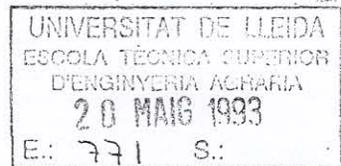


(043) "1993" Mor



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<sup>a</sup> ANGELES MORALEJO VIDAL

Lleida, 1993

0110-46760

Suolinna (1969). Trabajos posteriores detectaron actividad antitripsina en dos proteínas, solubles en cloroformo-metanol, del endospermo de cebada, CMe y CMc (Lázaro et al., 1985; Barber et al., 1986b), resultando ser la proteína CMe idéntica al inhibidor de tripsina previamente descrito por Mikola y Suolinna (1969). BTI-CMe (*Barley Trypsin Inhibitor*), es además inactiva frente a otras proteasas como quimotripsina, papaína, subtilopectidasa A, pepsina y  $\alpha$ -amilasas.

La secuencia de BTI-CMe y sus correspondientes clones cDNA y genómico (Odani et al., 1983b; Rodríguez-Palenzuela et al., 1989; Royo, 1991), presentan elevadas similitudes con proteínas homólogas aisladas en centeno, maíz y mijo (Lyons et al., 1987; Mahoney et al., 1984; Campos y Richardson, 1983), indicando un origen común de estas proteínas y posterior divergencia de las mismas. Por el contrario, BTI-CMc muestra mayor homología en cuanto a su estructura con BTAI-CMa que con BTI-CMe.

### I.7.2. PROTEÍNAS CM DE CEBADA

Una proporción elevada de los miembros del grupo de inhibidores de  $\alpha$ -amilasa / tripsina pueden ser extraídos selectivamente con mezclas cloroformo-metanol, denominándose proteínas CM (Salcedo et al., 1982). Hay que destacar su elevado porcentaje de cisteína (> 5%) y la proporción de aminoácidos hidrofóbicos inusualmente alta para globulinas, que podría explicar su solubilidad selectiva en mezclas cloroformo-metanol (Salcedo et al., 1982).

Los datos conocidos sobre la estructura primaria de estas proteínas (Odani et al., 1983b; Shewry et al., 1984; Lázaro et al., 1985; Barber et al., 1986a) sugirieron que podían estar relacionadas con inhibidores de  $\alpha$ -amilasas heterólogas y de tripsina previamente caracterizados (Shewry et al., 1984), lo que llevó a estudiar la capacidad inhibitoria *in vitro* de estas proteínas. De esta forma tres componentes de cebada fueron identificados como inhibidores (Lázaro et al., 1985; Barber et al., 1986b). Las proteínas CMc y CMe sólo

muestran actividad anti-tripsina, siendo esta última el inhibidor previamente descrito por Odani et al. (1983b). La proteína CMa es específicamente activa frente a  $\alpha$ -amilasa de *Tenebrio molitor* y por último CMb y CMd no presentan actividad por sí mismas, aunque son subunidades del inhibidor tetramérico de  $\alpha$ -amilasa (Sánchez-Monge et al., 1986).

#### I.7.2.1. Síntesis de las proteínas CM de cebada y acumulación en el endospermo

Estudios "*in vivo*" e "*in vitro*" sobre proteínas CM de cebada, cuya relación con los inhibidores ha sido comentada en apartados anteriores, revelaron que su síntesis se produce entre 15 y 20 días después de la polinización, alcanzando un máximo a la tercera semana (Paz-Ares et al., 1983; Gautier et al., 1990). Estas proteínas se sintetizan en polisomas ligados a membranas como precursores de peso molecular mayor (13-21 kDa) y sufren un procesamiento cotraduccional que rinde la proteína madura (12-16 kDa) (Paz-Ares et al., 1983).

Kirsi y Mikola (1971) demostraron que, anticuerpos obtenidos frente a inhibidores de tripsina de endospermo de cebada, no reaccionaban frente a inhibidores de embrión de grano de trigo, esto es, que los inhibidores de tripsina pertenecientes a esta familia, son específicos de endospermo. Estas proteínas no se han detectado ni en las cubiertas del grano ni en otros tejidos u órganos como hojas, raíces o coleóptilos (Buonocore et al., 1977).

