXPERIENTIA 25, 1110.
11. F. García Olmedo y R. García Faure. 1969. LEBENSMITTEL WISSENSCHAFT UND TECHNOLOGIE 2, 94-96.
12. F. García Olmedo. 1969. BERICHT UBER DIE DURUM UND TEIGWAREN TAGUNG 27, 39-45.

13. F. García Olmedo y P. Carbonero. 1970. PHYTOCHEMISTRY 9, 1495-1497.
14. R. Fernández de Caleyá, B. González Pascual, F. García Olmedo y P. Carbonero. 1972. APPLIED MICROBIOLOGY 23, 998-1001.
15. A. Delibes y F. García Olmedo. 1973. PROC. 4th WHEAT GENET. SYMP. pp. 161-166.
16. J.V. Torres y F. García Olmedo. 1974. PLANT SCI. LETTERS 3, 213-217.
17. C. Aragoncillo, M.A. Rodríguez Loperena, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1975. ANAL. BIOCHEM. 63, 603-606.
18. M.A. Rodríguez Loperena, C. Aragoncillo, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1975. PHYTOCHEMISTRY 14, 1219-1223.
19. C. Aragoncillo, M.A. Rodríguez Loperena, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1975. THEOR. APPL. GENET. 45, 322-326.
20. J.V. Torres y F. García Olmedo. 1975. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 409, 367-375.
21. P. Carbonero, J.V. Torres y F. García Olmedo. 1975. FEBS LETTERS 56, 198-201.
22. M.A. Rodríguez Loperena, C. Aragoncillo, J.V. Torres, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1975. PLANT SCI. LETTERS 5, 387-393.
23. J.V. Torres, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1976. PHYTOCHEMISTRY 15, 677-680.
24. R. Fernández de Caleyá, C. Hernández Lucas, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1976. GENETICS 83, 687-699.
25. C. Hernández Lucas, R. Fernández de Caleyá, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1977. GENETICS 85, 521-527.
26. F. García Olmedo, P. Carbonero, C. Aragoncillo, R. Fernández de Caleyá, M.A. Rodríguez Loperena, V. Torres, A. Delibes, G. Salcedo, R. Sánchez-Monge y C. Hernández Lucas. 1977. Ingeniería molecular en Triticum. En AVANCES DE LA BIOQUIMICA EN ESPAÑA. Volumen en Honor al Profesor Severo Ochoa. pp. 51-63. Fundación J. March. Ed. Salvat.
27. A. Delibes, F. Dosba, G. Doussinault, F. García Olmedo y R. Sánchez-Monge. 1977. PROC. 8th EUCARPIA CONGRESS, pp. 91-97.
28. A. Delibes, R. Sánchez-Monge y F. García Olmedo. 1977. PROC. 8th EUCARPIA CONGRESS, pp. 81-89.
29. C. Hernández Lucas, R. Fernández de Caleyá, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1977. J. AGRIC. FOOD CHEM. 25, 1287-1289.
30. F. García Olmedo, A. Delibes y R. Sánchez-Monge. 1977. Introducción de genes extraespecíficos en el trigo. En SERIE UNIVERSITARIA, Vol. 26, pp. 31-39. Fundación J. March.
31. C. Hernández Lucas, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1978. J. AGRIC. FOOD CHEM. 26, 794-796.
32. P. Carbonero, F. García Olmedo, C. Hernández Lucas y R. Fernández de Caleyá. 1978. PROC. 5th INT. WHEAT GENET. SYMP. pp. 453-463.
33. C. Aragoncillo, M.A. Rodríguez Loperena, G. Salcedo, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1978. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 75, 1446-1450.
34. G. Salcedo, C. Aragoncillo, M.A. Rodríguez Loperena, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1978. GENETICS 89, 147-156.
35. F. García Olmedo, P. Carbonero, C. Aragoncillo y G. Salcedo. 1978. EXPERIENTIA 34, 332-333.
36. G. Salcedo, M.A. Rodríguez Loperena y C. Aragoncillo. 1978. PHYTOCHEMISTRY 17, 1491-1494.
37. R. Sánchez-Monge, A. Delibes, C. Hernández Lucas, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1979. THEOR. APPL. GENET. 54, 61-63.
