

ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS INFRAESPECI-
FICAS EN *TRIFOLIUM SUBTERRANEUM* L.
MEDIANTE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

por

J. PASTOR PINEIRO



PUBLICADO EN
ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA
TOMO XXXI, Núms. 9-10.—MADRID, 1972

ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS INFRAESPECÍFICAS EN *TRIFOLIUM SUBTERRANEUM* L. MEDIANTE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

por

J. PASTOR PINEIRO

SUMMARY

STUDY OF INFRAESPECIFIC DIFFERENCES IN *TRIFOLIUM SUBTERRANEUM* L. BY PROTEIN ELECTROPHORESIS

Proteins of seeds from eight Australian cultivars of *Trifolium subterraneum* L. have been separated using acrylamide gel electrophoresis technique. Cultivars belong to the three existing subspecies according to Katznelson and Morley (1965).

The number of bands detected by this procedure was high, as the diagram shows, and all the cultivars could be differentiated by their bands.

Results were reproducible, even in cultivars in which seeds of different origin and/or year were used. The contrast was remarkable between the constancy of the pattern within every cultivar and the variability of patterns among cultivars.

Coefficients of similarity of protein bands among different cultivars have been established.

The results obtained are discussed in relation to the ones obtained by morphological and genetic studies by other authors.

The interest of the method for the quick identification of cultivars is pointed out.

El problema de la subespeciación y variación de *Trifolium subterraneum* L. ha sido estudiado por varios autores. Katznelson y Morley (12, 13), en su estudio taxonómico de las categorías infraespecíficas de *T. subterraneum* L., intentan asociar barreras reproductoras con características morfológicas. Los resultados obtenidos les han llevado a concluir que *Trifolium subterraneum* L. está constituido por tres subespecies simpátricas, *ssp. subterraneum*, *ssp. yanninicum* y *ssp. brachycalycinum*, que son, en un 95-100 por 100, interestériles. Atribuyen la esterilidad de los híbridos a cambios cromosómicos, traslocaciones e inversiones, asociados con las diferencias de tipo subespecífico o varietal.

Dada la gran dificultad que ofrece la separación de las distintas poblaciones del trébol subterráneo por sus caracteres morfológicos, pensamos

en la conveniencia de utilizar métodos quimiosistemáticos para estudiar las diferencias infraespecíficas en esta especie.

La electroforesis de proteínas se encuentra entre las técnicas que han experimentado un mayor incremento en los últimos años en los estudios taxonómicos. La mayoría de los trabajos se efectúan en semillas por razones prácticas muy importantes, como son la estabilización de sustancias y la ventaja de no tener que realizar estudios a lo largo del ciclo de desarrollo.

Fox, Thurman y Boulter (9) obtuvieron las bandas de proteína en semillas de 17 especies de leguminosas y señalaron la utilidad potencial de la técnica. Boulter y col. (4, 5), al examinar por separado las fracciones de albúmina y globulina en semillas de leguminosas, observaron que las globulinas tienen un valor taxonómico a nivel de tribu y género. En el caso concreto de la tribu *Trifolioleas* el electroforegrama de globulinas se caracterizaba por la presencia de dos bandas fuertemente teñidas en la parte superior del gel. A nivel de género, Kleczowska (14) encontró que las proteínas de trébol podían separarse mediante electroforesis en 18 fracciones.

Adriaanse y Robbers (2) estudiaron las fracciones de albúmina y globulina en cultivares de *Vicia faba* L., *Pisum sativum* L. y *Phaseolus vulgaris* L. Las fracciones de albúmina eran características en las especies estudiadas, y de las tres fracciones de globulina obtenidas una de ellas diferenciaba mejor los cultivares.

Bingham y Yeh (3) hallaron, en 30 variedades de alfalfa y 26 diploides y tetraploides de *Medicago sativa* L. y *Medicago falcata* L., que las proteínas varietales de las semillas eran cualitativamente similares en 12 ó 13 bandas en todos los casos estudiados. Esta semejanza estaba de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios genéticos y citogenéticos. La mayoría de las variedades diferían más en los electroforegramas de las proteínas que en sus caracteres morfológicos. La variación detectada en las proteínas era suficiente para justificar el empleo del método en la identificación de variedades.