Su síntesis parece realizarse en paralelo con los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas (Kirsi, 1973), y precede a la de las proteínas de reserva mayoritarias, alcanzando niveles detectables al octavo día después de la antesis (Pace et al., 1978). Durante la germinación, ambas actividades desaparecen drásticamente, lo que sugiere que no desempeñan un papel específico en dicho proceso (Kirsi y Mikola, 1971; Pace et al., 1978).

La localización subcelular de los diferentes miembros de esta familia, no ha sido claramente establecida. En el caso de los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas, existen evidencias

indirectas de asociación con gránulos de almidón (Buonocore et al., 1977). Recientes datos de inmunodetección parecen confirmar esta evidencia, sugiriendo una localización externa de los inhibidores en estos gránulos (Carmona, Sánchez-Monge, Gómez y Salcedo, datos sin publicar).

### I.7.3. DISTRIBUCIÓN GENÓMICA DE LOS GENES DE INHIBIDORES DE $\alpha$ -AMILASA / TRIPSINA DE CEBADA

Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa/tripsina de cebada, están codificados por una familia multigénica dispersa en varios cromosomas (Tabla I.1)

**Tabla I.1.** Localización cromosómica de los genes que codifican inhibidores de  $\alpha$ -amilasas/tripsina de cebada.

Actividad inhibitoria	Proteína	Locus	Cromosoma
$\alpha$ -amilasa (monoméricos)	BMAI-1	<i>Iam1</i>	2H <sup>a</sup>
$\alpha$ -amilasa (diméricos)	BDAI-1	<i>Iad1</i>	6H <sup>a</sup>
$\alpha$ -amilasa (tetraméricos)	BTAI-CMa	<i>Iat1</i>	7H <sup>b</sup>
	BTAI-CMb	<i>Iat2</i>	4H <sup>b</sup>
	BTAI-CMd	<i>Iat3</i>	4H <sup>b</sup>
Tripsina	BTI-CMe	<i>Itr1</i>	3H <sup>b,c,d</sup>
	BTI-CMc	<i>Itr2</i>	7H <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: Mena et al., 1992

<sup>b</sup>: Salcedo et al., 1984

<sup>c</sup>: Fra-Mon et al., 1984

<sup>d</sup>: Hejgaard et al., 1984

En conjunto, los datos de asignación cromosómica obtenidos en trigo y cebada, indican que esta familia multigénica se ha originado por duplicaciones y translocaciones, habiendo precedido esta dispersión a la divergencia evolutiva del genoma de cebada (H), de los genomas (A, B, D) presentes en trigo hexaploide (García-Olmedo et al., 1987).

#### **I.7.4. VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA**

A pesar de las diferencias observadas en su estructura primaria, la variabilidad intraespecífica de los miembros de esta familia es muy baja. Hasta el momento se han encontrado un limitado número de variantes alélicas tanto en cultivares de *H. vulgare* como en accesiones de *H. spontaneum*.

En cebada cultivada, no se han detectado ninguna variante genética de las proteínas CMa y CMc, mientras que se han encontrado variantes de estas proteínas en alguna accesión de *H. spontaneum* (Salcedo et al., 1984).

La proteína CMb, presenta una variante genética denominada CMb-2, detectada tanto en *H. vulgare* como en *H. spontaneum* (Salcedo et al., 1984).

En el caso de CMe, el inhibidor de tripsina mayoritario de la cebada, se han descrito hasta el momento, dos variantes genéticas designadas como CMe2-2' (en el presente trabajo citadas como 2.1 y 2.2), que se heredan conjuntamente y se expresan de forma codominante con respecto a BTI-CMe. Estas variantes están presentes en diversos cultivares de cebadas analizados así como en alguna accesión de *H. spontaneum* procedentes de Marruecos (Salcedo et al., 1984; Molina-Cano et al., 1987).

Por último, no se ha encontrado ninguna variante de CMd en *H. vulgare* ni en accesiones de *H. spontaneum* (Salcedo et al., 1984).

