

UNIVERSITAT DE LLEIDA
Biblioteca



1600116282

ceff

Concepción Rosp Galpe

J.P. Mac

J.P. Macdonald

Nicolas Jouve

NICOLAS JOUVE

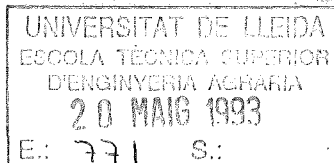
H. R. SANCITIZ HONGO

H.R. SANCITIZ HONGO

D. Michelena

D. Michelena

(043) "1993" Mor



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÀRIA DE LLEIDA

MORALEJO VIDAL, M.
ANGELES
Prod. Vegetal i C.F.
02/07/93
93/94 1

Tesis Doctoral

**CEBADAS DÍSTICAS ESPAÑOLAS (*Hordeum vulgare* L.): FILOGENIA,
BIOQUÍMICA Y APLICACIÓN POTENCIAL EN PROGRAMAS DE MEJORA**

M^a ANGELES MORALEJO VIDAL

Lleida, 1993

0110-46760

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÀRIA

CEBADAS DÍSTICAS ESPAÑOLAS (*Hordeum vulgare* L.): FILOGENIA,
BIOQUÍMICA Y APLICACIÓN POTENCIAL EN PROGRAMAS DE MEJORA

Tesis presentada por M^a Angeles Moralejo Vidal
para optar al Grado de Doctor.

El presente trabajo ha sido realizado en el Centro
UdL-IRTA de Lleida y en la ETSIA de Madrid, bajo
la dirección de los Drs. José Luis Molina Cano,
Ignacio Romagosa Clariana y Gabriel Salcedo Durán.

M^a Angeles Moralejo Vidal



V^o B^o de los Directores de Tesis:

José Luis Molina

Ignacio Romagosa

Gabriel Salcedo

Lleida, Julio de 1993

A mis padres y hermanos.

A Pere.

Agradecimientos

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Genética-Área de Cultivos Extensivos del Centro UPC-IRTA de Lleida y en el Departamento de Bioquímica de la ETSI Agrónomos de Madrid.

Una vez finalizada la escritura de la Tesis, quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra han contribuído a su realización:

A los Drs. Jose Luis Molina, Ignacio Romagosa y Gabriel Salcedo, directores del presente trabajo, por su rigor científico y por el esfuerzo empleado en el desarrollo de esta Tesis. Gracias por su gran calidad humana y por haber demostrado durante todos estos años ser, ante todo, excelentes amigos.

A mis compañeros de la ETSI Agraria de Lleida, Paquita Santiveri, Jordi Voltas, Elena Hidalgo, Dolors Bosch, Roser Xandri y Antonio Michelena, por todos los buenos momentos pasados juntos, que han contribuído a hacer más llevadero el trabajo en el Departamento. También quisiera agradecer de forma muy especial, la gran ayuda y colaboración técnica prestada por Xavier Goñi, siempre con buena cara y teniendo a punto todas las fotografías que componen el presente trabajo.

A todo el Personal Científico y Laboral del Área de Cultivos Extensivos del IRTA y en especial, a Toñi Bosch y Silvia Vilà, por la gran colaboración prestada en todo momento.

A la Dra. Rosa Sánchez Monge y a Gloria García Casado, del Departamento de Bioquímica de la ETSI Agrónomos de Madrid, por su amabilidad y ayuda prestada durante el tiempo que permanecí en dicho Departamento.

Al Dr. Carlos Lopez-Otín, del Departamento de Biología Funcional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, por la secuenciación de las proteínas aisladas en el presente trabajo.

A mis hermanos Elsa, Miguel, Alejandro, David y Emma y, en especial, a mis padres, por haberme apoyado tanto durante todos estos años. Gracias por animarme de forma continua y por depositar su confianza en mí. A ellos les debo la realidad de esta Tesis Doctoral.

Por último un agradecimiento muy especial a Pere, por su paciencia, esfuerzo y colaboración en la realización de la Tesis Doctoral. Por haberme inculcado su optimismo cuando más lo necesitaba y por su gran cariño y comprensión, que tanto me han ayudado dentro y fuera del ámbito científico.

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ORIGEN DE LAS CEBADAS CULTIVADAS	2
I.1.1. DOMESTICACIÓN	2
I.1.2. CENTRO DE ORIGEN DE LA CEBADA CULTIVADA	4
I.2. EL CULTIVO DE LA CEBADA.	7
I.2.1. LA SITUACIÓN EN ESPAÑA	8
I.3. IMPORTANCIA DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS	9
I.4. CARACTERES AGRONÓMICOS EN LA EVALUACIÓN DE CULTIVARES DE CEBADA	11
I.4.1. RENDIMIENTO Y SUS COMPONENTES.	11
I.4.1.1. Número de espigas por unidad de superficie	11
I.4.1.2. Número de granos por espiga	12
I.4.1.3. Peso del grano	12
I.4.2. UTILIZACIÓN DE CARACTERES MORFOLÓGICOS EN IDENTIFICACIÓN VARIETAL	13
I.5. CALIDAD MALTERA Y CERVECERA DE LA CEBADA.	14
I.5.1. PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA CALIDAD MALTERA	16
I.5.2. PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA CALIDAD CERVECERA DE LA MALTA	16
I.5.2.1. β -Glucanos y Arabinosilanos	16
I.5.2.2. Proteínas	18
I.5.2.3. Degradación del almidón	19

I.6. PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO DE CEBADA: HORDEÍNAS.	21
I.6.1. SÍNTESIS DE HORDEÍNAS DURANTE EL DESARROLLO DEL GRANO.	23
I.6.2. TIPOS DE HORDEÍNAS Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES	23
I.6.2.1. Hordeínas B	23
I.6.2.2. Hordeínas C	24
I.6.2.3. Hordeínas D	24
I.6.2.4. Hordeínas γ	25
I.6.3. UTILIZACIÓN DE HORDEÍNAS EN CLASIFICACIÓN VARIETAL	25
I.7. INHIBIDORES DE α -AMILASA/TRIPSINA DE ENDOSPERMO DE CEBADA	26
I.7.1. TIPOS DE INHIBIDORES DE CEBADA	27
1.7.1.1. Inhibidores monoméricos	28
1.7.1.2. Inhibidores diméricos	28
1.7.1.3. Inhibidores tetaméricos	29
I.7.1.4. Inhibidores de tripsina	29
I.7.2. PROTEÍNAS CM DE CEBADA	30
I.7.2.1. Síntesis de las proteínas CM de cebada y acumulación en el endospermo	31
I.7.3. DISTRIBUCIÓN GENÓMICA DE LOS GENES DE INHIBIDORES DE α -AMILASA/TRIPSINA DE CEBADA	32
I.7.4. VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA	33
I.8. OBJETIVOS	34

II. MATERIAL Y MÉTODOS	36
II.1. MATERIAL VEGETAL	37
II.2. MÉTODOS	41
II.2.1. MÉTODOS AGRONOMICOS	41
II.2.1.1. LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS . .	41
II.2.1.1.1. Ensayos de depuración	41
II.2.1.1.2. Ensayos de rendimiento	41
II.2.1.2. MEDIDAS DE DESARROLLO FENOLÓGICO. TASA DE APARICIÓN FOLIAR Y FILOCRONO	42
II.2.1.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	43
II.2.1.3.1. Caracteres morfológicos y fisiológicos observables durante el ciclo vegetativo	43
II.2.1.3.2. Caracteres morfológicos de espiga y grano seco . . .	44
II.2.1.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	47
II.2.1.4.1. Construcción de dendrogramas	47
II.2.1.4.2. Distribución unidimensional de caracteres	47
II.2.2. CALIDAD MALTERA Y CERVECERA	48
II.2.2.1. OBTENCIÓN DE LA MALTA	49
II.2.2.2. OBTENCIÓN DEL MOSTO	50
II.2.2.3. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD	50
II.2.2.3.1. Humedad	50
II.2.2.3.2. Proteína total	50
II.2.2.3.3. Proteína soluble	52
II.2.2.3.4. Índice Kolbach	52

Índice

II.2.2.3.5. Rendimiento del Extracto	52
II.2.2.3.6. Atenuación límite	53
II.2.2.3.7. Viscosidad	54
II.2.2.3.8. Índice Q de calidad cervecera	54
II.2.3. MÉTODOS BIOQUÍMICOS.	56
II.2.3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	56
II.2.3.1.1. Extracción de proteínas a escala preparativa	56
II.2.3.1.2. Extracción de proteínas a escala analítica.	56
II.2.3.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	57
II.2.3.2.1. Cromatografía de filtración molecular	57
II.2.3.2.2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	57
II.2.3.3. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS	58
II.2.3.3.1. Electroforesis unidimensional: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	58
II.2.3.3.2. Electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque (IEF) x electroforesis en geles de almidón (SGE) a pH 3,2	62
II.2.3.4. DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS	65
II.2.3.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: Método del ácido bicinconfónico (BCA)	66
II.2.3.6. ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA	67
II.2.3.6.1. Inhibición de α -amilasas	67
II.2.3.6.2. Inhibición de tripsina	69
II.2.3.7. SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS	70

