

Estudio fitosociolóxico das queiroeirras de *Erica erigena* R. Ross da Serra da Capelada (Galicia, NO da Península Ibérica)

J. RODRÍGUEZ-OUBIÑA, F.X. SOÑORA (†) & S. ORTIZ

Laboratorio de Botánica. Facultade de Farmacia. Universidade de Santiago
15706 Santiago de Compostela. Galicia. España

(Recibido, marzo de 1997. Aceptado, abril de 1997)

Resumo

RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J., SOÑORA, F.X. & ORTIZ, S. (1997). Estudio fitosociolóxico das queiroeirras de *Erica erigena* R. Ross da Serra da Capelada (Galicia, NO da Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 7: 97-101

Neste traballo lévase a cabo un estudio fitosociolóxico das matagueiras higrófilas con *Erica erigena* R. Ross da Serra da Capelada (A Coruña, Galicia) que se desenvolven sobre substratos básicos e ultrabásicos. Proponse unha nova asociación: *Erico erigenae-Ulicetum europaei*, da que se describe a súa fisionomía e sintaxonomía, e se achegan datos sobre a súa ecoloxía, dinamismo e estado de conservación.

Verbas clave: *Erica erigena*, *Calluno-Ulicetea*, queiroeirras, fitosocioloxía, Galicia, España.

Abstract

RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J., SOÑORA, F.X. & ORTIZ, S. (1997). A phytosociological study of the heaths of *Erica erigena* R. Ross of the Serra da Capelada (Galicia, NW Iberian Peninsula). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 7: 97-101

Hygrophilous scrub communities with *Erica erigena* R. Ross from the Serra da Capelada (A Coruña, northwest Iberian Peninsula), which grow on ultramafic soils, were studied. A new association, *Erico erigenae-Ulicetum europaei* is proposed and its physiognomical, syntaxonomical, biogeographical and ecological characteristics are described. Some data about its dynamism and conservation status are also included.

Key words: *Erica erigena*, *Calluno-Ulicetea*, scrublands, phytosociology, Galicia, Spain.

INTRODUCCIÓN

Erica erigena R. Ross é unha queiruga que presenta unha distribución discontinua en diversas áreas eurosiberianas e mediterráneas de Europa occidental e N de África: Irlanda, oeste de Francia, Asturias, Galicia, metade meridional de

Portugal, Andalucía, Levante e Maroco (cf. BAYER, 1993; GUINOCHET & VILMORIN, 1982). Malia habitar xeralmente sobre solos hidromorfos e substratos básicos ou ultrabásicos (excepcionalmente silíceos), debido á amplitude da súa distribución (estando presente en diferentes áreas bioxeográficas) encóntrase formando parte de

comunidades vexetais moi diferentes; neste senso, un estudio preliminar sobre o comportamento ecolóxico deste taxon foi realizado por RIVAS GODAY & MANSANET MANSANET (1972). En Galicia *Erica erigena* é unha especie pouco abundante e encóntrase puntualmente en diversas estacións localizadas na zona occidental e norte da provincia da Coruña (cf. FRAGA VILA, 1983), habitando case sempre sobre solos hidromorfos e substratos básicos e ultrabásicos, ou en areais costeiros sometidos á influencia da auga mariña. Tendo en conta o interese botánico das matagueiras dominadas por este taxon e a escasa información existente sobre as mesmas, decidimos realizar un estudio sobre este tipo de vexetación en Galicia, do que damos a coñecer os primeiros datos no presente traballo.

MÉTODO

Este estudio realizouse empregando o método fitosociolóxico sigmatista (BRAUN-BLANQUET, 1964) e, no que respecta á descripción das unidades sintaxonómicas, seguindo o Código de Nomenclatura Fitosociolóxica (BARKMAN *et al.*, 1986).

A nomenclatura utilizada preferentemente na denominación dos taxons é a dos volumes de Flora Iberica publicados ata a data (CASTROVIEJO *et al.*, 1986-1993) ou, no seu defecto, a de Flora Europaea (TUTIN *et al.*, 1964-1980), coa excepción dos seguintes: *Agrostis hesperica* Romero García, Blanca & Morales Torres, *Avenula sulcata* (Gay ex Boiss.) Dumort., *Brachypodium pinnatum* (L.) Beauv. subsp. *rupestre* (Host) S. & M., *Conopodium majus* (Gouan) Loret subsp. *ramosum* (Costa) Silvestre, *Euphorbia polygalifolia* Boiss. & Reuter subsp. *hirta* (Lange) Lainz e *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb.

Para a caracterización bioxeográfica e bioclimática tívose en consideración a proposta de RIVAS-MARTÍNEZ (1987).

RESULTADOS

Descrición da asociación

Estructura e fisionomía

Matagueira mesta, de porte medio, ultrapassando normalmente o metro de altura, dominada polo toxo macho (*Ulex europaeus* subsp. *europaeus*) e a queiruga (*Erica erigena*). Desde o punto de vista fenolóxico, acada o máximo esplendor durante o final do inverno e principio de primavera, xa que *Erica erigena* e *Ulex europaeus* subsp. *europaeus* están en plena floración. Avanzada esta última estación perde vistosidade debido a que ámbolos compoñentes culminan o seu período de floración mentres que outras ericáceas menos aparentes comezan o seu.

Composición florística e sintaxonomía

Esta asociación que describimos (holotypus: inventario nº 1, Táboa 1) destaca pola abundante presenza de *Erica erigena* e de *Ulex europaeus* subsp. *europaeus*, coexistindo con *Erica mackaiana* e *Erica vagans* (Táboa 1). No estrato inferior é frecuente *Agrostis hesperica* e *Euphorbia polygalifolia* subsp. *hirta*. Amais dos taxons anteriormente indicados que integran basicamente a súa combinación característica, completan o cortexo outros de *Calluno-Ulicetea* (*Calluna vulgaris*, *Erica cinerea*, *Lithodora prostrata* e *Agrostis curtisii*, fundamentalmente). Entre as compañeiras predominan especies das clases *Nardetea strictae* (*Potentilla erecta*, *Viola riviniana*, etc.), *Molinio-Arrhenatheretea* (*Serratula tinctoria*, *Carum verticillatum*, *Molinia caerulea* subsp. *caerulea*), *Scheuchzerio-Caricetea* (*Schoenus nigricans*, *Carex panicea*, *Anagallis tenella*, etc.) ou de diferente asignación fitosociolóxica (*Pteridium aquilinum*, *Laserpitium prutenicum* subsp. *doufourianum*, etc.).