Debido a la baja variabilidad intraespecífica de las proteínas CM, este grupo de proteínas presenta gran interés en estudios filogenéticos y taxonómicos (Johnson, 1972; Delibes; Rodríguez-Loperena et al., 1975). Este es el caso del trabajo realizado por Molina-Cano et al.(1987), donde se demuestra que algunas variantes de las proteínas CM se encuentran restringidas a un origen geográfico determinado, como es el caso de CMe2.1-2.2 y CMb-2, cuya presencia se restringe a *H. spontaneum* de Marruecos y algunos cultivares europeos de posible origen marroquí.

## **I.8. OBJETIVOS**

El objetivo general del presente trabajo es contribuir a un mejor conocimiento de las características agronómicas y bioquímicas de las cebadas dísticas españolas, no empleadas hasta el momento en ningún programa de mejora. Para ello se tratarán aspectos centrales tales como el estudio del rendimiento y sus componentes del material autóctono, estudios de la calidad maltero-cervecera de estas cebadas, y estudios bioquímicos basados en proteínas de reserva (hordeínas) y proteínas solubles en cloroformo-metanol (CM).

Se estudiará así mismo la filogenia de las cebadas dísticas españolas mediante una caracterización morfológica de las accesiones en estudio y el uso de los marcadores bioquímicos anteriormente mencionados.

Para el desarrollo de estos objetivos se investigarán los siguientes aspectos concretos:

1. Ensayos de rendimiento de las cebadas españolas en localidades diferentes. Estudio de los componentes del rendimiento de las mismas y caracterización morfológica.
2. Pruebas de micromalteo de las accesiones de cebada y análisis de los parámetros fisicoquímicos que determinan la calidad maltero-cervecera.

3. Estudios de variabilidad intergenotípica fundamentados en patrones de proteínas de reserva de endospermo de cebada.
4. Estudios de variabilidad en las proteínas CM de las accesiones analizadas.
5. Determinación de la filogenia de las cebadas dísticas españolas mediante su comparación con cebadas europeas de diferente origen geográfico. Para este objetivo se emplearán hordeínas y proteínas CM como marcadores filogenéticos.
6. Aislamiento y caracterización de las nuevas variantes de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas/tripsina detectadas en el presente trabajo.
7. Estudio de las propiedades inhibitorias "in vitro" de las nuevas variantes purificadas.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

## II.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado en el presente trabajo, está formado por una colección de 97 accesiones de cebadas dísticas de diferente origen geográfico, enumeradas en la Tabla II.1.

Entre ellas se encuentran un total de 47 genotipos antiguos españoles, que forman parte de la colección de la Estación Experimental de Aula-Dei (Zaragoza), de la colección de La Cruz del Campo S.A. (Sevilla) y del Banco Nacional de Germoplasma del I.N.I.A. (Madrid).

El resto de genotipos estudiados en el presente trabajo, tienen su origen en Centroeuropa, Europa Oriental y Turquía. La procedencia de este último material es del National Small Grains Collection, U.S.D.A. También forman parte de la colección dos accesiones de *Hordeum spontaneum* procedentes de Grecia y Creta.

Se han utilizado las siguientes abreviaturas como códigos de cada tipo de colección:

- AD: Colección de la Estación Experimental Aula-Dei (Zaragoza)
- LCC: Colección de la Cruz del Campo S.A. (Sevilla)
- BNG: Colección del Banco Nacional de Germoplasma (INIA, Madrid)
- E: National Small Grains Collection

**Tabla II.1.** Accesiones de cebada analizadas

Accesiones	Código	Origen
Cervecera de Burguete	AD-5	Navarra. España
0188	AD-21	desconocido
Chevalier II	AD-34	Gran Bretaña
Skursmo	AD-36	desconocido
Granja de Jerez; línea 121	AD-47	Cádiz. España
Granja de Jerez; línea 7	AD-53	Cádiz. España
Granja de Jerez; línea 20	AD-54	Cádiz. España

Tabla II.1. (Continuación)