Vaughan y col. (21, 22) estudiaron las fracciones de albúmina y globulina de semillas de varias especies pertenecientes a los géneros *Brassica* y *Sinapis*, tanto por métodos serológicos como de electroforesis sobre geles, y correlacionaron los resultados obtenidos con los de la clasificación ya establecida.

Crowden y col. (6) examinaron 174 muestras de semillas de *Umbelliferas* pertenecientes a 99 especies y 39 géneros. La investigación reveló diferencias entre las especies examinadas, algunas de indudable significado taxonómico.

Silano y col. (19) estudiaron las fracciones de albúmina y globulina de diversas variedades de *Triticum aestivum* L. y *Triticum durum* Desf., no encontrando diferencias varietales muy marcadas, si bien las bandas de albúmina de movimiento rápido presentaban diferencias mayores.

En la separación electroforética de proteínas en otras partes de la planta señalamos los trabajos de Lee y Fairbrothers (16), efectuados en polen y semillas procedentes de cuatro taxa de *Typha*, utilizando métodos serológicos y electroforéticos. Los resultados obtenidos por ambos métodos eran complementarios y semejantes en el polen y las semillas. Zwartz (24) estudió diferencias varietales en la patata mediante la electroforesis de proteínas del tubérculo. Mc Cown y col. (17) investigaron las proteínas del tallo y hojas de tres clones de *Dianthus*. Hilty y Schmitthenner (10) compararon proteínas de la hoja de dos variedades de soja Harosoy y Harosoy 63, sin apreciar diferencias en la composición de proteínas de ambas variedades.

Nuestro propósito en este trabajo fue:

Identificar cultivares de *Trifolium subterraneum* L. utilizando la electroforesis de proteínas de semillas en geles de poliacrilamida.

Estudiar la similitud existente entre los proteinogramas de dichos cultivares.

Comparar, a nivel subespecífico, los datos obtenidos por el método quimiotaxonómico con la clasificación establecida por Katznelson y Morley.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron ocho cultivares australianos pertenecientes a las tres subespecies de *Trifolium subterraneum* L., *ssp. subterraneum* (Tallarook, Mount Barker, Geraldton, Woogenellup, Bacchus Marsh y Dwalganup), *Trifolium subterraneum* L. *ssp. brachycalycinum*, Katzn. et Morley (Clare), *Trifolium subterraneum* L. *ssp. yanninicum*, Katzn. et Morley (Yarloop).

Extracción de proteínas

Las proteínas se extrajeron de las semillas de los ocho cultivares. Las semillas fueron proporcionadas por el CSIRO y por el Instituto Nacional de Selección de Semillas y Plantas de Vivero. La cantidad de harina utilizada fue de 1 gr. por cada 20 ml. de solución extractora (tampón tris-glicina), por ser esta razón la más idónea para lograr la resolución del mayor número de bandas. El procedimiento seguido fue el utilizado por Boulter y col. (4).

Preparación de los geles y electroforesis

El método empleado fue el de Ornstein y Davis (18, 7), simplificado por Tombs y Akroyd (20) según lo señalado por Hjertén y col. (11),

quienes usaron en lugar de gel separador una solución de sacarosa al 40 por 100. Se colocaron 100 μ l de extracto de proteína en el extremo de cada gel. Como indicador se usó azul de bromofenol. Fox y col. (9) y Vaughan y col. (21), entre otros, efectuaron por separado la electroforesis de albúminas y globulinas, en tanto que Fairbrothers (8) no separó las dos fracciones antes de efectuar la electroforesis, obteniendo datos satisfactorios. Nosotros hemos seguido el criterio de este último autor.

Tinción y desteñido

Los geles se tiñeron con una solución de negro de almidón en metanol/agua/acético (5:5:1). A continuación se pasaron durante unas horas a la misma mezcla pero sin colorante. El colorante empleado da resultados análogos a los obtenidos mediante el uso de colorantes enzimáticos (6).