TÁBOA 1
Erica erigenae-Ulicetum europaei ass. nova
 (*Daboecienion cantabricae*, *Ulicion minoris*, *Ulicetalia minoris*, *Calluno-Ulicetea*)

nº de orde	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
área (m2)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	30	40
cobertura (%)	80	100	100	100	100	100	100	100	100	95	95
altura da vexetación (cm)	100	130	100	100	100	110	80	110	110	90	50
orientación	NO	SO	NO	S	O	N	L	O	O	-	O
inclinación (%)	10	10	5	20	10	10	15	10	20	-	5
altitude (m s. n. m.)	275	280	230	290	380	390	470	280	290	380	250
nº de especies/inventario	21	14	21	19	13	13	17	22	22	13	21
Características de ass. e unidades superiores											
<i>Ulex europaeus</i> subsp. <i>europaeus</i>	4,3	4,4	4,4	3,3	3,4	4,4	2,2	3,3	3,3	2,2	+
<i>Erica erigena</i>	3,3	3,3	2,2	3,3	3,3	3,3	4,4	4,4	3,3	3,3	5,5
<i>Erica vagans</i>	2,2	2,3	2,2	1,2	1,1	1,2	2,2	+	1,2	2,2	1,1
<i>Agrostis hesperica</i>	1,2	+	1,1	r	+	r	+	r	1,2	+	+
<i>Erica mackaiana</i>	1,1	+	+	+2	1,2	+2	2,2	r	+2	2,2	1,1
<i>Euphorbia polygalifolia</i> subsp. <i>hirta</i>	+	+	+	+2	+	r	1,1	.	.	1,1	+
<i>Calluna vulgaris</i>	+	+	1,1	.	+	+	1,1	+	+	1,2	.
<i>Erica cinerea</i>	+2	.	1,1	1,2	1,1	+	+	+2	1,2	1,1	.
<i>Lithodora prostrata</i>	.	+	+	r	r	.	+	r	.	+	+
<i>Agrostis curtisii</i>	+	+	r	.	r
<i>Pseudarrhenatherum longifolium</i>	.	.	+	1,2	.	r	.	.	r	.	.
<i>Cirsium filipendulum</i>	+	r	.	.	.
<i>Thymelaea coridifolia</i>	r	.	.	+
Diferencial de la subass. <i>ericetosum ciliaris</i>											
<i>Erica ciliaris</i>	1,1	2,2	2,2	1,2
Compañeiras											
<i>Potentilla erecta</i>	+	+	+	+	+	+	r	+	1,1	r	+
<i>Potentilla montana</i>	+	+	+	r	.	.	.	+2	r	.	+
<i>Pteridium aquilinum</i>	+	.	+	+2	.	r	.	r	.	.	r
<i>Viola riviniana</i>	r	.	+	.	r	.	.	r	r	.	r
<i>Avenula sulcata</i>	.	+	1,1	+	.	+	.	+	+	.	.
<i>Serratula tinctoria</i>	+	.	r	+2	.	.	.	+2	+	.	.
<i>Schoenus nigricans</i>	+	.	.	r	.	.	+	r	.	.	r
<i>Carum verticillatum</i>	.	.	.	+	.	.	+	r	+	+	.
<i>Centaurea nigra</i>	.	r	+	r	r
<i>Carex panicea</i>	r	+	+2	.	.	.
<i>Laserpitium prutenicum</i> subsp. <i>doufourianum</i>	r	.	r	r
<i>Anagallis tenella</i>	r	.	.	r	r	.	.
<i>Brachypodium pinnatum</i> subsp. <i>rupestre</i>	.	+2	.	.	+2	.	+2
<i>Conopodium majus</i>	.	.	+	r	.	.	r
<i>Asphodelus albus</i>	.	.	r	r	.	r
<i>Molinia caerulea</i> subsp. <i>caerulea</i>	1,2	+
<i>Polygala vulgaris</i>	r	r	.	.	.
<i>Danthonia decumbens</i>	+	+	.	.
<i>Lotus corniculatus</i>	.	.	r	r
<i>Ranunculus bulbosus</i> subsp. <i>aleae</i> var. <i>gallaecicus</i>	r	.	.	r
<i>Centaureum scilloides</i>	.	.	.	r	r	.
<i>Succisa pratensis</i>	+
<i>Carex pulicaris</i>	r	.	.
<i>Scorzonera humilis</i>	r	.	.
<i>Hypericum pulchrum</i>	r

Localidades

Inventario nº 1: A Coruña, Cedeira, Batán, 29TNJ8038; nº2: A Coruña, Cedeira, Batán, 29TNJ8038; nº3: A Coruña, Cedeira, Solombo, 29TNJ7937; nº 4: A Coruña, Cedeira, Monte Uzal, 29TNJ8039; nº 5: A Coruña, Cedeira, O Bico, 29TNJ8039; nº 6 e 7: A Coruña, Cedeira, O Bico, 29TNJ8139; nº 8: A Coruña, Cedeira, Monte Uzal, 29TNJ8038; nº 9: A Coruña, Cedeira, Monte Uzal, 29TNJ8138; nº 10: A Coruña, Cariño, Vixiña Herbeira, 29TNJ8541; nº 11: A Coruña, Cedeira, Solombo, 29TNJ7938.