Accesiones	Código	Origen
Montagne	AD-75	Francia
Sarah	AD-77	Francia
Nue Grosse	AD-78	Francia
Largas de Ciudad Real	AD-79	Ciudad Real. España
Bohmerwald	AD-88	Checoslovaquia
Brautest Harzer	AD-89	Alemania
St.1256 Harar	AD-98	desconocido
Selección Merissa	AD-112	Marruecos
Alava 1	AD-122	Navarra. España
Aula Dei 1	AD-138	desconocido
Castejón de Sos	AD-161	Zaragoza. España
Samper de Calanda 3	AD-177	Teruel. España
Samper de Calanda 4	AD-179	Teruel. España
Torres de Berrellen 1	AD-182	Zaragoza. España
Biscarrues 4	AD-200	Huesca. España
Gudar 1	AD-234	Zaragoza. España
Tarazona	AD-244	Zaragoza. España
Pámula de Solsona	AD-248	Lleida. España
Isaria	LCC-49	Alemania
Kenia	LCC-50	Dinamarca
Pámula de Artés	LCC-63	Lleida. España
Pámula de Solsona	LCC-64	Lleida. España
Spratt Archer	LCC-72	Gran Bretaña
Almazan	LCC-286	Soria. España
Judes	LCC-287	Soria. España
Beltejar	LCC-288	Soria. España
Mosarejos	LCC-289	Soria. España
Retortillo	LCC-290	Soria. España
San Pedro Manrique	LCC-291	Soria. España
Branisovicky	LCC-304	Checoslovaquia
Chlumecky	LCC-305	Checoslovaquia
Detencky K.	LCC-306	Checoslovaquia

Tabla II.1. (Continuación)

Accesiones	Código	Origen
Manacky S.	LCC-307	Checoslovaquia
Rapid	LCC-308	Checoslovaquia
Slovensky	LCC-309	Checoslovaquia
Valticky	LCC-310	Checoslovaquia
Zefir	LCC-311	Checoslovaquia
BNG-2128	201L	León. España
BNG-7757	209L	Soria. España
BNG-8321	223L	Guadalajara. España
BNG-8739	229L	Toledo. España
BNG-8740	230L	Toledo. España
BNG-8741	231L	Toledo. España
BNG-8742	232L	Badajoz. España
BNG-8743	233L	Badajoz. España
BNG-8744	234L	Badajoz. España
BNG-8786	246L	Cuenca. España
BNG-9003	284L	Soria. España
BNG-9005	285L	Soria. España
BNG-9007	286L	Soria. España
BNG-9013	287L	Barcelona. España
BNG-9015	288L	Cuenca. España
BNG-9016	289L	Cuenca. España
BNG-9017	290L	Cuenca. España
BNG-9018	291L	Cuenca. España
BNG-9024	293L	Valladolid. España
BNG-9026	294L	Valladolid. España
BNG-9028	295L	Valladolid. España
BNG-9031	296L	Valladolid. España
White Smyrna	1-E	Turquía
Harlan J R 456	4-E	Turquía
Harlan J R 2509	5-E	Rumanía
Harlan J R 3882	6-E	Rumanía
Harlan J R 3904	7-E	Hungría

Tabla II.1. (Continuación)

Accesiones	Código	Origen
Harlan J R 8007	8-E	Bulgaria
<b>desconocido</b>	9-E	Turquía
Harlan J R 8031	10-E	Turquía
Harlan J R 4584	11-E	Turquía
Harlan J R 4585	12-E	Turquía
Harlan J R 4586	13-E	Turquía
Harlan J R 4609	14-E	Turquía
Harlan J R 4610	15-E	Turquía
Landsorte Von Aspang	16-E	Austria
Landsorte Von Horn	17-E	Austria
Landsorte Von Ramsau	18-E	Checoslovaquia
<b>desconocido</b>	19-E	Turquía
<b>desconocido</b>	20-E	Turquía
Moravan Hanacky	21-E	Checoslovaquia
Starovesky Hanacky	22-E	Checoslovaquia
Summer Barley	23-E	Hungría
Brewers barley	24-E	Hungría
Extensiv	26-E	Rumanía
A Hor 413/61	35-E	Turquía
A Hor 414/61	36-E	Turquía
Bavaria	39-E	Alemania
Danubia	40-E	Alemania
Oberpfalz	41-E	Alemania
Amrigschwander 2 zlg.	42-E	Alemania
<i>H.spontaneum</i>	H.sp	Creta-Grecia

## **II.2. MÉTODOS**

### **II.2.1. MÉTODOS AGRONOMICOS**

#### **II.2.1.1. LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS.**

##### **II.2.1.1.1. Ensayos de depuración**

Con el fin de depurar el material vegetal inicial y asegurar la homogeneidad del mismo, se realizaron ensayos de depuración varietal durante el año 90-91, en dos localidades diferentes de la provincia de Lleida: Gimennells (El Segrià) y Bell-Lloc (L'Urgell).