III. RESULTADOS	71
III.1. EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS ...	72
III.1.1. DESARROLLO FENOLÓGICO DE LOS GENOTIPOS	72
III.1.2. RENDIMIENTO	73
III.1.3. COMPONENTES DEL RENDIMIENTO	76
III.1.3.1. N° de espigas / m ²	77
III.1.3.2. N° de granos/espiga	77
III.1.3.3. Peso de 1000 granos	78
III.1.3.4. Índice de cosecha	79
III.1.4. HEREDABILIDAD DEL RENDIMIENTO Y SUS COMPONENTES	80
III.2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ACCESIONES DE CEBADA ...	81
III.2.1. Caracteres morfológicos observables durante el ciclo vegetativo ...	81
III.2.2. Caracteres morfológicos de la espiga	84
III.2.3. Caracteres morfológicos del grano	85
III.2.4. Caracteres morfológicos de las espiguillas estériles	89
III.3. ESTUDIO DE LA CALIDAD MALTERA DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS	97
III.3.1. PROTEÍNA TOTAL	102
III.3.2. PROTEÍNA SOLUBLE	103
III.3.3. RENDIMIENTO DEL EXTRACTO	104
III.3.4. ÍNDICE KOLBACH	105
III.3.5. ATENUACIÓN LÍMITE	106
III.3.6. VISCOSIDAD	107

III.3.7. INDICE DE CALIDAD Q	108
III. 3.8. β -GLUCANOS	109
III. 3.9. HEREDABILIDAD DE LOS CARACTERES DE CALIDAD MALTERA	109
III.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS: HORDEÍNAS B, C Y D	110
III.4.1. HORDEÍNAS B	112
III.4.2. HORDEÍNAS C	113
III.4.3. HORDEÍNAS D	114
III.5. MARCADORES FILOGENÉTICOS: PROTEÍNAS CM	118
III.5.1. VARIANTES DE CMb	119
III.5.2. VARIANTES DE CMe	123
III.5.3. AGRUPACIONES ENTRE GENOTIPOS	124
III. 6. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA VARIANTE CMb-2 ...	127
III.6.1. OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN INHIBIDORES TETRAMÉRICOS	128
III. 6.2. AISLAMIENTO DE LA VARIANTE BTAI-CMb2	130
III. 6.3. SECUENCIA NH ₂ -TERMINAL DE BTAI-CMb2 Y BTAI-CMb2* .	131
III.6.4. DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS	132
III.6.5. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE BTAI-CMb2 Y BTAI-CMb2* COMO SUBUNIDADES DEL INHIBIDOR TETRAMÉRICO	133
III.7. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA CMe	134
III.7.1. OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN INHIBIDORES DE TRIPSINA	135

III.7.2. AISLAMIENTO DE LAS VARIANTES BTI-CMe2.1, - CMe2.2 Y -CMe2.3	137
III.7.3. AISLAMIENTO DE LAS VARIANTES BTI-CMe3.1 Y -CMe3.2 . .	139
III.7.4. SECUENCIAS NH ₂ -TERMINALES DE LAS VARIANTES PURIFICADAS	140
III. 7.5. ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A TRIPSINA DE LAS VARIANTES DE BTI-CMe PURIFICADAS	142
IV. DISCUSIÓN	143
IV.1. EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS . . .	144
IV.1.1. CICLO Y DESARROLLO DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS .	144
IV.1.2. RENDIMIENTO	144
IV.1.3. COMPONENTES DE RENDIMIENTO E INDICE DE COSECHA .	145
IV.1.4. VARIABILIDAD GENOTÍPICA PARA EL RENDIMIENTO Y SUS COMPONENTES	146
IV.2. CALIDAD MALTERA DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS	148
IV.2.1. PROTEÍNA TOTAL Y PROTEÍNA SOLUBLE	148
IV.2.2. RENDIMIENTO DEL EXTRACTO	149
IV.2.3. INDICE KOLBACH	150
IV.2.4. ATENUACIÓN LÍMITE	150
IV.2.5. β-GLUCANOS Y VISCOSIDAD	151
IV.2.6. INDICE Q DE CALIDAD CERVECERA	151
IV.3. ORIGEN DE LAS CEBADAS ESPAÑOLAS DE DOS CARRERAS	153
IV.3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ACCESIONES DE CEBADA.	154
IV.3.2. EVIDENCIAS BIOQUÍMICAS: HORDEÍNAS Y PROTEÍNAS CM	155

IV.3.2.1. Hordeínas B y C	155
IV.3.2.2. Proteínas CM	156
IV.3.3. IMPLICACIONES RELEVANTES EN EL ORIGEN DE LAS CEBADAS ESPAÑOLAS DE DOS CARRERAS.	157
IV.3.4. EVIDENCIAS HISTÓRICAS	158
IV.4. CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE CMb-2	160
IV.4.1. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA SUBUNIDAD BTAI-CMb2 <i>versus</i> BTAI-CMb1	161
IV.4.2. EFECTO DE LA GLICOSILACIÓN EN LA ACTIVIDAD DE BTAI-CMb1 Y BTAI-CMb2.	162
IV.5. NUEVAS VARIANTES ALELICAS DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA CMe	163
IV.5.1. SECUENCIAS NH ₂ -TERMINALES DE LAS VARIANTES DE BTI-CMe EN EL CULTIVAR HATIF DE GRIGNON.	163
IV.5.2. SECUENCIAS NH ₂ -TERMINALES DE LAS VARIANTES DE BTI-CMe EN EL CULTIVAR VALTICKY	164
IV.5.3. LAS VARIANTES GENÉTICAS DE BTI-CMe MUESTRAN DIFERENTE ACTIVIDAD INHIBITORIA	165
V. CONCLUSIONES	167
VI. BIBLIOGRAFÍA	170

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Esquema de degradación del almidón durante el proceso de malteado según MacGregor (1992)	20
Figura III.1. Distribución de las variables fecha de antesis, n° de hojas y filocrono del material autóctono respecto a testigos	74
Figura III.2. Distribución del rendimiento medio del material autóctono respecto a testigos	75
Figura III.3. Distribución de las variables n° de espigas/m ² y ahijamiento del material autóctono respecto a testigos	78
Figura III.4. Distribución del n° de granos/espiga del material autóctono respecto a testigos	79
Figura III.5. Distribución del peso de 1000 granos del material autóctono respecto a testigos.	79
Figura III.6. Distribución del Índice de cosecha del material autóctono respecto a testigos	80
Figura III.7. Caracteres morfológicos observados en planta, espiga y grano de las accesiones de cebada en estudio	83
Figura III.8. Dendrograma de los genotipos autóctonos en función de caracteres morfológicos	96
Figura III.9. Distribución de la proteína total del material autóctono respecto a testigos	102
Figura III.10. Distribución de la proteína soluble del material autóctono respecto a testigos	103
Figura III.11. Distribución del rendimiento del extracto del material autóctono respecto a testigos	104
Figura III.12. Distribución del Índice Kolbach del material autóctono respecto a testigos	105
Figura III.13. Distribución de la atenuación límite del material autóctono respecto a testigos	106

Figura III.14. Distribución de la viscosidad del material autóctono respecto a testigos	107
Figura III.15. Distribución del Índice de calidad Q del material autóctono respecto a testigos	108
Figura III.16. Distribución de los β -glucanos del material autóctono respecto a testigos	109
Figura III.17. SDS-PAGE de hordeínas B, C y D de endospermo de cebada	110
Figura III.18. A: Patrones electroforéticos de las hordeínas B. B: Interpretación esquemática de los patrones electroforéticos	112
Figura III.19. A: Patrones electroforéticos de las hordeínas C. B: Interpretación esquemática de los patrones electroforéticos	113
Figura III.20. Dendrogramas de los genotipos autóctonos en función de los patrones electroforéticos de las hordeínas B y C	117
Figura III.21. Mapas bidimensionales (IEF x SGE) e interpretación esquemática de las variantes alélicas aparecidas en el presente trabajo	120
Figura III.22. Mapas bidimensionales (IEF x SGE) de dos cultivares de cebada donde se observan otras proteínas detectadas en el presente trabajo	124
Figura III.23. Dendrograma de los genotipos autóctonos en función de las proteínas CM	125
Figura III.24. Distribución del porcentaje de las variantes de las proteínas CM de las cebadas españolas frente a las europeas	127
Figura III.25. Mapa bidimensional (IEF x SGE) del extracto etanol de los cultivares Hatif de Grignon y Bomi	128
Figura III.26. Filtración molecular en Sephadex G-100 de la preparación de inhibidores del cultivar Hatif de Grignon	129
Figura III.27. Mapa bidimensional (IEF x SGE) de la fracción F2 correspondiente a los inhibidores tetraméricos del cultivar Valticky	129
Figura III.28. Fraccionamiento mediante RP-HPLC de la fracción de filtración molecular de inhibidores tetraméricos (F2) del cultivar Hatif de Grignon	130