A combinación característica desta nova asociación que propoñemos permite distinguila doutras matagueiras análogas. A máis próxima é a *Gentiano-pneumonanthe-Ericetum mackaianae* R. Tüxen & Oberdorfer 1958 (subasociacións *ericetosum mackaianae* e *ericetosum vagantis* Rivas-Martínez 1979), da que se diferencia fundamentalmente pola presenza de *Erica erigena* (e abundancia de *Ulex europaeus* subsp. *europaeus*) e pola ausencia de *Ulex gallii* e *Gentiana pneumonanthe*. Entre as queiroeiras de *Erica erigena* a máis semellante é a que se desenvolve sobre solos hidromorfos na área noroccidental da provincia da Coruña (cf. RODRÍGUEZ OUBIÑA, 1986) na que, entre outras, están ausentes *Erica mackaiana* e *E. vagans*, e, pola contra, son habituais *Genista berberidea*, *Myrica gale*, *Salix repens* e *Erica tetralix*.

Tendo en conta a composición florística da asociación *Erico erigenae-Ulicetum europaei* consideramos que esta asociación debe ser incluída na subalianza *Daboecienion cantabricae* (Dupont 1975) Rivas-Martínez 1979 (alianza *Ulicion minoris* P. Duvign. 1944, orden *Ulicetalia minoris* Quantín 1935 e clase *Calluno-Ulicetea* Br.-Bl. & R. Tüxen 1943).

No que respecta a súa variabilidade, ademais da subasociación típica (*ericetosum erigenae* nova, holotypus: o mesmo que o da asociación, inventario nº 1, Táboa 1) foi recoñecida a subasociación *ericetosum ciliaris* nova (holotypus: inventario nº 6, Táboa 1), de medios máis húmidos e que floristicamente se diferencia da anterior polo presenza de *Erica ciliaris*.

Ecología

Esta asociación encóntrase nalgúns puntos da Capelada sobre substratos ultrabásicos e solos serpentínicos gleizados (sometidos a hidromorfía temporal), máis ou menos profundos, situados en posicións de cunca de recepción ou de ladeira baixa ou media) nos que adoita existir abundosa circulación de auga superficial durante parte do ano. A subasociación *ericetosum ciliaris* coloniza xeralmente os solos de maior hidromorfía.

Distribución e bioxeografía

Tal como indicabamos ao comezo deste traballo, *Erica erigena* é un arbusto que posúe unha distribución disxunta en diversas áreas de Europa Occidental. Tendo en conta a información subministrada por FRAGA VILA (1982, 1983) e as nosas propias observacións, en Galicia atópase este taxon en núcleos puntuais da zona occidental e noroccidental do subsector Compostelano, sector Galaico-Portugués, e do subsector Galaico-Asturiano septentrional, sector Galaico-Asturiano (ambos sectores pertencentes á provincia Cántabro-Atlántica e Rexión Eurosiberiana), colonizando substratos básicos e ultrabásicos (ou máis raramente zonas húmidas de postduna dalgunhas praias) e formando parte de diversas comunidades que actualmente están en fase de estudio. Na Serra da Capelada, atópase na actualidade en varias estacións de pequeno tamaño (entre 0.1 e 1 Ha), localizadas en Batán, Solombo, Monte Uzal e O Bico (pertencentes ao concello de Cedeira), sempre sobre substratos ultrabásicos, onde é localmente abundosa. A distribución da asociación *Erico erigenae-Ulicetum europaei* correspóndese exclusivamente con estas estacións da Capelada, tratándose polo tanto dunha comunidade endémica da devandita serra. A súa área atópase emprazada no horizonte eucolino (piso colino) do subsector Galaico-Asturiano septentrional.

Dinamismo

Perante a degradación desta queiroeira desenvólvense maioritariamente un pasteiro de substitución pertencente á clase *Scheuchzerio-Caricetea* (na actualidade estase facendo un estudio detallado sobre esta asociación vexetal inédita). Nesta zona a causa fundamental de degradación é o pastoreo (máis ou menos intenso) polo gando en estado semisalvaxe que abre sendeiros nestas formacións, disgregándoas en rodais onde se agrupan as especies arbustivas separadas por pasadoiros colonizados por pasteiros. A recuperación natural destas matagueiras parece ser moito máis lenta que a

doutras máis abundosas nesta zona (*Gentiano pneumonanthe-Ericetum mackaianae*, etc). Cando son formacións maduras, son altas e mestas, dominadas polo toxo común, *Ulex europaeus* subsp. *europaeus*, sendo moito menos abundosa *Erica erigena*, e as outras queirugas e plantas herbáceas desaparecen case por completo. Actualmente o estado de conservación da asociación *Erico erigenae-Ulicetum europaei* nas estacións do municipio de Cedeira é aceptable; pola contra en Vixía Herbeira (Cariño), onde a degradación nos últimos anos foi moito máis acusada (seitura e pastoreo intenso, transformación de matagueiras en pasteiros artificiais, etc.) esta comunidade desapareceu case por completo, o que pon de manifesto a grande vulnerabilidade destas matagueiras.

AGRADECEMENTOS

Este traballo foi subvencionado polo proxecto XUGA20315B96 outorgado pola Consellería de Educación e Ordenación Universitaria da Xunta de Galicia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKMAN, J.J., MORAVEC, J. & RAUSCHERT, S. (1986). Code of phytosociological nomenclature, 2ª ed. *Vegetatio, Dordrecht*, **67**: 145-195.
- BAYER, E. (1993). *Erica* L. In: Castroviejo & al. (Eds.), *Flora Iberica*, Vol. **4**: 485-506. C.S.I.C. Madrid.
- BRAUN-BLANQUET, J. (1964). *Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde*. 3 Aufl. Wien.
- CASTROVIEJO, S. et al. (Eds.) (1986-1993). *Flora Iberica*. Vol. **1-4**. C.S.I.C. Madrid.
- FRAGA VILA, M.I. (1982). *Aportación al estudio taxonómico de las especies de los géneros Erica y Calluna presentes en Galicia*. Tese doutoral (inéd.). Universidade de Santiago de Compostela.
- FRAGA VILA, M.I. (1983). Notes on the morphology and distribution of *Erica* and *Calluna* in Galicia. North-Western Spain. *Glasra*, **7**: 11-23.
- GUINOCHE, M. & VILMORIN, R. (1982). *Flore de France* Vol. **4**. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.
- RIVAS GODAY, S. & MANSANET MANSANET, J. (1972). Acerca del comportamiento edáfico de la *Erica* mediterranea (hibernica) en España. *Anal. Real Acad. de Farmacia*, **1**: 95-106.
- RIVAS-MARTINEZ, S. (1987). *Memoria del mapa de las series de vegetación de España (1:400.000)*. ICONA, Serie Técnica. Madrid.
- RODRÍGUEZ OUBIÑA, J. (1986). *Estudio fitosociológico de las brañas de la provincia de A Coruña*. Tese doutoral (inéd.). Universidade de Santiago de Compostela.
- TUTIN, T. G. et al. (Eds.) (1964-1980). *Flora Europaea*, Vol. **1-5**. Cambridge University Press.