Examinamos los electroforegramas sobre una superficie luminosa y las bandas de proteína se fotografiaron y representaron mediante esquemas. Las fotografías y los densitogramas no recogen todas las bandas detectadas a simple vista, hecho ya señalado por varios autores (9, 20).

La posición de una banda de proteína después de efectuada la electroforesis se expresa por un valor Rp o posición relativa de la banda comparada con el frente de azul de bromofenol.

El criterio usado para estudiar las bandas de proteína, de acuerdo con Whitney y col. (23), ha sido considerarlas similares cuando se solapan en más de 50 por 100.

Para comparar dos taxa se calculó un índice de similitud de la siguiente forma:

$$\frac{\text{n.º de pares de bandas similares}}{\text{n.º de bandas diferentes} + \text{n.º de pares de bandas similares}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la separación de las bandas de proteína de los taxa investigados se muestran en la fig. 1. Cada representación de ésta se obtuvo a partir de 7 a 9 repeticiones. La diferente intensidad de tinción que presentan las bandas se expresa de la manera convencional que se indica en la figura. Esta diferencia de intensidad puede tener significado taxonómico, pero en el presente trabajo no la hemos tenido en cuenta. En el diagrama destaca el gran número de bandas que pueden apreciarse con el extracto utilizado.

Las oscilaciones entre los valores, una vez transformados en valores de Rp, son pequeñas dentro de cada cultivar y serie de experimentos, por lo que no se consideró necesario incluir los valores del error standard.

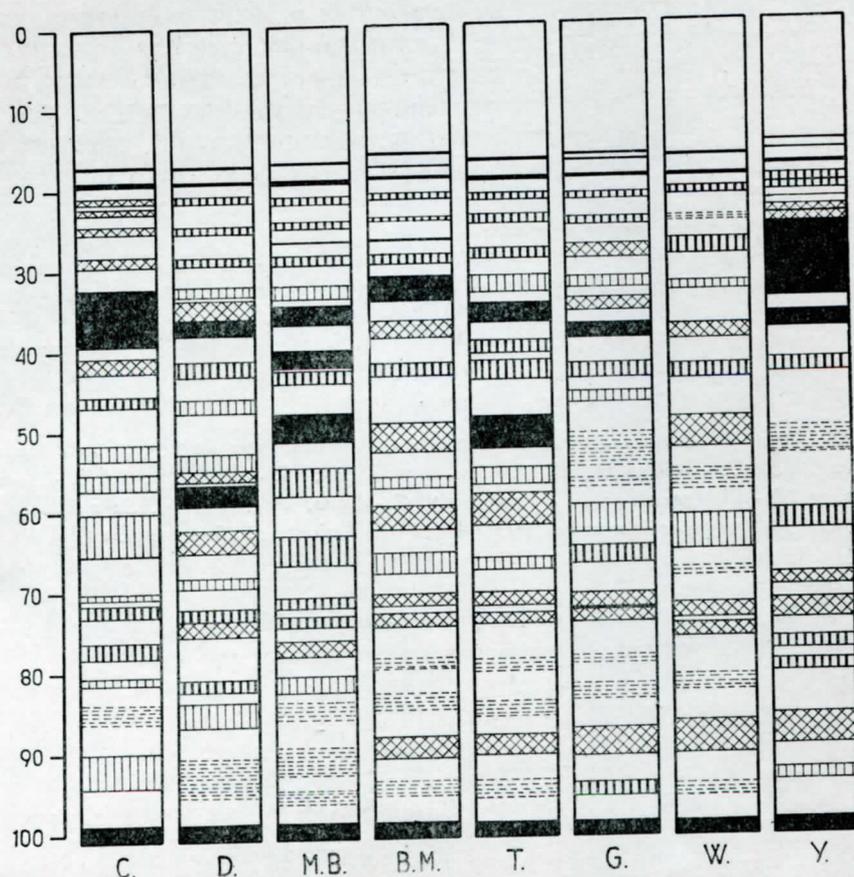


Fig. 1.—Diagrama de las bandas de proteína de semillas de 8 cultivares australianos de *Trifolium subterraneum* L. (C. - Clare; D. - Dwalganup; M. B. - Mount Barker; B. M. - Bacchus Marsh; T. - Tallarook; G. - Geraldton; W. - Woogenellup; Y. - Yarloop). Las intensidades de tinción se expresaron, en orden creciente, de la siguiente forma: intensidad 1: líneas discontinuas; intensidad 2: líneas de trazo fino; intensidad 3: líneas de trazo grueso; intensidad 4: líneas cruzadas; intensidad 5: bandas negras.