38. G. Salcedo, J. Prada y C. Aragoncillo. 1979. PHYTOCHEMISTRY 18, 725-727.
39. F. García Olmedo y R. García Faure. O.M. 2121 (Presidencia) B.O.E. 206-207 (28-29 Agosto 1979), pp. 251-2606. Detección y cuantificación de harinas de trigo común ("Triticum vulgare") en sémolas y pastas alimenticias. Según F.G.O. y R.G.F. A new method for estimation of common wheat in pasta products. LEBENSM. WIS. U. TECHNOL. Vol. 2, 94-96 (1969).
40. P. Carbonero, F. García Olmedo y C. Hernández Lucas. 1980. J. AGRIC. FOOD CHEM. 28, 399-402.
41. G. Salcedo, J. Prada, R. Sánchez-Monge y C. Aragoncillo. 1980. THEOR. APPL. GENET. 56, 65-69.
42. F. García Olmedo y P. Carbonero. 1980. PROC. 3rd INT. WHEAT CONFERENCE pp. 664-670.
43. G. Salcedo, R. Sánchez-Monge, A. Argamentaría y C. Aragoncillo. 1980. PLANT SCI. LETTERS 19, 109-119.
44. A. Delibes, F. Dosba, C. Otero y F. García Olmedo. 1981. THEOR. APPL. GENET. 60, 5-10.
45. L. Carrasco, D. Vázquez, C. Hernández Lucas, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1981. EUR. J. BIOCHEM. 116, 185-189.
46. J. Prada, R. Sánchez-Monge, G. Salcedo y C. Aragoncillo. 1982. PLANT SCI LETTERS 25, 281-289.
47. C. Aragoncillo, R. Sánchez-Monge y G. Salcedo. 1981. J. EXP. BOT. 32, 1279-1286.
48. F. García Olmedo, P. Carbonero, C. Hernández Lucas, F. Ponz, O. Vicente, y J.M. Sierra. 1981. ABHDLG. AKAD. WISS. DDR, ABT. MATH., NATURIWSS., TECHN. 5, 219-220.
49. G. Salcedo, R. Sánchez-Monge, A. Argamentaría y C. Aragoncillo. 1982. J. AGRIC. FOOD CHEM. 30, 1155-1157.
50. G. Salcedo, R. Sánchez-Monge y C. Aragoncillo. 1982. J. EXP. BOT. 33, 1325-1331.
51. G. Doussinault, A. Delibes, R. Sánchez-Monge y F. García Olmedo. 1983. NATURE 303, 698-700.
52. J. Paz-Ares, F. Ponz, C. Aragoncillo, C. Hernández Lucas, G. Salcedo, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1983. PLANTA 157, 74-80.
53. J. Paz-Ares, C. Hernández Lucas, G. Salcedo, C. Aragoncillo, F. Ponz y F. García Olmedo. 1983. J. EXP. BOT. 34, 388-395.
54. F. García Olmedo, P. Carbonero, C. Hernández Lucas, J. Paz-Ares, F. Ponz, O. Vicente y J.M. Sierra. 1983. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 740, 52-56.
55. F. Ponz, J. Paz-Ares, C. Hernández Lucas, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1983. EMBO JOURNAL 2, 1035-1040.
56. F. Ponz, C. Hernández Lucas, P. Carbonero y F. García Olmedo. 1984. PHYTOCHEMISTRY 23, 2179-2181.
57. F. García Olmedo, P. Carbonero, G. Salcedo, C. Aragoncillo, C. Hernández Lucas, J. Paz-Ares y F. Ponz. Kulturpflanze 32 (en prensa).
58. G. Salcedo, P. Fra-Mon, J.L. Molina Cano, C. Aragoncillo y F. García Olmedo. 1984. THEOR. APPL. GENET. 68, 53-59.
59. P. Fra-Mon, G. Salcedo, C. Aragoncillo y F. García Olmedo. 1984. THEOR. APPL. GENET. 68, 167-172.
60. P.R. Shewry, D. Lafandra, G. Salcedo, C. Aragoncillo, F. García Olmedo, E.J.-L. Lew, M.D. Dieller y D.D. Kasarda. 1984. FEBS LETTERS 175, 359-363.
61. P. Carbonero y F. García Olmedo. Transferencia génica en plantas. En BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR. Ed. Salvat (en prensa).
62. Anon. LA RECHERCHE (Oct. 1983). BIOFUTUR (Sept. 1983).
63. USDA, Pullman, Wash. USA; Wash. State Univ. USA; INRA, Rennes, Francia; Royal Botanical Gardens, Kew, Reino Unido; Inst. de Genética, DDR; Univ. Tecn. Munich, FRG; etc.
64. Nickerson RPB Ltd; Gavodour-Cargill; Miln Masters; y otras.