Cada parcela estaba formada por seis surcos de 1,5 m de longitud y 0,2 m de separación entre dos consecutivos. La separación lateral entre parcelas era de 30 cm y la distancia entre bloques de 1 m. En cada parcela el primer surco era de triticale, empleado como barrera física para separar visualmente y para evitar, en la medida de lo posible, mezclas físicas. Los cinco surcos restantes se sembraron cada uno con las semillas procedentes de una sola espiga.

En el año 91-92 se volvió a repetir este tipo de ensayo en las mismas localidades, sembrando cada surco con espigas procedentes de un surco del año anterior.

##### **II.2.1.1.2. Ensayos de rendimiento**

Se realizaron tres ensayos, cuyo diseño estadístico fue de bloques al azar con dos repeticiones, en tres localidades diferentes: Gimennells, Bell-Lloc (Lleida) y Zamadueñas Valladolid), durante el año 91-92.

Las parcelas tenían una longitud de 3m x 8 surcos separados entre sí 0,15m ; la distancia entre parcelas fue de 30 cm y se sembraron con una densidad de 350 semillas germinables por m<sup>2</sup>.

Para medir los componentes del rendimiento se tomaron a mano 0,5 m de dos surcos centrales de cada parcela. A partir de este material se determinó:

- n° de espigas
- n° de tallos
- n° de granos por espiga
- peso seco de las espigas
- peso seco de los tallos
- peso de 1000 granos

#### **II.2.1.2. MEDIDAS DE DESARROLLO FENOLÓGICO. TASA DE APARICIÓN FOLIAR Y FILOCRONO.**

La caracterización del ciclo vegetativo se hizo con la escala de Haun (1973). El sistema de notación de esta escala emplea la aparición regular de hojas en el punto de crecimiento, asignando a cada hoja una unidad y un decimal. El decimal expresa la fracción de la última hoja del tallo principal que se está desarrollando en relación con la última completamente desarrollada.

Se midió la escala de Haun en la localidad de Bell-Lloc, durante el año 1990-1991. Se anotaron en campo el número de hojas del tallo principal en diferentes momentos del período vegetativo de cinco plantas por parcela, marcadas con pintura en la última hoja completamente desarrollada (para controlar que fuesen siempre las mismas plantas).

Los valores de la escala de Haun obtenidos, se ajustaron por regresión a los grados-día acumulados desde la siembra al momento de cada muestreo (integral térmica), que se calcularon a partir de las temperaturas máximas y mínimas medidas diariamente en las estaciones meteorológicas de cada localidad, de la siguiente manera:

$$GDD \text{ (Grados-día diarios)} = \frac{T_{\max} + T_{\min}}{2} - T_{\text{base}}$$

$$GDA \text{ (Grados-día acumulados)} = \sum GDD$$

Para esta especie se recomienda utilizar como temperatura base el valor de 0°C (Bauer et al., 1984). La pendiente de la recta de regresión obtenida es directamente la tasa de aparición foliar, y su inversa es el filocrono.

El desarrollo fenológico del cultivo se controló también hasta la antesis mediante la escala de Zadocks-Chang (1974) con la misma regularidad que se tomaron medidas de Haun. Para la determinación de cada estadio se consideró la fecha en que el 50% de las plantas de la parcela presentaban las características propias del estadio en cuestión.

### II.2.1.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se realizó la descripción morfológica de una serie de caracteres útiles para la clasificación varietal, diferenciando cada carácter en tipos discriminatorios. Estos caracteres van seguidos de un código numérico, que sirve para clasificar las variedades en grupos de semejanza que serán procesados posteriormente.