En el estudio comparativo de las bandas, Boulter y col. (4) señalaron que es necesario tener presente lo siguiente: a) el extracto inicial puede contener un gran número de proteínas diferentes, por lo que una banda puede estar formada por más de una proteína; b) es imposible asegurar que las bandas situadas en la misma posición en geles obtenidos de diferentes taxa sean debidas a proteínas iguales. No obstante, en el caso presente todo el material examinado son taxa infraespecíficos con bastantes rasgos comunes.

Todos los cultivares pueden distinguirse claramente por sus bandas de proteína en contraste con lo encontrado por Bingham y Yeh (3) en variedades y poliploides pertenecientes al género *Medicago*, donde la mayor diferencia cualitativa observada entre todo el material era la presencia o ausencia de una banda; teniendo en cuenta esta banda podían establecerse cuatro grupos, dentro de los cuales fue posible separar la mayoría de las variedades sólo en razón de la diferencia de densidad observada en las otras bandas.

Hemos prescindido de las bandas de la zona inicial por no ser fácilmente homologables debido a su extrema delgadez y por sufrir algunas alteraciones.

TABLA I

Índices de similitud de las bandas de proteína entre 8 cultivares de "*Trifolium subterraneum*" L. (T. - Tallarook; B. M. - Bacchus Marsh; G. - Geraldton; M. B. - Mount Barker W. - Woogenellup; D. - Dwalganup, C. - Clare; Y. - Yarloop). Se señalan con negritas los porcentajes iguales o superiores al 25 por 100.

	T.	B.M.	G.	M.B.	W.	D.	C.	Y.	
	50	38	42	41	21	18	9		T.
		41	36	32	23	19	14		B.M.
			32	41	28	28	16		G.
				28	25	31	9		M.B.
					19	13	12		W.
						31	9		D.
							10		C.
									Y.

La tabla I muestra los índices de similitud de las bandas de proteína entre todos los cultivares. El índice de similitud más elevado es el existente entre los cultivares Tallarook y Bacchus Marsh, 50 por 100. Los cultivares Tallarook, Bacchus Marsh, Geraldton, Mount Barker y Woogenellup están más asociados entre sí que respecto a las otras formas, como lo pone de manifiesto el que los índices de similitud entre ellos oscilan de un 28 a un 50 por 100, siendo valores más altos que los que presentan respecto a los otros tres cultivares, Dwalganup, Clare y Yar-

loop. Esto concuerda con la clasificación establecida por Katznelson y Morley, que los introducen dentro de la misma subespecie, *ssp. subterraneum*, y con los datos de cruzamiento obtenidos por ellos (12).

Existe una excepción, Mount Barker, que tiene un índice de similitud mayor respecto a Clare, perteneciente a la *ssp. brachycalycinum*, que respecto a Woogenellup, aunque la diferencia no es muy grande. Un estudio parecido, realizado por Whitney y col. (23) en especies pertenecientes a los géneros *Verticillium* y *Fusarium*, puso de manifiesto una mayor diferencia interespecífica que intergenérica, explicando este hecho mediante la hipótesis de que la relación entre la semejanza de proteínas y la semejanza establecida por otros criterios no es lineal. Así, algunas proteínas reflejan solamente diferencias genéticas menores; otras, en cambio, reflejan diferencias genéticas mayores, y entre ellas puede haber algunas proteínas de apariencia difusa, cuya variación corresponde a grandes diferencias genéticas.

El cultivar Dwalganup, que Katznelson y Morley incluyen en la *ssp. subterraneum*, muestra, con el grupo de cultivares mencionado con anterioridad, índices de similitud notablemente más bajos, pareciendo presentar una posición intermedia entre dicho grupo y Clare, aunque tiene un índice de similitud mayor con este último (31 por 100).