Caracterización de las proteínas de semilla de *Pinus pinea* L.

J. G. ÁLVAREZ GONZÁLEZ

Departamento de Ingeniería Agroforestal y Producción Vegetal
Escuela Politécnica Superior de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela
Campus Universitario. 27002 Lugo

(Recibido, febrero de 1997. Aceptado, marzo de 1997)

Resumen

ÁLVAREZ GONZÁLEZ, J. G. (1997). Caracterización de las proteínas de semilla de *Pinus pinea* L. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 7: 103-110

La fracción proteica mayoritaria de la semilla de *Pinus pinea* L. es la de las glutelinas (62%). Su comportamiento electroforético y sus características químicas indican que se trata de proteínas del tipo 11S similares a las descritas en otras coníferas con la salvedad de la no aparición en condiciones no reductoras de la unidad básica constituida por el dímero 21-35 kD. La fracción de globulinas también representa un alto porcentaje (29%) y está constituida por dos tipos de proteínas similares a las encontradas en *Pinus pinaster* Ait.: los componentes de 23, 26 y 47 kD se corresponden con las globulinas 7S y el grupo de 16-19 kD con las globulinas 2S de dicha especie. Desde el punto de vista alimentario el piñón es un alimento rico en proteínas pero con deficiencias en los aminoácidos esenciales lisina y metionina; en este sentido es equivalente a la mayoría de las semillas de especies agrícolas usadas en alimentación humana.

Palabras clave: *Pinus pinea* L., semillas, proteínas de reserva.

Abstract

ÁLVAREZ GONZÁLEZ, J.G. (1997). Seed storage proteins from *Pinus pinea* L. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 7: 103-110

Pinus pinea L. store glutelins as major seed proteins (62%). Their electrophoretic behaviour and chemical properties indicate that they are homologous with the 11S proteins of other conifers, except that don't show in no reduced conditions the dimer of 21-35 kD. The globulin fraction also represents a high percentage (29%) and two classes of protein similar to *Pinus pinaster* Ait. have been separated from this fraction: the monomers of 23, 26 and 47 kD agree with the 7S globulins and the group of 16-19 kD with the 2S globulins of *Pinus pinaster*. The seed is a rich protein food but has relatively low levels of Lys and Met; in this respect is similar to the majority of agricultural seeds used in human feeding.

Key words: *Pinus pinea* L., seeds, storage proteins.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente las proteínas de semilla se han clasificado según su solubilidad (OSBORNE,

1924; SHEWRY & MIFLIN, 1985). Las globulinas son las proteínas de reserva de la mayoría de las plantas angiospermas, siendo mayoritarios dos tipos, las globulinas 11S o leguminas y las

globulinas 7S o vicilinas (DERBYSHIRE *et al.*, 1976; CASEY *et al.*, 1986). Análisis de las secuencias de esas proteínas o de los genes que las codifican sugieren que las globulinas provienen de 2 genes ancestrales presentes al principio de la evolución de las angiospermas y que dieron lugar a las formas modernas que codifican esas proteínas (BORROTO & DURE, 1987; CASEY *et al.*, 1986).

Los estudios sobre proteínas de reserva de semilla en las gimnospermas son aún escasos. En algunas especies de Pináceas, el análisis electroforético ha sugerido la presencia de proteínas similares a las globulinas 11S de las angiospermas (MISRA, 1994), lo que ha sido confirmado en los casos de *Pseudotsugamenziesii* Mir. y *Pinus pinaster* Ait. a partir de las secuencias de cDNA y proteína respectivamente (ALLONA *et al.*, 1992; LEAL & MISRA, 1993). Sin embargo, la determinación de la estructura oligomérica de estas proteínas no ha sido posible ya que su extracción requiere el tratamiento con agentes disociantes, lo que no sucede con las globulinas 11S de angiospermas si exceptuamos las del arroz (ZHAO *et al.*, 1983).

Existen evidencias de que las Pináceas tienen proteínas similares a las globulinas 7S. En el caso de *P. pinaster* se han obtenido datos de secuencia y se ha descrito su estructura oligomérica (ALLONA *et al.*, 1994a); además, se ha caracterizado un cDNA correspondiente a una proteína de reserva de *Picea glauca* Voss que tiene una gran similitud con las globulinas 7S de angiospermas (NEWTON *et al.*, 1992). Estudios inmunológicos indican la presencia de proteínas 11S y 7S en especies de otras familias de coníferas (ALLONA *et al.*, 1994b; MISRA & GREEN, 1994).

En angiospermas se ha descrito un tercera clase de proteínas de semilla, a veces consideradas como proteínas de reserva, que se denomina genéricamente como proteína 2S. Aunque, en general, menos abundantes que las globulinas 11S y 7S, en algunas especies llegan a constituir entre el 10 y el 30% de la proteína total de la semilla. Proteínas con características estructura-

les similares, aunque no existen datos sobre similitud de secuencia, han sido descritas en *P. pinaster* (ALLONA *et al.*, 1994c).