Figura III.29. SDS-PAGE de BTAI-CMa1, -CMd1, -CMb1, -Cmb2, -CMb1* y - CMb2*	131
Figura III.30. Alineamiento de las secuencias NH ₂ -terminales de las proteínas BTAI-CMb1, -Cmb2 y Cmb2*	131
Figura III.31. Tinción glicoproteínas de BTAI-CMb1, CMb1*, BTAI-CMb2 y CMb2*	132
Figura III.32. Mapa bidimensional (IEF x SGE) del extracto etanol de los cultivares Bomi, Hatif de Grignon y Valticky	135
Figura III.33. Filtración molecular en Sephadex G-100 de la preparación de inhibidores del cultivar Valticky	136
Figura III.34. Mapa bidimensional (IEF x SGE) de la preparación de inhibidores monoméricos del cultivar Hatif de Grignon	137
Figura III.35. Fraccionamiento mediante RP-HPLC de la fracción de filtración molecular correspondiente a inhibidores monoméricos (F4) del cultivar Hatif de Grignon	138
Figura III.36. SDS-PAGE de fracción de inhibidores monoméricos de Hatif de Grignon, BTI-CMe2.1, -CMe2.2, -CMe2.2 + -CMe2.3, -CMe2.3, fracción de inhibidores monoméricos del cultivar Valticky, BTI-CMe3.1, -CMe3.2, -CMe1 y -CMe1 + -CMe3.1	139
Figura III.37. Mapa bidimensional (IEF x SGE) de la fracción de inhibidores monoméricos (F4) del cultivar Valticky	139
Figura III.38. Fraccionamiento mediante RP-HPLC de la fracción de filtración molecular correspondiente a inhibidores monoméricos (F4) del cultivar Valticky	140
Figura III.39. Alineamiento de las secuencias NH ₂ -terminales de las proteínas BTI-CMe1, -CMe2.3, -CMe3.1 y -CMe3.2	141
Figura IV.1. Distribución de <i>H. spontaneum</i> y posibles vías de introducción de <i>H. vulgare</i> en la Península Ibérica	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Localización cromosómica de los genes que codifican inhibidores de α -amilasas/tripsina de cebada	32
Tabla II.1. Acciones de cebada analizadas	37
Tabla II.2. Valores de referencia y desviación estándar para los parámetros de calidad maltero-cervecera	55
Tabla III.1. Cuadrados medios y su significación para el n° de hojas y filocrono en 50 genotipos autóctonos	73
Tabla III.2. Análisis de la varianza para el rendimiento de 50 genotipos autóctonos, en las localidades de Gimennells, Bell.Lloc y Zamadueñas	73
Tabla III.3. Medias y separación de medias para el rendimiento, en las localidades de Gimennells, Bell.Lloc y Zamadueñas.	75
Tabla III.4. Cuadrados medios y su significación para el ahijamiento, espigas/m ² , granos/espiga, peso de 1000 granos e índice de cosecha de 50 acciones de cebadas españolas en dos localidades diferentes	76
Tabla III.5. Medias y separación de medias para el ahijamiento, n° de espigas/m ² , n° de granos/espiga y peso de 1000 granos, en las localidades de Gimennells y Bell.Lloc	77
Tabla III.6. Heredabilidad en sentido amplio y su error, para el rendimiento, ahijamiento, n° de espigas/m ² , granos/espiga, peso de 1000 granos e índice de cosecha, en el conjunto de genotipos autóctonos estudiados	81
Tabla III.7. Códigos asignados a los caracteres morfológicos observados en los genotipos autóctonos	92
Tabla III.8. Parámetros de calidad maltero-cervecera estimados para los genotipos autóctonos y testigos	98
Tabla III.9. Análisis de la varianza del contenido de proteína total del material autóctono	102
Tabla III.10. Análisis de la varianza del porcentaje de proteína soluble del material autóctono	103

Tabla III.11. Análisis de la varianza del rendimiento del extracto del material autóctono	104
Tabla III.12. Análisis de la varianza para el Índice Kolbach del material autóctono	105
Tabla III.13. Análisis de la varianza de la atenuación límite del material autóctono	106
Tabla III.14. Análisis de la varianza de la viscosidad del material autóctono	107
Tabla III.15. Análisis de la varianza del Índice de calidad Q del material autóctono	108
Tabla III.16. Valores de heredabilidad de la proteína total, proteína soluble, extracto, Índice Kolbach, atenuación límite, viscosidad e índice de calidad Q	109
Tabla III.17. Hordeínas B, C y D presentes en los genotipos en estudio	115
Tabla III.18. Proteínas CM presentes en los genotipos en estudio	121
Tabla III.19. Actividad inhibitoria frente a α -amilasa de <i>Tenebrio molitor</i> del tetrámero de cebada reconstituido con las subunidades purificadas	134
Tabla III.20. Actividad inhibitoria frente a tripsina de las fracciones obtenidas por filtración molecular (F2, F3 y F4) de los extractos crudos de inhibidores de los cultivares Hatif de Grignon y Valticky	137
Tabla III.21. Actividad inhibitoria frente a tripsina de las variantes de BTI-CMe purificadas	142

ABREVIATURAS

1-BAPA	: benzoil-L-arginil-p-nitroanilida
BMAI	: inhibidor monomérico de cebada de α -amilasas de insectos.
BDAI	: inhibidor dimérico de cebada de α -amilasas de insectos.
BTAI	: inhibidor tetramérico de cebada de α -amilasas de insectos.
BTI	: inhibidor de tripsina de cebada
BCA	: ácido bicinconínico
BSA	: albúmina de suero bovino
HPLC	: cromatografía líquida de alta presión
RP-HPLC	: cromatografía líquida de alta presión en fase reversa
IEF	: electroenfoque
kDa	: kilodaltones
mds	: mínima diferencia significativa
PAGE	: electroforesis en gel de poliacrilamida
PVDF	: difluoruro de polivinilideno
rpm	: revoluciones por minuto
SDS	: dodecil sulfato sódico
SGE	: electroforesis en gel de almidón
TCA	: ácido tricloroacético
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiléndiamina
Tris	: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
WMAI	: inhibidor monomérico de trigo de α -amilasas de insectos

I. INTRODUCCIÓN



I.1. ORIGEN DE LAS CEBADAS CULTIVADAS.

I.1.1. DOMESTICACIÓN

Toda especie cultivada procede de un antepasado silvestre. El paso de la condición de silvestre a la de cultivada se produce a través de un proceso conocido como domesticación, que se caracteriza por:

- ser continuo y progresivo
- extenderse en el tiempo y el espacio
- tener un punto de origen temporal que, en muchos casos, no puede determinarse con certeza por estar situado en épocas prehistóricas.

Las cebadas cultivadas pertenecen todas a la especie *Hordeum vulgare* L. *sensu lato*, que es un miembro de la tribu *Triticeae* de la familia *Gramineae*. Todas las especies del género *Hordeum* son silvestres, excepto *H. vulgare* subsp. *vulgare*, y se caracterizan por tener espiguillas unifloras, usualmente provistas de raquilla. Tres espiguillas unifloras forman una tripleta insertada en el raquis en un lugar opuesto a las adyacentes. La espiguilla central es siempre fértil, pero las laterales pueden ser total o parcialmente estériles o, por el contrario, fértiles.

La especie *Hordeum vulgare* L. consta de dos subespecies: *vulgare* (cebadas cultivadas), y *spontaneum* (cebadas de raquis frágil, en general silvestres)

La proximidad genética entre la cebada cultivada y la silvestre (*H. spontaneum*) es fruto de ser éstas antecesor de aquellas, trayendo como consecuencia una semejanza fenotípica entre ambas.

En *H. spontaneum* las espigas al llegar a la madurez se fragmentan y el grano cae facilitando la dispersión de las semillas, mientras que en las especies cultivadas, la espiga

permanece intacta y el grano persiste. La diferencia genética entre ambas viene determinada por varios genes :

1°. Los genes "brittle" (Bt) situados en el cromosoma 3, que determinan la tenacidad del raquis. La aparición de formas cultivadas de la cebada, se debe a mutaciones de tipo recesivo:

Bt (raquis frágil) ---> *bt* (raquis tenaz)

*Bt*₂(raquis frágil) ---> *bt*₂(raquis tenaz)

*Bt*₃(raquis frágil) ---> *bt*₃(raquis tenaz)

2°. Las cebadas silvestres son de dos carreras, es decir, que de las tres espiguillas de cada nudo del raquis, las dos laterales son estériles y sólo la central forma el grano. Las cebadas de seis carreras, en las que las tres espiguillas son fértiles, aparecieron hace aproximadamente diez mil años tras el proceso de domesticación (Helbaek, 1966). Dos genes independientes están implicados en este hecho, *V* e *I*, provocando el paso de dos a seis carreras según el tipo de mutación producida. De esta manera los genotipos y fenotipos posibles son:

<i>Genotipo</i>	<i>Fenotipo</i>
<i>VV ii</i>	Dos carreras normal
<i>VV II</i>	Tipo intermedio (espiguillas laterales desarrolladas)
<i>vv ii</i>	Seis carreras con flores laterales pediceladas
<i>vv II</i>	Seis carreras normal

3°. La aparición de cebadas cultivadas con granos desnudos, tuvo lugar hace unos 8.000 años con el proceso de la domesticación. Esta mutación está controlada por un gen simple recesivo (*nn*) que determina que las glumillas no se adhieran al grano haciendo a éste mucho más aceptable para el consumo humano.