El cultivar Clare, perteneciente a la *ssp. brachycalycinum*, presenta índices de similitud aún menores en relación al grupo de formas anteriormente citado, excepto el caso ya mencionado con respecto a Mount Barker. Esto también coincide con la clasificación establecida.

En el caso del cultivar Yarloop los índices de similitud son bajos respecto a los restantes cultivares, lo que está de acuerdo con lo encontrado por los autores ya nombrados, que lo incluyen en la *ssp. yanninicum* y también con los cruzamientos realizados por ellos.

Un hecho que parece oportuno resaltar es la repetibilidad de los resultados dentro de cada cultivar, aun usando semillas de distinta procedencia obtenidas en diferente época, en comparación con la marcada diferencia entre cultivares. Esto concuerda con lo observado por Fox y col. (9) en *Cytisus scoparius* (L.) Link procedentes de dos localidades. También Adriaanse y col. (1), en un estudio efectuado en 32 cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., establecieron que los electroforegramas de proteína no parecían afectados por las condiciones externas, tales como la fertilización con nitrógeno, condiciones climáticas y propiedades del suelo. Larsen (15) estudió 61 variedades de soja, encontrando modelos de banda muy reproducibles y uniformes dentro de cada variedad, que no se veían afectadas por año, localidad o serie de separación electroforética.

El gran número de bandas y el hecho de que los índices de similitud entre los cultivares no sobrepasen el valor del 50 por 100 refleja la gran heterogeneidad de la especie ya comentada por diversos autores.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con las subespecies

que Katznelson y Morley establecieron asociando ciertas barreras de esterilidad con determinadas características morfológicas; sin embargo, estas barreras existen también y además muy difundidas entre numerosas poblaciones que no se pueden separar por los caracteres morfológicos.

Un hecho importante en los procesos de subespeciación ha sido la autogamia casi absoluta de todas las formas de trébol subterráneo, lo que facilita la fijación de las alteraciones cromosómicas y los cambios genéticos. Esto causa una divergencia progresiva y da características de mosaico a la estructura de la variación de la especie.

Concluyendo, el método utilizado parece muy adecuado para la identificación de cultivares de trébol subterráneo a partir de las semillas. Identificación que es difícil sin este sistema, pues exige en algunos de ellos la observación de la planta en varios estadios de su ciclo y una descripción muy detallada que no puede ser objetiva y además con frecuencia difícil de interpretar.

Esta aplicación puede tener interés inmediato, siendo fácil la comparación de los resultados; las posibilidades de confusión entre cultivares son pequeñas, dadas las características muy individuales de cada proteinograma,

Agradecimiento

El autor agradece al Prof. Dr. F. González Bernáldez, catedrático de Ecología de la Universidad de Sevilla, la ayuda prestada para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Las proteínas de las semillas de ocho cultivares pertenecientes a las tres subespecies de *Trifolium subterraneum* L. se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

El número de bandas detectadas por este procedimiento era elevado, como refleja el diagrama adjunto. Todos los cultivares pudieron diferenciarse por sus bandas.

Los resultados eran reproducibles incluso en cultivares en los que se usaron semillas de distinta procedencia y obtenidas en época diferente. Es notable el contraste entre la constancia del electroforegrama obtenido dentro de cada estirpe con la variabilidad de dicho electroforegrama entre estirpes.

Se establecieron los índices de similitud de las bandas de proteína entre los diferentes cultivares.

Los resultados obtenidos se discutieron con los proporcionados por estudios morfológicos y genéticos de otros autores.

Finalmente se señala el interés del método para la rápida identificación de cultivares.