#### II.2.1.3.1. Caracteres morfológicos y fisiológicos observables durante el ciclo vegetativo.

##### 1. Vellosidad de las vainas de la hojas basales

Glabras . . . . .	0
Vellosas . . . . .	1

2. Porte de la planta

Rastrero . . . . .	0
Semi-rastrero . . . . .	1
Erguido . . . . .	2

3. Posición de la banderola cuando emergen las aristas

Erguida . . . . .	0
Inclinada . . . . .	1
Colgante . . . . .	2

4. Pigmentación de las aurículas de la banderola

No pigmentadas . . . . .	0
Pigmentadas . . . . .	1

5. Precocidad del espigado

Tardía . . . . .	0
Intermedia . . . . .	1
Precoz . . . . .	2

**II.2.1.3.2. Caracteres morfológicos de espiga y grano seco.**

1. Longitud de las aristas

Más corta que la espiga . . . . .	0
Igual que la espiga . . . . .	1
Más larga que la espiga . . . . .	2

2. Longitud de la gluma (incluyendo su arista)

Más corta que la lemma . . . . .	0
Igual que la lemma . . . . .	1
Más larga que la lemma . . . . .	2

3. Vellosidad de las glumas

Glabras (sin pelos) . . . . .	0
Lampiñas (pocos pelos) . . . . .	1
Vellosas . . . . .	2

4. Tipo de collar

Cerrado . . . . .	0
En forma de V . . . . .	1
Abierto . . . . .	2

5. Perfil del raquis

Con entrenudos rectos . . . . .	0
Con entrenudos abultados . . . . .	1

6. Longitud media de los entrenudos del raquis (dividiendo la longitud de la espiga sin aristas entre el número de granos). Es una medida de densidad de la espiga.

Menor de 3 mm . . . . .	0
Entre 3 y 4 mm . . . . .	1
Mayor de 4 mm . . . . .	2

7. Vellosidad basal interna de los entrenudos del raquis (tercio medio de la espiga).

Nula o muy débil . . . . .	0
Fuerte . . . . .	1

8. Vellosidad de la raquilla

Pelos cortos y lanosos . . . . .	0
Pelos largos y sedosos . . . . .	1

9. Tamaño de las lodículas

Pequeñas . . . . .	0
Grandes y envolventes . . . . .	1

10. Vellosidad del surco ventral

Glabro . . . . .	0
Velloso . . . . .	1

11. Dentado de los nervios laterales de la lemma

Sin espinas . . . . .	0
Con espinas . . . . .	1

12. Color del grano desnudo

Azul o verde azulado . . . . .	0
Otros colores . . . . .	1

13. Disposición de las espiguillas estériles

Paralelas . . . . .	0
Divergentes . . . . .	1

14. Tamaño de las espiguillas estériles

Menor que la lemma . . . . .	0
Igual que la lemma . . . . .	1
Mayor que la lemma . . . . .	2

15. Vellosidad de las espiguillas estériles

Glabras . . . . .	0
Lampiñas . . . . .	1
Vellosas . . . . .	2
Muy vellosas . . . . .	3

16. Color de la raquilla

Blanca .....	0
Diversos tonos de amarillo o anaranjado .....	1

II.2.1.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

II.2.1.4.1. Construcción de dendrogramas

Para la construcción de los dendrogramas realizados en el presente trabajo, se utilizó el método 2M Block Clustering, con distancia Jaccard como coeficiente de similitud (Dixon et al., 1990).

II.2.1.4.2. Distribución unidimensional de caracteres

El método estadístico utilizado para observar el tipo de distribución que siguen las medias de los diferentes parámetros analizados, fue el Box Plot (Tukey, 1977) efectuado con el procedimiento UNIVARIATE del paquete estadístico SAS (1987). Este método sustituye al método clásico de histogramas, permitiendo una clara interpretación del tipo de distribución presentada.

El esquema general (Figura II.1) consiste en una caja central en cuyos ejes inferior y superior están representados los percentiles 25 (Q1)