Las cebadas cultivadas han sido cruzadas en repetidas ocasiones con varias especies de *Hordeum* (Bothmer et al., 1983), pero todos los híbridos resultan estériles o anómalos, excepto aquellos resultantes del cruzamiento con *H. spontaneum*. Ninguna otra especie parece estar involucrada en la evolución de la cebada cultivada (Harlan, 1975).

I.1.2. CENTRO DE ORIGEN DE LA CEBADA CULTIVADA

El centro de origen de una especie cultivada puede definirse como la región donde ha tenido lugar la domesticación de la misma, y puede ser reconocido porque en dicho centro el antecesor "silvestre" sobrevive junto con las formas cultivadas. Estas formas silvestres de la especie normalmente viven en el núcleo del centro de origen y, a veces, sobreviven como mala hierba en la periferia del mismo (Zohary, 1964).

La domesticación de la cebada comenzó hace unos diez mil años cuando en el período neolítico, el hombre adquirió su condición de agricultor y ganadero sedentario o seminómada, seleccionando entre las poblaciones silvestres de *Hordeum spontaneum* (cebadas de dos carreras con el raquis frágil, que dispersa sus semillas una vez maduras), aquellas plantas que eran más fácilmente cosechables por tener el raquis tenaz y, por tanto, no perder sus semillas al llegar a la madurez. Esta mutación producida naturalmente de forma recurrente durante la historia de la especie fue, a partir de este momento, el origen de una nueva planta cultivada. Esta planta mutante era fácil de reconocer por que destacaba de entre el resto por tener sus espigas maduras intactas en lugar de mermadas o ausentes en muchos de los casos.

El origen de las cebadas cultivadas ha sido explicado por diversos autores desde dos puntos de vista diferentes:

- El primero de ellos considera que la cebada cultivada es un cultivo monocéntrico, esto es, que tiene un centro de origen definido, el Creciente Fértil, y uno o más centros de diversidad (Harlan, 1979). La zona del Creciente Fértil abarcaría diversos países como Turquía, Irán, Irak, Jordania, Siria e Israel, donde la cebada fue domesticada hace unos 10.000 años a partir de una cebada silvestre de dos carreras con raquis frágil (Harlan y Zohary, 1966; Zohary, 1983; Zohary et al., 1988; Nevo, 1986).

Esta hipótesis está sustentada por diversos estudios realizados en base a caracteres morfológicos y bioquímicos de cebadas silvestres y cultivadas del Creciente Fértil, demostrándose elevadas similitudes entre ambas posiblemente debidas al flujo continuo de genes entre las dos especies (Jana et al., 1987).

Para estos autores el Creciente Fértil es además un centro de diversidad, donde están presentes múltiples genotipos adaptados a diferentes rangos ecológicos. En este centro se ha generado en los antecesores silvestres de las cebadas cultivadas, un amplio margen de diversidad adaptativa a múltiples enfermedades, plagas y estrés ecológico (Nevo, 1986). Esta diversidad genética haría posible la distribución de las cebadas silvestres y cultivadas hacia otras áreas geográficas, que ha su vez han sido consideradas como centros de diversidad alternativos, como podría ser Etiopía (Murphy y Witcombe, 1987).

No obstante, ha sido reconocida por estos autores la existencia de poblaciones periféricas de *H. spontaneum* en regiones tales como sudeste de Israel, costa mediterránea de Egipto, Libia y Marruecos, así como noreste de Irán, Asia soviética, Afganistán e India, aunque afirman que en estas regiones *H. spontaneum* raramente forma grandes poblaciones y está restringido a hábitats que han sido drásticamente alterados por la acción humana (Nevo, 1992; Harlan, 1992).

- La segunda teoría apunta hacia la existencia de múltiples centros de origen de la cebada cultivada. Existen diversos estudios que avalan dicha teoría basados en evidencias agromorfológicas y bioquímicas. Este es el caso de Marruecos, que ha sido considerado como un centro de domesticación para las cebadas cultivadas de seis carreras existentes en esta zona (Molina-Cano et al., 1987). Las poblaciones de *H. spontaneum* presentes en Marruecos se habrían adaptado a sobrevivir como una mala hierba entre los cultivares de cebada y presentan determinados caracteres morfológicos y bioquímicos que no se han observado en otras poblaciones de *H. spontaneum* procedentes del Creciente Fértil. A su vez estas poblaciones presentan estrechas similitudes fenotípicas y genotípicas con las cebadas cultivadas que se desarrollan en este país. Una situación similar ha sido descrita en Libia por Hammer et al.(1985) y en Etiopía (región muy alejada del Creciente Fértil) por Bekele (1983).

China también ha sido propuesta como centro de domesticación de la cebada cultivada (Vavilov, 1926, 1951; Takahashi, 1955; Xu, 1982, 1987). La distribución, ecología y herencia de determinados caracteres de las cebadas cultivadas que crecen en la meseta del Qinghai-Tibet, han sido identificadas como las descritas para las poblaciones de *H. spontaneum* distribuidas en esta zona y difieren ampliamente de las poblaciones de *H. spontaneum* del sudeste asiático.

Esta teoría ha sido apoyada por otros autores como Shao Quiquan (1981) quien demostró una estrecha relación citogenética entre las cebadas silvestres y cultivadas de China, y propuso el origen y evolución de la cebada cultivada como un proceso continuo con diferentes etapas, la primera de las cuales sería el *H. spontaneum* y la última la cebada cultivada, *H. vulgare*.

I.2. EL CULTIVO DE LA CEBADA.

La cebada, es el cuarto cereal en importancia en el mundo, después del trigo, maíz y arroz (FAO, 1991; Poehlman, 1985).

Aunque la cebada como especie cultivada tuvo su origen en zonas que se pueden considerar áridas, como consecuencia de más de 10.000 años de evolución dirigida por el hombre, ha conseguido adaptarse a zonas totalmente opuestas en cuanto a su productividad potencial. Hoy en día, se cultiva en un espectro de condiciones ambientales mucho más amplio que cualquier otro cereal, ocupando aquellas regiones con clima o condiciones medioambientales desfavorables para la producción de otros cultivos. Es una especie que se cultiva desde las regiones más áridas del norte de Africa, hasta las ricas y húmedas tierras del centro y norte de Europa. Asimismo, su adaptación en cuanto a latitud y altitud es enorme, desde la Región mediterránea al centro de Finlandia, y desde el nivel del mar en Holanda, hasta las laderas del Tibet (Himalaya). Para conseguir esta amplia área de adaptación, ha sido preciso desarrollar para la especie un gran número de grupos varietales que poseen morfología y fisiología muy diferentes.

Su persistencia como uno de los cereales más importantes durante muchos siglos, es debida a tres razones fundamentales:

1. amplia adaptación ecológica
2. doble uso para la alimentación humana y animal
3. empleo de la malta de cebada para la elaboración de cerveza.

La superficie dedicada al cultivo de cebada en el mundo, ha tenido una evolución claramente ascendente durante la década de los 70, hasta alcanzar los 97 millones de hectáreas en 1980. Posteriormente, ha ido disminuyendo y se ha estabilizado, en los últimos 10 años, alrededor de los 80 millones de hectáreas. Esto supone, aproximadamente un 11.2% de los 700 millones de hectáreas dedicados al cultivo de cereal en el mundo (FAO, 1991).

Los rendimientos medios de la cebada a nivel mundial, son ligeramente superiores a los de trigo, pero bastante inferiores a los de maíz o arroz. Así mismo varían mucho de un año a otro, debido fundamentalmente a que la mayor parte se cultiva en condiciones de secano. En este aspecto, se podrían agrupar los países del mundo en tres grupos principales:

1. Países europeos noroccidentales, con rendimientos próximos a los 5.000 kg/ha y con producciones muy estables.

2. Países con productividades intermedias (Canadá, USA, Polonia), en los que la introducción de nuevas variedades es importante, pero las áreas de cultivo son de condiciones subóptimas.

3. Países en los que las condiciones de cultivo son casi marginales, y las productividades muy bajas, del orden de 1.000-1.500 kg/ha (CEI, Australia, Marruecos, Irán) y en los que la incidencia de nuevas variedades es menor.

Entre estos dos últimos grupos podría situarse a España, donde las condiciones de cultivo se parecen, en muchas zonas, a las del norte de Africa, aunque también existen regiones en las que se obtienen rendimientos semejantes a los europeos.

I.2.1. LA SITUACIÓN EN ESPAÑA

En España, la mayor parte de la superficie de cultivo de cebada se encuentra en regiones del interior, con clima continental, escasas precipitaciones, temperaturas bastante extremas entre invierno y verano y suelos pobres. El estrés hídrico es uno de los principales factores que influyen negativamente en la producción, afectando a una parte importante del país.