*Sección de Ecofisiología Vegetal.
Instituto de Edafología y Biología Vegetal. Madrid.*

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ADRIAANSE, A., KLOP, W. and ROBBERS, J. E. (1969). Characterisation of *Phaseolus vulgaris* cultivars by their electrophoretic patterns. J. Sci. Fd. Agric., 20, 647-650.
- (2) ADRIAANSE, A. and ROBBERS, J. E. (1970). Characterisation and fractionation studies on seed proteins of some of the leguminosae by starch-gel electrophoresis. J. Sci. Fd. Agric., 21, 126-128.
- (3) BINGHAM, E. T. and YEH, K. J. (1971). Electrophoretic patterns among alfalfa seed proteins from selected varieties, experimental stocks, and species accessions. Crop Sci., 11, 58-61.
- (4) BOULTER, D., THURMAN, D. A. and TURNER, B. L. (1966). The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics. Taxon, 15 (4), 135-143.
- (5) BOULTER, D., THURMAN, D. A. and DERBYSHIRE, E. (1967). A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. New Phytol., 66, 27-36.
- (6) CROWDEN, R. K., HARBORNE, J. B. and HEYWOOD, V. H. (1969). Chemosystematics of the Umbelliferae. A general survey. Phytochemistry, 8, 1963-1984.
- (7) DAVIS, B. J. (1964). Disc electrophoresis, II. Ann. New York Acad. Sci., 121, 404-427.
- (8) FAIRBROTHERS, D. E. (1968). Chemosystematics with emphasis on systematic serology. Modern methods in plant taxonomy. Academic Press. Inc., London.
- (9) FOX, D. J., THURMAN, D. A. and BOULTER, D. (1964). Studies on the proteins of seeds of the Leguminosae. I. Phytochemistry, 3, 417-419.
- (10) HILTY, J. W. and SCHMITTNER, A. F. (1966). Electrophoretic comparison of soybean leaf proteins from varieties resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathology, 56, 287-291.
- (11) HJERTÉN, S., JERSTED, S. and TISSELIUS, A. (1965). Some aspects of use of «continuos» and «discontinuos» buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 11, 219-233.
- (12) KATZNELSON, J. and MORLEY, F. H. W. (1965 a). Speciation processes in *Trifolium subterraneum* L. Israel J. Bot., 14, 15-35.
- (13) KATZNELSON, J. and MORLEY, F. H. W. (1965 b). A taxonomic revision of sect. *Calycomorphum* of the genus *Trifolium*. I. The geocarpic species. Israel J. Bot., 14, 112-134.
- (14) KLECZOWSKA, D. (1968). Starch-gel electrophoresis of alfalfa, clover and meadow grass proteins. Herbage Abstracts, 38, 123 (749).
- (15) LARSEN, A. L. (1967). Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. Crop. Sci., 7 (4), 311-313.
- (16) LEE, D. W. and FAIRBROTHERS, D. E. (1967). Serological and disc-electrophoretic studies of North American *Typha*. Am. J. Bot., 54, 660.
- (17) MC COWN, B. H., BECK, G. E. and HALL, T. C. (1968). Plant leaf and stem proteins. I. Extraction and electrophoretic separation of the basic, water-soluble fraction. Plant Physiol., 43, 578-582.
- (18) ORNSTEIN, L. (1964). Disc electrophoresis. I. Ann. New York Acad. Sci., 121, 321-349.
- (19) SILANO, V., DE CILLIS, U. and POCCHIARI, F. (1969). Varietal differences in albumin and globulin fractions of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. J. Sci. Fd. Agric., 20, 260-261.
- (20) TOMBS, M. P. and AKROYD, P. (1967). Acrylamide gel electrophoresis. Shandon Instrument Applications núm. 18.

- (21) VAUGHAN, J. G., WAITE, A., BOULTER, D. and WAITERS, S. (1966). Comparative studies of the seed proteins of *Brassica campestris*, *Brassica cleracea* and *Brassica nigra*. J. exp. Bot., 17, 332-343.
- (22) VAUGHAN, J. G. and DENFORD, K. E. (1968). An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of *Brassica* and *Sinapis* species, with special reference to their taxonomic value. J. exp. Bot., 724-732.
- (23) WHITNEY, P. J., VAUGHAN, J. G. and HEALE, J. B. (1968). A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. J. exp. Bot., 19, 415-426.
- (24) ZWARTZ, J. A. (1967). Characterization of potato varieties by electrophoretic separation of the tuber proteins. Mededelingen Land. Wageningen, 67, 9.

Recibido para publicación: 10-II-72