En el presente trabajo se muestra el fraccionamiento y la caracterización preliminar de las proteínas de reserva de la semilla de *Pinus pinea* L. Este estudio, además de ampliar el conocimiento sobre el género *Pinus*, incide en la calidad de la proteína de piñón desde un punto de vista alimentario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se emplearon piñones de *Pinus pinea* de las siguientes procedencias: Valladolid, Alcalá de Guadaíra (Sevilla), Algeciras (Cádiz) y Madrid.

Extracción de proteínas

Se utilizaron en todos los casos semillas maduras. Las cubiertas y el embrión fueron eliminados antes de la extracción. Los megagametofitos fueron triturados en mortero con éter dietílico (20:1, v/w; 1h; 4°C), después se extrajeron con acetona (20:1, v/w; 1h; 4°C) para eliminar los lípidos restantes. Las trazas de acetona se eliminan por vacío y la harina seca se almacenó a 20°C.

Para la extracción de las fracciones proteicas se empleó el método de KØIE & NIELSEN (1977) con algunas modificaciones (COLLADA *et al.*, 1986). Alternativamente las glutelinas se extrajeron en las mismas condiciones pero en ausencia de agente reductor (2-mercaptoetanol).

Métodos electroforéticos

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el método de LAEMMLI (1970) y los geles se tiñeron por inmersión en azul de Coomassie G-250. El porcentaje de acrilamida empleado fue el 15% y se cargaron 25 µgr de glutelinas y 50 µgr de albúminas, globulinas y prolaminas.

Para el fraccionamiento bidimensional de las proteínas se empleó el método de O'FARRELL (1975). La primera dimensión es un electroenfoque con un 2% de anfólicas de intervalo de pI 3,5-10, un 5% de poliacrilamida y urea 6,25M en tubos (2,0 mm. x 13,0 mm.), a 800 V durante 3 horas y media. Las muestras fueron insertadas en el extremo ácido y las cargas empleadas fueron 200 µgr de albúminas y 100 µgr de globulinas y glutelinas. En el caso de las glutelinas la mezcla de polimerización contenía un 2% de Nonidet P-40 y el tiempo de enfoque fue de 21 horas. El gradiente de pH en la primera dimensión fue determinado según el método de DRYSDALE *et al.* (1971). La segunda dimensión consistió en una electroforesis con SDS (SDS-PAGE) con un 15% de acrilamida.

Métodos analíticos

El contenido total de nitrógeno de las harinas se determinó mediante un Kjeldahl semimicro siguiendo el método de CHASE & WILLIAMS (1968).

El análisis de los aminoácidos de las distintas fracciones se obtuvo por derivatización con fenilisotiocianato y separación en fase reversa por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) siguiendo el método de BIDLINGMEYER *et al.* (1984). La columna empleada fue una Ultrasphere ODS de 4,6 x 250 mm. a 40°C. La oxidación perórmica se realizó de acuerdo con el método descrito por HIRS (1967). Las muestras se hidrolizaron durante 24 y 48 horas a 110±1°C, usando HCl 5,7N, 0,1% de fenol.

RESULTADOS

Extracción de proteínas

El contenido en proteínas del megagametofito de *P. pinea* calculado a partir del contenido total en nitrógeno usando un factor de conversión de 6,25 es aproximadamente del 40%. Los resultados de la extracción secuencial de proteínas demuestran que las glutelinas son la fracción mayoritaria con un 62% del total de proteína extraída. Las albúminas suponen un 9% del total,

y las globulinas un 29%. Las semillas carecen de prolaminas.

SDS-PAGE de las fracciones proteicas

El análisis de las diferentes fracciones proteicas obtenidas en la extracción secuencial mediante SDS-PAGE se muestra en la Fig. 1. Las albúminas presentan un modelo heterogéneo con una banda de gran intensidad en la zona de bajos pesos moleculares (<12,4 kD). El tratamiento reductor no modifica el esquema electroforético, aunque se observa una mayor movilidad en la zona de bajo peso molecular citada. Las globulinas muestran un pequeño número de componentes principales de 23, 26 y 47 kD cuya movilidad no varía al realizar la electroforesis en condiciones reductoras. Dentro de la misma fracción se observa una intensa banda de aproximadamente 16-19 kD que se desdobra en polipéptidos de 7-12 kD en presencia de 2-ME, esto podría sugerir una posible estructura (α - β) formada por dos subunidades de diferente tamaño unidas por puentes disulfuro. Estas características, de confirmarse, serían similares a las de las globulinas 2S descritas en un gran número de angiospermas.

El modelo de las glutelinas bajo condiciones reductoras presenta tres bandas intensas de 46, 35, y 21 kD de peso molecular. Estos componentes se corresponden esencialmente con los descritos para otras especies de coníferas (MISRA, 1994). Sin embargo, si la extracción de las glutelinas y su electroforesis se realiza en condiciones no reductoras, el modelo se modifica drásticamente. Se detectan los componentes de 21 y 35 kD en baja proporción y aparece un elevado número de componentes de alto peso molecular (Fig. 1b). Estos cambios son similares a los descritos en las especies de coníferas previamente estudiadas, excepto que en éstas aparece en condiciones no reductoras una intensa banda de aproximadamente 55 kD correspondiente al dímero formado por los componentes de 21 y 35 kD ligados por puentes disulfuro; dímero que es la unidad básica de las proteínas 11S.