En lo referente a rendimiento, cabe destacar por un lado las productividades medias tan bajas (2.000-2.500 kg/ha) y por otro, la variabilidad tan elevada de un año para otro. Ambos aspectos son menos acusados en las zonas de cultivo de cebadas de dos carreras que en las de seis, debido por un lado a las mejores condiciones agroclimáticas donde se cultivan y, por otro, a su mayor potencial productivo. Por el contrario, en la zona de cultivo de cebadas de seis carreras, las producciones son menores y más erráticas, puesto que ocupan las zonas más áridas y marginales (López-Fuster, 1985; Romagosa y Araus, 1991) y las variedades utilizadas son más antiguas.

I.3. IMPORTANCIA DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS

El gran desarrollo experimentado por la agricultura mundial, y la puesta en práctica de técnicas modernas de mejora genética han permitido, de manera gradual, un importante aumento de la productividad de los cereales en los últimos años.

En este sentido cabe señalar la introducción de nuevas variedades mejoradas capaces de proporcionar un alto rendimiento si se dispone de condiciones adecuadas de cultivo en cuanto a humedad del suelo, fertilizantes, pesticidas, etc, así como de prácticas agronómicas adecuadas.

Sin embargo, con la introducción masiva de nuevas variedades se ha ido favoreciendo una pérdida de la variabilidad genética de las variedades tradicionales.

La agricultura es un fenómeno histórico que tuvo lugar hace unos 10.000 años en el Creciente Fértil. Desde sus comienzos, los primeros agricultores fueron seleccionando aquellas poblaciones silvestres, como es el caso de la cebada, que presentaban algunas características favorables, cuya selección en este caso se fue dirigiendo hacia aquellas plantas con raquis tenaz y por tanto más fácilmente cosechables. De esta manera, de forma parcialmente inconsciente, se estaban realizando una serie de selecciones utilizando tan sólo

una pequeña parte de la enorme variabilidad presente en las especies silvestres de este género.

Desde entonces, con el paso de las generaciones, se ha ido extendiendo la agricultura llevándose poblaciones de plantas cultivadas a diferentes ambientes, donde han sido genéticamente enriquecidas por fenómenos de mutación, introgresión y presiones selectivas, dando lugar a "variedades locales" adaptadas al medio donde se desarrollan. A estos cultivares primitivos así como a las especies silvestres afines a las cultivadas, se les denomina "recursos fitogenéticos".

Actualmente es reconocida de forma universal, la importancia económica de los recursos fitogenéticos y se han desarrollado una serie de medidas de preservación de los mismos, aunque una parte importante del total de la diversidad de estos todavía permanecen sin conservar.

Cabe destacar en este sentido, el establecimiento en el año 1974 del IBPGR (International Board of Plant Genetic Agricultural Research), que recientemente se está transformando en el IPGRI (International Plant Genetic Resources Institut). De esta manera se ha extendido la idea de la preservación de los recursos genéticos a escala internacional y han crecido centros especializados en la recolección, conservación y evaluación de los mismos, como son los Bancos de Germoplasma.

Como resumen podríamos decir que las fuentes de diversidad genética son las bases de una agricultura dinámica, diversa y adaptable, hecho indispensable para asegurar la economía agrícola de un país, por lo que la conservación de los recursos fitogenéticos debe ser parte fundamental de las estrategias a desarrollar.

I.4. CARACTERES AGRONÓMICOS EN LA EVALUACIÓN DE CULTIVARES DE CEBADA

I.4.1. RENDIMIENTO Y SUS COMPONENTES.

El rendimiento de un cereal puede considerarse como el resultado del producto de ciertos parámetros o componentes, lo que permite estudiar con gran exactitud la contribución de las distintas partes de la planta a la producción de grano y las causas de la variación en la cosecha final. Puede expresarse por el producto de tres componentes:

$$\text{Producción grano } \left(\frac{\text{g}}{\text{m}^2}\right) = \frac{\text{n}^\circ \text{espigas}}{\text{m}^2} \times \frac{\text{n}^\circ \text{granos}}{\text{espiga}} \times \text{peso grano } \left(\frac{\text{g}}{\text{grano}}\right)$$

Estos componentes se determinan secuencialmente a lo largo del desarrollo de la planta, bien durante el período previo a la antesis (número de espigas), en la antesis (número de granos por espiga) o entre la antesis y la madurez (peso del grano) y están parcialmente relacionados de modo que no son independientes.

I.4.1.1. Número de espigas por unidad de superficie

El número de espigas por unidad de superficie depende de dos variables: n° de plantas por unidad de superficie y el n° de espigas por planta.

El número de plantas por unidad de superficie está determinado, principalmente, por la dosis de siembra y la nascencia.

El número de espigas por planta se determina durante el período previo a la antesis y depende tanto de la cantidad de hijuelos formados por la planta como de la proporción de los mismos que puedan diferenciarse hacia una espiga fértil durante la fase de espigado.

El número de hijuelos que puede formar una planta depende fundamentalmente de las características genotípicas de la misma, de la densidad de siembra y del aporte de nutrientes (Briggs y Aytenfisu, 1980; Simmons et al., 1982; Fowler, 1983; García del Moral et al., 1984; De la Morena et al., 1986; Hay y Walker, 1989; Kochlann et al., 1990). La proporción de tallos que pueden dar lugar a espigas es el resultado de la competición por un suministro limitado de asimilados dentro de la planta y por la intercepción de la luz dentro del cultivo (De la Morena et al., 1986).

I.4.1.2. Número de granos por espiga

El n° de granos por espiga resulta del n° de primordios florales formado por el meristemo apical, de la cantidad de ellos que puedan producir una espiguilla fértil y del porcentaje de éstas que sean fecundadas en la antesis para originar granos viables. Está determinado genéticamente, aunque, durante el período de iniciación floral las condiciones ambientales adversas pueden hacer que un gran número de espiguillas aborten y no se formen granos fértiles (Hay y Walker, 1989).

I.4.1.3. Peso del grano

El peso del grano constituye el tercer y último componente del rendimiento en la cebada. Su magnitud se determina durante la etapa de acumulación de fotoasimilados y depende, fundamentalmente, de la cantidad de asimilados disponibles para ser transportados hacia la espiga durante su formación y de la translocación de las reservas existentes en la planta hacia el tallo.

La actividad fotosintética durante el período de llenado del grano y las reservas acumuladas durante el período de pre-antesis, contribuyen en cierta medida, a la formación del grano (Hay y Walker, 1989). En la cebada, el peso medio del grano es un componente de la cosecha relativamente estable, bajo condiciones normales de cultivo. Esta estabilidad es atribuida a la movilización de asimilados desde las reservas de carbohidratos almacenados en el tallo y otros órganos vegetativos, las cuales pueden compensar la disminución en la capacidad de fotosíntesis durante el llenado del grano.

El hecho de que los componentes del rendimiento se determinen secuencialmente a lo largo del desarrollo, proporciona a los cereales la capacidad de compensar efectos adversos sobre los primeros componentes del rendimiento mediante la elevación de los siguientes, si las condiciones ambientales lo permiten.

1.4.2. UTILIZACIÓN DE CARACTERES MORFOLÓGICOS EN IDENTIFICACIÓN VARIETAL

Desde el momento en que las cebadas cultivadas dejaron de ser en su mayoría mezclas de genotipos (poblaciones locales) y se aproximaron más al concepto de línea pura, comenzaron a llevarse a cabo trabajos de descripción de las mismas con cierto rigor.

Los primeros intentos de clasificación de las cebadas cultivada atendiendo a caracteres morfológicos estables del grano, fueron llevados a cabo por Neergaard (1889) en Svalöf (Suecia), Huber (1932) y Bell (1937).

La primera clasificación de las cebadas en base a caracteres morfológicos de espiga y grano, fue realizada por Bergal y Friedberg (1940) que, junto con trabajos posteriores (Bergal, 1949), contribuyeron a destacar la importancia del 'valor taxonómico' de los caracteres morfológicos, definido por Villena (1955) como estabilidad bajo diferentes medios y facilidad de observación.

Con el sentido de valor taxonómico se planteó la necesidad de utilizar para la clasificación de los cultivares, caracteres morfológicos estables, pudiéndose dividir estos en dos grupos:

- Observables durante el ciclo vegetativo
- De espiga y grano seco.

Algunos de los caracteres morfológicos utilizados tradicionalmente en la taxonomía e identificación de cultivares, se citan en el apartado II.1.4.

Las técnicas de identificación de variedades son muy útiles en una especie como la cebada, en la que cada año se lanzan al mercado un gran número de nuevas variedades, las cuales dada la estrecha base genética de que proceden, son muy difíciles de distinguir. Mediante el estudio de grupos de caracteres como los anteriormente mencionados, pueden clasificarse las variedades de cebada en grupos teniendo en cuenta niveles de semejanza globales. Estos estudios, hoy en día, quedan complementados mediante métodos estadísticos adecuados, como es la taxonomía numérica, para producir agrupaciones de variedades según su nivel de relación.

I.5. CALIDAD MALTERA Y CERVECERA DE LA CEBADA.

El proceso de la fabricación de la cerveza es, en principio, muy simple. La materia prima es la cebada que, mediante un proceso previo de germinación, se ha transformado en malta. El mosto producido a partir de la malta fermenta, transformándose el azúcar en alcohol y anhídrido carbónico que, tras el acondicionamiento debido, forman la cerveza (Hassan, 1989).