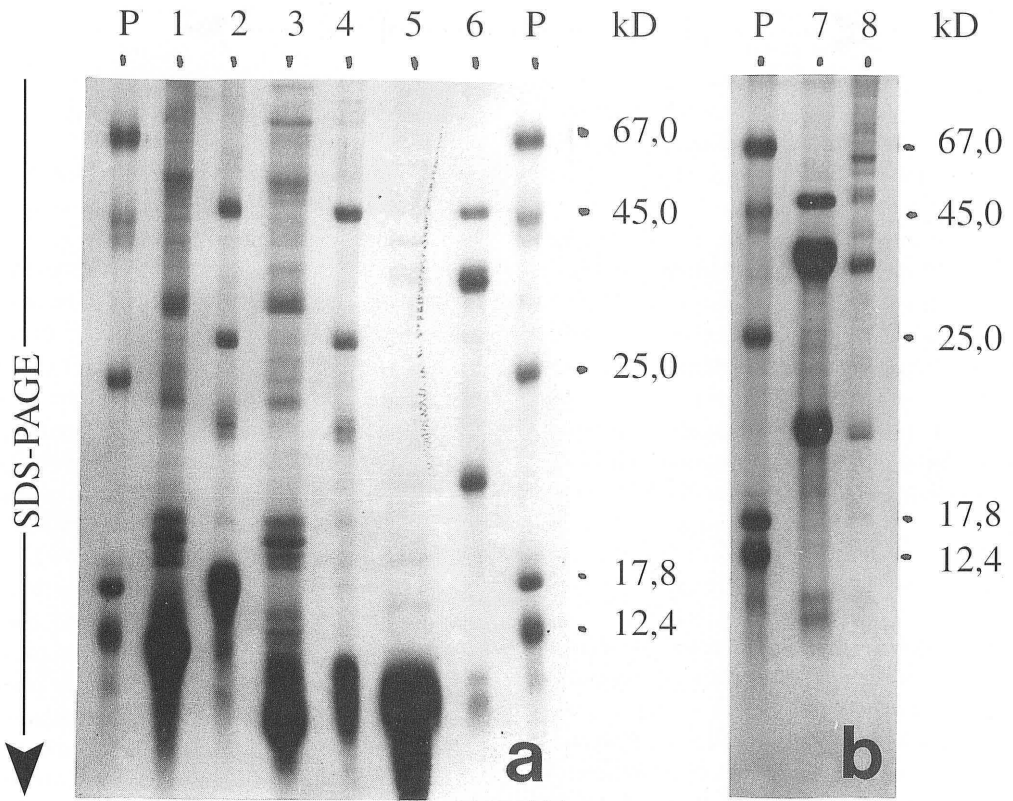


Fig. 1. (a) SDS-PAGE de las fracciones proteicas obtenidas en la extracción secuencial. (1), (3) Albúminas sin reducir y reducidas. (2), (4) Globulinas sin reducir y reducidas. (5) Prolaminas reducidas. (6) Glutelinas reducidas. (P) Patrones de peso molecular conocido. (b) SDS-PAGE de Glutelinas extraidas en condiciones no reductoras. (7) Glutelinas reducidas. (8) Glutelinas sin reducir. El porcentaje de acrilamida en todos los geles es del 15% y la carga de proteína es de 50 µgr para las albúminas, globulinas y prolaminas y de 25 µgr para las glutelinas. A la derecha de la figura se indican los pesos moleculares de los patrones en kD.

Electroforesis bidimensional de las fracciones proteicas

La separación bajo condiciones reductoras por electroenfoque seguido de electroforesis en geles de poliacrilamida de las albúminas, globulinas y glutelinas se muestra en la Fig. 2.

El mapa correspondiente a las albúminas es muy heterogéneo, apreciándose por encima de 20 polipéptidos con un amplio intervalo de tamaños y de puntos isoelectricos. En contraste, el mapa proteico de las globulinas es mucho más

simple. Los componentes de 23, 26 y 47 kD se muestran como manchas únicas, no presentando, por tanto, heterogeneidad de pI. Las bandas de 7-12 kD presentes en la SDS-PAGE, sí se han desdoblado en el fraccionamiento por electroenfoque. Los componentes de las glutelinas también son heterogéneos (Fig. 2c). Hay al menos 6 proteínas de 21 kD, otras 6 de 35 kD y 3 de 46 kD. Como ocurre en *P. pinaster*, estas proteínas presentan un amplio intervalo de puntos isoelectricos (ALLONA *et al.*, 1992).

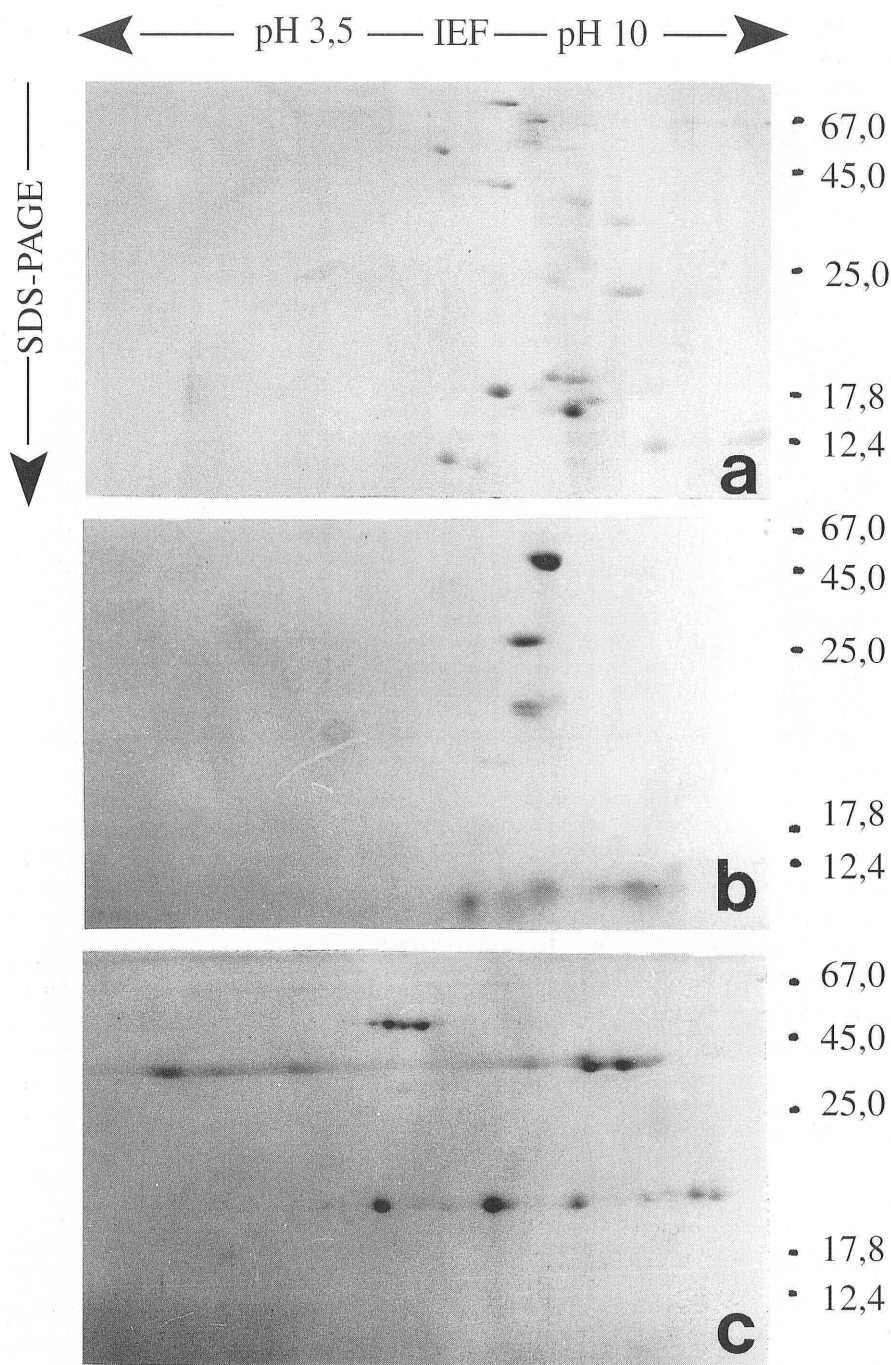


Fig. 2. Fraccionamiento bidimensional obtenido por electroenfoque (pH 3,5-10) seguido de SDS-PAGE de (a) Albúminas reducidas. (b) Globulinas reducidas. (c) Glutelinas reducidas. Las cargas de proteína empleadas son de 200 µgr de albúminas y 100 µgr de globulinas y glutelinas y el porcentaje de acrilamida empleado en la segunda dimensión es del 15%.

TABLA I. Contenido en aminoácidos (mol / 100 moles de aminoácidos analizados) de las diferentes fracciones proteicas de la semilla de *P. pinea* (Trp no fue analizado)

Aminoácido	Albúminas	Globulinas	Glutelinas
Asx	8.1	7.6	7.3
Thr	4.1	2.3	3.2
Ser	6.8	6.9	7.1
Glx	20.3	22.5	17.7
Pro	5.4	5.0	5.5
Gly	8.3	6.0	8.7
Ala	7.5	5.9	6.8
1/2Cys	3.6	4.2	1.8
Val	4.7	3.8	5.9
Met	1.8	1.5	1.5
Ile	3.2	3.0	3.2
Leu	5.5	5.9	6.7
Tyr	2.4	2.7	3.4
Phe	1.5	1.5	3.0
His	1.7	1.9	2.0
Lys	4.9	1.9	1.3
Arg	10.0	17.3	14.9

Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos de las diferentes fracciones proteicas de *P. pinea* se muestran en la Tabla I. Las tres fracciones contienen altos niveles de glutámico + glutamina (Glx) y de aspártico + asparagina (Asx) característicos de las proteínas de reserva y de un aminoácido básico, la arginina. También es destacable el bajo contenido en lisina y metionina.

DISCUSIÓN

El contenido en proteína total de la semilla de *P. pinea* estimado en este trabajo es muy parecido al descrito por VAUGHAN (1970) para la misma especie y similar a los descritos para otras especies del mismo género (SALMIA, 1981; ALLONA *et al.*, 1992).

Los resultados de la extracción secuencial muestran que la fracción mayoritaria es la de

glutelinas (62%) aunque las globulinas representan un porcentaje considerable (29%). Estos datos son semejantes a los descritos para *P. pinaster* (ALLONA *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos para la fracción de glutelinas (comportamiento electroforético y características químicas) sugieren que, al igual que en otras coníferas, se trata de proteínas del tipo 11S (MISRA, 1994). Es sorprendente la no detección del dímero 21 kD - 35 kD en condiciones no reductoras. La explicación más simple sería la no existencia de puentes disulfuro por mutación de cisteínas, máxime cuando en algunos casos, como en arroz, se ha demostrado que la unión es debida a un solo puente (WEN & LUTHE, 1985); sin embargo, los oligómeros no específicos de mayor peso molecular que aparecen en estas condiciones podrían estar enmascarando la existencia de los dímeros. Esta alternativa implicaría una facilidad grande de los dímeros para formar entre sí puentes disulfuro no específicos. El análisis electroforético bidimensional

indica una considerable heterogeneidad en los componentes de 21 y 35 kD, aunque menor que la encontrada para los componentes homólogos de *P. pinaster* (ALLONA *et al.*, 1992).

La fracción de globulinas comprende dos tipos de proteínas similares a los encontrados en *P. pinaster* (ALLONA *et al.*, 1994a,c). Los componentes de 23, 26 y 47 kD se corresponden con los monómeros de las globulinas 7S de *P. pinaster*; además, se ha comprobado que anticuerpos mono-específicos contra el polipéptido de 22 kD de esta última especie reconocen al de 23 kD de *P. pinea* (Allona, comunicación personal). El grupo de globulinas de 16-19 kD que se desdobra en componentes de menor peso molecular en presencia de 2-mercaptoetanol tiene características similares a las globulinas 2S de *P. pinaster*. Proteínas con un comportamiento electroforético similar han sido también descritas en otras especies de coníferas (MISRA, 1994).