El malteado es una fase previa a la fabricación de la cerveza y constituye una industria aparte aunque íntimamente ligada a la cervecera. La cebada como tal no produce

un extracto fermentable por las levaduras sino que el grano debe sufrir un comienzo de germinación. En este proceso el embrión pasa del estado de vida latente a un estado de actividad, induciéndose la secreción de diversos enzimas que difunden por todo el endospermo. Este comienzo de la germinación es el malteado y a la cebada germinada y tostada se la denomina malta.

En la malta coexisten una mezcla de enzimas y sustratos. Los principales sustratos son el almidón, proteínas y β -glucanos del grano de cebada y los enzimas son los producidos durante la germinación para degradar estos sustratos.

La modificación que experimenta el grano de cebada durante el malteado puede ser dividida en dos partes: degradación de la pared celular de las células del endospermo e hidrólisis de la matriz protéica. Como resultado de estas reacciones bioquímicas el endospermo se vuelve "friable" y se dice que la malta se encuentra desagregada. Es de suma importancia que al terminar la germinación la malta esté totalmente desagregada pues de lo contrario los enzimas no podrían actuar con facilidad, ocasionando la aparición posterior de materias insolubles en el mosto y alterando, por tanto, sus propiedades. Como resultado de la acción de las enzimas hidrolíticas se libera el almidón, que se encuentra embebido por la matriz de proteínas y éste se transformará en azúcares susceptibles a la fermentación.

La composición química del grano de cebada y la capacidad potencial para producir una cantidad equilibrada de enzimas no es suficiente para garantizar la calidad de la malta. La estructura física de las células del endospermo también condiciona dicha calidad, determinando la capacidad de absorción de agua por el grano necesaria para la germinación (comienzo del malteado), así como el flujo de enzimas hidrolíticos desde la capa de aleurona al interior del grano.

I.5.1. PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA CALIDAD MALTERA

Una variedad de cebada de alta calidad maltera debe poseer una serie de propiedades físicas y fisiológicas, que quedan resumidas en el siguiente esquema (Molina-Cano, 1989):

Propiedades físicas:

- .grano grueso y redondeado de tamaño uniforme
- .color amarillo claro del grano
- .glumillas finas y rizadas
- .libre de infecciones de microorganismos

Propiedades fisiológicas:

- .bajo o nulo período de letargo
 - .buena capacidad de absorción de agua
 - .germinación uniforme y rápida
 - .máximo rendimiento en malta (mayor cantidad posible por unidad de peso de cebada)
 - .desagregación máxima y uniforme (en referencia a la digestión enzimática de las paredes celulares y matriz proteínica)
-

I.5.2. PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA CALIDAD CERVECERA DE LA MALTA

I.5.2.1. β -Glucanos y Arabinosilanos

Desde un punto de vista estrictamente cualitativo, la malta debe estar suficientemente desagregada y tener un bajo contenido en β -glucanos, para que la viscosidad del mosto sea baja y la filtración del mismo sea fácil.

El embrión y la capa de aleurona del grano de cebada, son tejidos vivos en los que se desarrollan importantes fenómenos fisiológicos. Cuando comienza la germinación, el embrión produce y transporta ácido giberélico hacia la capa de aleurona y el escutelo, que actúa como señal para que se induzca la síntesis de enzimas necesarios para degradar las paredes celulares de las células del endospermo.

El mayor componente de las paredes celulares del endospermo es un polímero de glucosa, (1->3)(1->4) β -glucano, comúnmente llamado β -glucano (Fincher, 1975). Este polisacárido actúa como una barrera física para la distribución de diferentes enzimas hidrolíticos hacia el interior de las células del endospermo y limita la hidratación del mismo al comienzo de la germinación. Por consiguiente, durante el proceso de malteado, esta pared celular deberá ser degradada para permitir el acceso a enzimas proteolíticos que actuarán sobre la matriz protéica que envuelve a los gránulos de almidón. El esfuerzo en disminuir el contenido en β -glucanos es un objetivo en diversos programas de mejora de cebada cervecera (Molina-Cano et al., 1989). Una cebada será además de buena calidad maltera, si produce elevados niveles de β -glucanasas capaces de movilizarse a través del endospermo durante el proceso de malteado, y causar hidrólisis extensivas de los β -glucanos.

Los β -glucanos también son causa potencial de problemas durante la fabricación de cerveza puesto que forman soluciones viscosas que entorpecen la filtración del mosto (Bamforth, 1982; Wainwright, 1990). Así mismo, algunos productos resultantes de la degradación de los β -glucanos, han sido relacionados con la formación de turbidez en la cerveza (Yamashita et al., 1986).

Las paredes celulares del endospermo también contienen un 20% de arabinoxilanos (Fisher, 1975). Estos compuestos forman soluciones que contribuyen a la viscosidad del extracto (Bhatty et al., 1991) al no ser degradados totalmente durante el malteado (Angelino et al., 1991), debido en parte, al contenido insuficiente de arabinoxilanasas sintetizadas durante la germinación (Slade et al., 1989). Por tanto los cultivares de cebada más adecuados

para la industria de la maltería, serían aquellos que contengan bajos niveles de arabinosanos pero, a la vez, elevados niveles de síntesis de los enzimas hidrolíticos apropiados.

I.5.2.2. Proteínas

Las proteínas de la cebada no están distribuidas uniformemente a través del grano. Las células de la aleurona y subaleurona, son ricas en proteínas y contribuyen al contenido de proteínas totales del grano (Millet et al., 1991; MacGregor, 1991a). En el endospermo predominan las proteínas de reserva cuya distribución no es homogénea. En general, el contenido en proteínas de reserva es mayor en la periferia del endospermo que en el centro (Palmer, 1989), aunque la distribución de los diferentes tipos de proteínas a través del endospermo puede variar entre cultivares (MacGregor, 1992). Estas proteínas se encuentran formando una densa matriz que envuelve a los gránulos de almidón existentes en el interior del grano.

Las hordeínas, proteínas de reserva de la cebada, están involucradas en varios aspectos de los procesos de malteado y fabricación de cerveza (Smith, 1990):

- El elevado contenido en proteínas en la periferia del endospermo, puede dificultar una hidratación óptima necesaria para el proceso de germinación y puede retardar la migración hacia el interior de los enzimas hidrolíticos secretados por la capa de aleurona durante el malteado.

- Representan junto con otras proteínas del grano, una fuente de aminoácidos que son nutrientes necesarios para el metabolismo de las levaduras en la etapa de la fermentación y son requeridos para la coloración de la cerveza.

- Las hordeínas han sido implicadas en procesos de formación de "geles" de proteínas o estructuras gelatinosas, (Van den Berg et al., 1981; Smith y Lister, 1983), que pueden

provocar problemas en la filtración del mosto. La estructura de estos geles y su relación con la calidad maltera ha sido estudiada por Moonen et al. (1987). Están compuestos por una o dos subunidades de elevado peso molecular (HMW) y varias subunidades de bajo peso molecular (LMW), previamente identificadas por otros autores como hordeínas D y B respectivamente (Smith y Lister, 1983).

- La aparición de turbidez en la cerveza durante su almacenamiento, se debe en parte a la precipitación de las proteínas solubles al reaccionar con las proantocianidinas, grupo principal de polifenoles presentes en el medio.

- El contenido en proteínas del grano de cebada es un criterio tradicional para evaluar la calidad maltera de una cebada. Se correlaciona inversamente con el contenido de almidón del grano y con el rendimiento del extracto de la malta. El contenido total de proteínas del grano, no predice por sí solo la realización del proceso del malteado pero puede utilizarse para rechazar aquellas partidas que, por contener demasiada proteína, puedan disminuir el rendimiento del extracto.

I.5.2.3. Degradación del almidón

Las α -amilasas son los principales enzimas implicadas en la degradación de los gránulos de almidón durante el malteado. Los productos solubles son hidrolizados posteriormente por β -amilasas con la formación de maltosa y otras moléculas de bajo peso molecular (Figura I.1).

Las β -amilasas son inactivadas de forma relativamente rápida a 60-65 °C de temperatura (Axcell y Murray, 1980; Moll et al., 1981), por tanto es importante que estén presentes elevados niveles de α y β -amilasas para que la hidrólisis de almidón concluya antes de que estos enzimas sean inactivados.

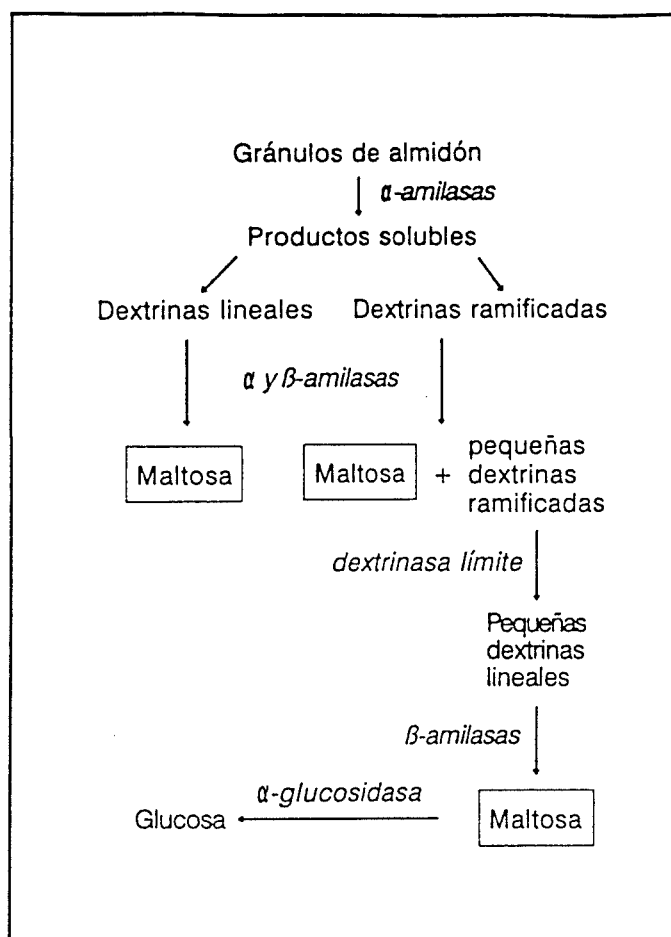


Figura I.1. Esquema de degradación del almidón durante el proceso de malteado, según MacGregor (1992).

Existen diversos intereses en la industria maltera y cervecera para reducir la proporción de pequeños gránulos de almidón en el malteado de la cebada (Brookes, 1988; Maule, 1989). La existencia de estos pequeños gránulos es debida en parte a la liberación incompleta de los gránulos de la matriz de proteínas durante el malteado y a la lenta hidrólisis durante la captación de agua (Palmer, 1989; MacGregor, 1991b).

Como resumen, se enumeran los factores económicos que determinan la calidad cervecera de la malta (Molina-Cano et al., 1989):

- Rendimiento en extracto elevado (máximo volumen de mosto obtenido por kilo de malta)

- Porcentaje de proteína total moderadamente bajo (correlacionado negativamente con el extracto)
- Porcentaje de glumillas (en peso) mínimo
- Actividad suficiente de las enzimas amilolíticas
- Atenuación límite elevada (buena fermentabilidad del mosto)
- Baja viscosidad del mosto
- Bajo contenido de β -glucanos en el mosto
- Elevado contenido de aminoácidos
- Mosto de color claro
- Bajo contenido de polifenoles
- Ausencia de sabores y olores extraños en el mosto
- Color, olor y gusto correctos de la cerveza terminada

I.6. PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO DE CEBADA: HORDEÍNAS.

El endospermo del grano juega un importante papel en el ciclo de vida de una planta de cereal. Se desarrolla sobre un período de 40-50 días, representando el tejido más importante del grano (82% del peso seco). Aproximadamente entre un 35% y un 50% del nitrógeno total en el endospermo maduro de la cebada se encuentra en forma de proteínas de reserva. (Kirkman et al., 1982).

Su constitución genética es triploide, y de las tres copias de cada cromosoma, dos corresponden al gametofito femenino y la tercera al masculino. En su composición entran aproximadamente un 80-85% de carbohidratos (fundamentalmente en forma de almidón), 2% de grasas, 1% de sales minerales y un 12-17% de proteínas.

Los primeros trabajos sobre caracterización de proteínas de semilla, se llevaron a cabo en gluten de trigo, diferenciándose por su solubilidad (Osborne, 1924):

1. albúminas : solubles en agua.
2. globulinas: solubles en disoluciones salinas
3. prolaminas: solubles en disoluciones alcohólicas
4. glutelinas: solubles en disoluciones alcalinas o ácidas diluidas o en disoluciones salinas o alcohólicas en presencia de un agente reductor.

Osborne reconoció que las proteínas solubles en alcohol constituían un grupo diferenciado, al que llamó prolaminas (ricas en prolina y glutamina). La fracción insoluble en alcohol del gluten de trigo se denominó glutenina, y la fracción homóloga correspondiente a otras especies se conoció como glutelina.

Las prolaminas de cebada se denominan hordeínas en relación al género *Hordeum* al que pertenecen. Se pueden definir como proteínas específicas del endospermo, que son depositadas en cuerpos protéicos, con un bajo contenido en lisina y un elevado contenido en glutamina y prolina.

Pueden ser separadas por electroforesis en base a su tamaño molecular o a una combinación de tamaño y carga. Cuatro grupos de polipéptidos han sido reconocidos en base a estos factores, (Mifflin et al., 1983; Cameron-Mills y Brandt, 1988; Kreis y Shewry, 1992):

hordeínas D: prolaminas de alto peso molecular

hordeínas C: prolaminas pobres en azufre

hordeínas B: prolaminas ricas en azufre

hordeínas γ : prolaminas ricas en azufre

Los grupos de las fracciones de hordeínas B y C están formados por varios polipéptidos, separados en patrones discretos de bandas . Estos han sido utilizados en la identificación varietal puesto que cada variedad presenta un único patrón (Shewry et al., 1978a y 1978b; Marchylo, 1987).

Cada grupo está formado por unas series polimórficas de proteínas, las cuales difieren entre sí en número y movilidad electroforética. Además existe una gran similitud entre los componentes de diferentes variedades y homologías extensibles a grupos de proteínas similares en trigo y centeno (Miflin et al., 1983).

I.6.1. SÍNTESIS DE HORDEÍNAS DURANTE EL DESARROLLO DEL GRANO.

Debido a que las hordeínas no presentan un claro recambio (Shewry et al., 1979), la acumulación de las mismas es presumiblemente reflejo de su síntesis.

La síntesis de las hordeínas comienza sobre los 14 días después de la antesis, cuando el endospermo ha alcanzado aproximadamente un 40% del peso seco final (Rahman et al., 1982). Esta síntesis es posterior a la formación y acumulación de otros grupos de proteínas solubles y coincide con el tiempo en el que la mayor parte de las divisiones celulares cesan.

Las hordeínas se sintetizan con un péptido señal y se transportan al interior del retículo endoplasmático donde son empaquetadas dentro de cuerpos protéicos (Cameron-Mills y von Wettstein, 1980; Miflin et al., 1981).

I.6.2. TIPOS DE HORDEÍNAS Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES

I.6.2.1. Hordeínas B

Forman el grupo de hordeínas cuantitativamente más importante, un 70-80% del total. Cuando se fraccionan por electroforesis bidimensional, se pueden resolver entre 13-50 polipéptidos (Faulks et al., 1981; Mezler y Kleinhofs, 1987) con pesos moleculares comprendidos entre 29 y 45 kDa. Los estudios genéticos iniciales, indicaron que estas hordeínas están codificadas por el locus *Hor 2*, que estaría localizado en el brazo corto del

cromosoma 5, si bien en posición más distal que el locus *Hor 1* (Oram et al., 1975; Shewry et al., 1978a, 1980, 1985; Doll y Brown, 1979; Jensen et al. 1980). Estudios posteriores indicaron que la regulación genética de este grupo es más compleja, habiéndose añadido un locus nuevo denominado *Hor 4* (Netsvetaev y Sozinov, 1982, 1984; Shewry et al., 1987). Este locus está localizado también en el brazo corto del cromosoma 5, en una posición relativamente próxima al locus *Hor 1* (Shewry et al., 1987).

I.6.2.2. Hordeínas C

Constituyen el 10-20% de la fracción total de hordeínas. Están formadas por múltiples componentes polipeptídicos con pesos moleculares alrededor de los 66 kDa y codificados por una familia multigénica en el locus *Hor 1*, con sede en el brazo corto del cromosoma 5 (Oram et al., 1975; Shewry et al., 1978a, 1980, 1985; Doll y Brown, 1979; Jensen et al., 1980; Bunce et al., 1986). En electroforesis bidimensional se ha observado una gran variabilidad genotípica en número, peso molecular y punto isoeléctrico (Shewry et al., 1980) aunque, a pesar de esta diversidad, los diferentes polipéptidos conservan un elevado grado de homología estructural (Shewry et al., 1981; Brandt et al., 1981). Las hordeínas C tienen una composición de aminoácidos bastante inusual, con solo tres aminoácidos (glutamina, prolina y fenilalanina), que suponen aproximadamente un 80% del total.

I.6.2.3. Hordeínas D

Este tipo de hordeínas representa una fracción minoritaria del total de hordeínas, suponiendo un 1-2% de la fracción total. Consta tan sólo de uno o dos polipéptidos visibles en SDS-PAGE con un peso molecular aproximado de unos 97 kDa (Shewry y Mifflin, 1982; Shewry et al., 1983). Estas hordeínas están codificadas por un gen localizado en el locus *Hor 3*, con sede en el brazo largo del cromosoma 5 (Blake et al., 1982; Forde, 1985a; Bunce et al., 1986). Difieren del resto de grupos de hordeínas en su elevado contenido en glicina

y bajo contenido en prolina y presentan elevada homología en su secuencia con las glutelinas de alto peso molecular de trigo (Forde et al., 1983).