La composición en aminoácidos de las fracciones proteicas que corresponden a proteínas de reserva (glutelinas y globulinas) de *P. pinea* se caracterizan, como es habitual en esta clase de proteínas, por un alto contenido en Glx y una baja proporción de His y Met; sin embargo, es destacable su alto contenido en Arg, propiedad típica de las proteínas de reserva de las gimnospermas (ALLONA *et al.*, 1992, 1994c; NEWTON *et al.*, 1992; LEAL & MISRA, 1993). Este resultado puede estar de acuerdo con la observación de RAMAIAH *et al.* (1971), que sugiere que, en coníferas, la arginina es la principal reserva de nitrógeno en las semillas en germinación puesto que existe también una alta actividad arginasa (GUITTON, 1957).

Los resultados presentados en este trabajo, considerados desde un punto de vista alimentario, indican que el piñón comestible es un alimento rico en proteína pero que la calidad de ésta no es alta por su pobre contenido en los aminoácidos esenciales lisina y metionina. En este sentido sería equivalente a la mayoría de las semillas de especies agrícolas usadas en alimentación humana (GUPTA, 1983).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLONA, I., CASADO, R. & ARAGONCILLO, C. (1992). Seed storage proteins from *Pinus pinaster* Ait.: homology of major components with 11S proteins from angiosperms. *Plant Science*, **87**: 9-18.
- ALLONA, I., CASADO, R. & ARAGONCILLO, C. (1994a). Biochemical genetics of a 7S globulin-like protein from *Pinus pinaster* seed. *Theor. Appl. Genet.*, **88**: 454-459.
- ALLONA, I., COLLADA, C., CASADO, R. & ARAGONCILLO, C. (1994b). Electrophoretic analysis of seed storage proteins from gymnosperms. *Electrophoresis*, **15**: 1062-1067.
- ALLONA, I., COLLADA, C., CASADO, R. & ARAGONCILLO, C. (1994c). 2S Arginine-rich proteins from *Pinus pinaster* seeds. *Tree Physiology*, **14**: 211-218.
- BIDLINGMEYER, B.A., COHEN, S.A. & TARVIN, T.L. (1984). Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J. Chromatogr.*, **336**: 93-104.
- BORROTO, K. & DURE, L. (1987). The globulin seed storage proteins of flowering plants are derived from two ancestral genes. *Plant Mol. Biol.*, **8**: 113-131.
- CASEY, R., DOMONEY, C. & ELLIS, N. (1986). Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, **3**: 1-95.
- CHASE, M.W. & WILLIAMS, C.A. (1968). Protein analysis. In: Williams, C. A. & Chase, M.W. (Eds.), *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Vol 2.: 249-282. Academic Press.
- COLLADA, C., CASADO, R., BARBER, D., FERNÁNDEZ, CALEYA, R. & ARAGONCILLO, C. (1986). Characterization of seed protein fractions from *Castanea* spp. *J. Exp. Botany*, **37**: 1872-1878.
- DERBYSHIRE, E., WRIGHT, D.J. & BOULDER, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, **15**: 3-24.
- DRYSDALE, J.W., RIGGHETTI, P. & BUNN, H.F. (1971). The separation of human and animal haemoglobins by isoelectric focussing in polyacrylamide gel. *Biochem. Biophys. Acta*, **229**: 42-50.
- GUITTON, Y. (1957). Sur le métabolisme azoté des Gymnospermes. Présence de l'arginase dans les graines. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **245**: 1157-1160.
- GUPTA, Y.P. (1983). Nutritive value of food legumes. In: Arora, S.K. (Ed.), *Chemistry and biochemistry of legumes*: 287-327. Edward Arnold.

- HIRS, C.H.W. (1967). Performic acid oxidation. *Methods Enzymol.*, **11**: 197-199.
- KØIE, B. & NIELSEN, G. (1977). Extraction and separation of hordeins. In: Miflin, B.J. & Shewry, P.R. (Eds.), *Techniques for the Separation of Barley and Maize Proteins*: 25-25. Commission of the European Communities, Luxembourg.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LEAL, I. & MISRA, S. (1993). Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. III Analysis of crystalloid protein mRNAs and desiccation protein mRNAs in the developing embryos and megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss). *Plant Science*, **88**: 25-37.
- MISRA, S. (1994). Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: Biochemical and molecular advances. *Seed Science Research*, **4**: 357-384.
- MISRA, S. & GREEN, M. (1994). Legumin-like storage polypeptides of conifer seeds and their antigenic cross-reactivity with 11S globulins from angiosperms. *Journal of Experimental Botany*, **45** (271): 269-274.
- NEWTON, C.H., FLINN, B.S. & SUTTON, B.C.S. (1992). Vicilin-like seed storage proteins in the gymnosperm interior spruce (*Picea glauca/engelmannii*). *Plant Mol. Biol.*, **20**: 315-322.
- O'FARREL, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**: 4007-4021.
- OSBORNE, T.B. (1924). *The vegetable proteins*. Longmans, Green and Co, London.
- RAMAIAH, P.K., DURZAN, D.J. & MIA, A.J. (1971). Amino acids, soluble proteins, and isozyme patterns of peroxidase during the germination of jack pine. *Can. J. Bot.*, **49**: 2151-2161.
- SALMIA, A. (1981). *Peptidases, proteinases, and proteinase inhibitors in resting and germinating seeds of Scots pine, Pinus sylvestris*. Pub. Dpt. Botany, 7. University of Helsinki.
- SHEWRY, P.R. & MIFLIN, B.J. (1985). Seed storage proteins of economically important cereals. *Adv. Cer. Sci. Technol.*, **7**: 1-83.
- VAUGHAN, J.G. (1970). *The structure and utilization of oil seeds*. Chapman and Hall, London.
- WEN, T. & LUTHE, D.S. (1985). Biochemical characterization of rice glutelin. *Plant Physiol.*, **78**: 172-177.
- ZHAO, W.M., GATEHOUSE, J.A. & BOULTER, D. (1983). The purification and partial amino acid sequence of a polypeptide from the glutelin fraction of rice grains; homology to pea legumin. *FEBS Lett.*, **162**: 96-102.