I.6.2.4. Hordeínas γ

Las hordeínas γ , de forma similar a las hordeínas D, suponen una fracción minoritaria del total de hordeínas del grano. Están codificadas por una pequeña familia multigénica probablemente localizada en el locus *Hor 5* del cromosoma 5, estrechamente ligado al locus *Hor 2* (Shewry et al., 1990). La secuencia de aminoácidos es rica en prolina y glutamina, presentando considerables homologías con las secuencias de γ -gliadinas y γ -secalinas. Las hordeínas γ tienen una movilidad parecida a la de las hordeínas B en geles SDS-PAGE (Cameron-Mills y Brandt, 1988), dificultando en gran medida su identificación, por lo que no se emplean en clasificación varietal.

A nivel molecular se han llevado a cabo diversos estudios sobre los genes que codifican los distintos tipos de hordeínas (Brandt, 1979; Forde et al., 1981, 1985a; Hopp et al., 1983). En este sentido cabe destacar que las hordeínas B, C y γ presentan secuencias similares basadas en un motivo común. En el caso de las hordeínas C estas secuencias suponen aproximadamente un 95% de la proteína y presentan elevadas homologías con secuencias de las hordeínas B y γ (Mezler y Kleinhofs, 1987). Estos hechos indican que los genes que codifican las hordeínas constituyen una familia multigénica, resultado de diferentes duplicaciones a partir de un mismo gen ancestral, con sede en el cromosoma 5 (Forde et al., 1985b).

I.6.3. UTILIZACIÓN DE HORDEÍNAS EN CLASIFICACIÓN VARIETAL

La identificación de variedades de cereales a partir de una sola semilla, es de gran importancia a nivel agronómico y tecnológico. Aunque las variedades de cereales pueden ser

definidas dentro de grupos en base a caracteres morfológicos, se suelen utilizar parámetros bioquímicos para completar esta identificación.

La electroforesis en geles de almidón (SGE) de gliadinas ha sido utilizada ampliamente en la identificación de variedades de trigo de forma aislada o en conjunto con otras características del grano. Diversos autores han demostrado que los patrones de isoenzimas (α -esterasas, peroxidasas y β -amilasas) pueden ser utilizados para confirmar identificaciones inciertas resultantes de la SGE de gliadinas (Molina-Cano y Elena-Roselló, 1978).

La aplicación de estas técnicas a la cebada comenzó en 1977 (Miflin y Shewry, 1977), constatándose que la resolución en geles de almidón daba resultados menos precisos (Autran y Scriban, 1977; MacCausland y Wrigley, 1977). El posterior desarrollo de métodos de extracción más eficaces (Shewry et al., 1978 a,b) generalizó el uso de SDS-PAGE, que permite la separación por pesos moleculares con bastante precisión. Se han publicado desde entonces múltiples trabajos aplicando ésta técnica a la identificación de variedades de cebada (Shewry et al, 1978 a,b, 1979; Marchylo y Laberge, 1980, 1981; Schildbach y Burbidge, 1985; Bouard, 1989), e incluso a la descripción de poblaciones locales (Jouve et al., 1990) y variedades españolas (Uribe-Echeverría y Molina-Cano, 1993).

I.7. INHIBIDORES DE α -AMILASA/TRIPSINA DE ENDOSPERMO DE CEBADA

En un gran número de especies del reino vegetal, han sido descritas numerosas proteínas que muestran actividad inhibitoria frente a enzimas hidrolíticos (proteasas y α -amilasas). En el caso de los inhibidores de α -amilasas, la mayoría muestran especificidad frente a enzimas heterólogos de origen animal y, a excepción de una subfamilia, no presentan actividad frente a enzimas endógenos (García-Olmedo et al., 1987; Silano, 1987). Estos inhibidores enzimáticos se acumulan en determinados tejidos vegetales, fundamentalmente

en tejidos de reserva como pueden ser frutos, tuberculos y semillas (García-Olmedo et al., 1987; Ryan, 1988, 1989).

En el caso de los cereales, la familia de inhibidores de α -amilasa/tripsina es particularmente abundante en el endospermo de trigo y cebada e incluye un grupo de proteínas que pueden ser extraídas selectivamente con mezclas cloroformo-metanol, denominadas proteínas CM, cuyas secuencias de aminoácidos las han relacionado con otros miembros de esta familia (Shewry et al., 1984; Barber et al., 1986a,b).

Aunque sus posibles funciones fisiológicas no se conocen con exactitud, el grado de divergencia que presenta esta familia reflejado en la diversidad de secuencias, dispersión de sus genes y en el amplio espectro de especificidades inhibitorias, indican un posible papel en los mecanismos de defensa de la planta frente a ataques de diversos insectos fitófagos (García-Olmedo et al., 1987). Estas circunstancias justifican el gran interés de estas moléculas como potenciales agentes defensores de la planta, susceptibles a manipulación genética por técnicas de DNA recombinante. En este sentido, la posibilidad de obtener plantas transformadas que expresen genes heterólogos, ha permitido demostrar la relación de ciertos inhibidores de proteasas con los mecanismos defensivos anteriormente mencionados (Hilder et al., 1987; Johnson et al., 1989).

I.7.1. TIPOS DE INHIBIDORES DE CEBADA

El primer miembro de la familia de inhibidores de α -amilasas/tripsina en cebada, fue descrito por Mikola et al., (1969) aislando una proteína de 14.1 kDa activa frente a tripsina e inactiva frente a proteinasas endógenas de malta. Posteriormente Boisen et al. (1970), purificaron un inhibidor similar, que fue secuenciado por Odani et al. (1983b), encontrando una homología entre este inhibidor y un inhibidor monomérico de α -amilasas de trigo previamente secuenciado por Kashlan y Richardson, (1981).

Según su grado de asociación en filtración molecular no disociante, los inhibidores de α -amilasas heterólogas de trigo y cebada, pueden clasificarse en tres grupos: monoméricos, diméricos y tetraméricos (Deponete et al., 1976; Sánchez-Monge et al., 1986; Gómez et al., 1989).

Todos ellos están formados por subunidades de un tamaño molecular próximo a 12 kDa y muestran distinta especificidad frente a α -amilasas de diversos orígenes (Buonocore et al., 1977; García-Olmedo et al., 1987; Silano, 1987).

1.7.1.1. Inhibidores monoméricos

En cebada ha sido identificado un inhibidor monomérico de 14.5 kDa denominado BMAI-1 (*Barley Monomeric Alpha-amylase Inhibitor*), que está glicosilado y es uno de los principales alérgenos de cebada asociado con la enfermedad del "asma de panadero" (Barber et al., 1989; Mena et al., 1992). La secuencia de esta proteína presenta una clara homología con inhibidores monoméricos de trigo (WMAI-1) y diméricos de cebada (BDAI-1), previamente descritos por otros autores (Kashlan y Richardson, 1981; Lázaro et al., 1988). BMAI-1 presenta una elevada actividad inhibitoria frente a α -amilasas de *Tenebrio molitor*, mientras que no se detecta actividad frente a α -amilasa salivar humana.

1.7.1.2. Inhibidores diméricos

Con respecto a los inhibidores diméricos de cebada, se ha aislado un inhibidor homodimérico específico de α -amilasa de insectos, BDAI-1 (*Barley Dimeric Alpha-amylase Inhibitor*), y se ha deducido su secuencia completa a partir del correspondiente clon de cDNA. Esta secuencia está más relacionada con la secuencia de inhibidores de α -amilasa monoméricos y diméricos de trigo que con la de inhibidores de tripsina de cebada, maíz, o un inhibidor bifuncional de mijo (Lázaro et al., 1988).

BDAI-1 inhibe α -amilasa de insectos a concentraciones que no son efectivas frente a α -amilasa salivar o pancreática. No obstante, la fracción correspondiente a los inhibidores diméricos del extracto bruto de inhibidores, sí presenta actividad inhibitoria frente a enzimas de origen humano. Este hecho parece indicar la existencia de otros inhibidores diméricos en cebada, hasta el momento desconocidos.

1.7.1.3. Inhibidores tetraméricos

En cebada, tres proteínas solubles en cloroformo-metanol (CMA, CMb y CMd) han sido identificadas como subunidades de un inhibidor tetramérico específico de α -amilasa de larvas de *Tenebrio molitor*, y no activo frente a enzima salivar humana ni frente a tripsina (Sánchez-Monge et al., 1986; Gómez et al., 1989). La reconstitución *in vitro* del inhibidor tetramérico se consiguió a partir de estas subunidades previamente purificadas, mostrando elevados niveles de inhibición.

Por otra parte, se ha demostrado que la subunidad BTAI-CMA presenta actividad por sí misma frente a α -amilasa de *Tenebrio molitor*, mientras que no se ha detectado esta actividad en BTAI-CMb ni BTAI-CMd (Barber et al., 1986b; Sánchez-Monge et al., 1986).

Recientemente ha sido identificada una forma glicosilada de la subunidad BTAI-CMb, denominada CMb*, que se une fuertemente a la IgE de pacientes con la enfermedad del "asma de panadero". (Sánchez-Monge et al., 1992). El efecto de la glicosilación en la actividad inhibitoria del tetrámero no ha sido comprobado hasta el momento.

1.7.1.4. Inhibidores de tripsina

El primer miembro de la familia de inhibidores de α -amilasa/tripsina descrito en cebada, fue una proteína anteriormente mencionada de 14.1 kDa aislada por Mikola y