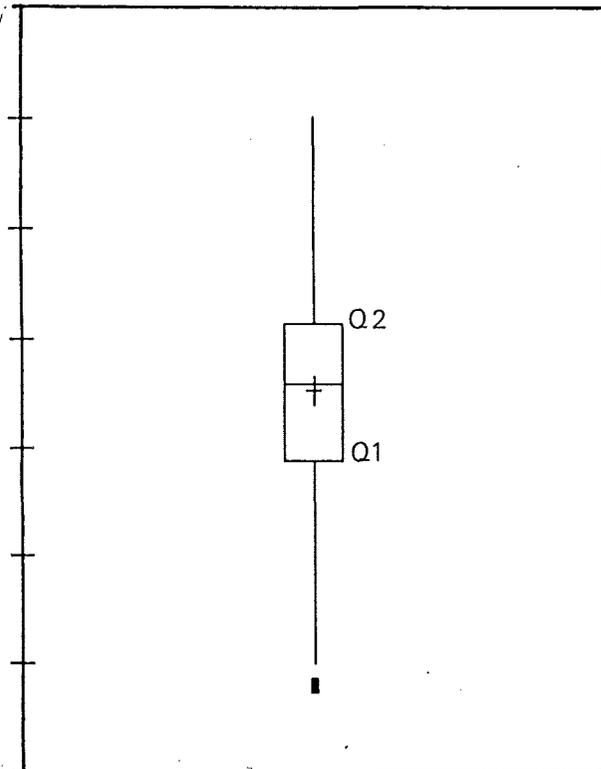


Figura II.1. Representación esquemática del box Plot

y 75 (Q3) respectivamente. En el centro de la caja aparece una línea horizontal cuyo valor es la mediana y también aparece un signo +, que representa la media. Las líneas verticales superior e inferior que parten de la caja, se construyen de la siguiente manera:

superior:  $1,5 \times (Q3-Q1) + Q3$

inferior:  $1,5 \times (Q3-Q1) - Q1$

Si existen valores extremos, por encima o debajo de las líneas verticales (valores entre los tres rangos intercuartiles), quedan representados con el símbolo ■.

## **II.2.2. CALIDAD MALTERA Y CERVECERA.**

Con el fin de evaluar la calidad cervecera de las variedades españolas estudiadas, se llevaron a cabo ensayos de micromalteado, en el centro receptor de cebada y maltería La Moravia S.A. (Bell-Lloc, Lleida). Asimismo se comprobó la calidad de la malta obtenida, a partir de determinados parámetros físico-químicos establecidos por la Analytical European Brewery Convention (4ª edición, 1987):

- Humedad
- Proteína total
- Proteína soluble
- Índice Kolbach
- Rendimiento del extracto
- Atenuación límite
- Viscosidad
- Índice Q de calidad cervecera

### **II.2.2.1. OBTENCIÓN DE LA MALTA**

Las pruebas de obtención de la malta se realizan en varias etapas a partir de 100 g de cebada por muestra.

#### **- Procedimiento**

##### **1. Remojo**

En esta etapa la cebada calibrada sobre un tamaño de 2,2 mm de grosor, se pone en remojo controlado con agua durante intervalos de 14, 10 y 2 horas, cambiándose el agua en cada paso.

##### **2. Germinación**

El proceso de germinación dura un total de 5 días bajo una temperatura controlada de 15°C. Los dos primeros días se pulveriza la cebada con agua y se remueve para facilitar la aireación así como para evitar que se apelmace. Los tres días restantes no precisan de la pulverización.

##### **3. Tostación**

Una vez germinada la cebada se procede a la tostación de la misma, que se realiza en dos etapas: la primera es de 20h a 60°C y la segunda de 4h a 80°C.

Posteriormente la cebada germinada y tostada, es decir, la malta se tamiza para limpiar el grano de las raicillas producidas durante el proceso de la germinación y, finalmente, se realiza una molienda fina de la misma a partir de la cual se obtendrá el mosto.

## II.2.2.2. OBTENCIÓN DEL MOSTO

### - Procedimiento

1. Disponer de 62 gr aproximados de malta fina y añadir 200 ml de agua destilada previamente calentada a 45°C.
2. Mantener en un baño a 45°C con agitación (100rpm), durante 30 min.
3. Subir gradualmente la temperatura (1°C/min) hasta alcanzar 70°C.
4. Añadir 100 ml de agua destilada calentada a 70°C.
5. Dejar macerándose en agitación a 70°C, durante una hora.
6. Enfriar a temperatura ambiente durante 10-15 min y filtrar.

## II.2.2.3. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD

### II.2.2.3.1. Humedad

Antes que termine el proceso de la maceración se toma una muestra de 5 gr de malta para determinar la humedad de la misma.

1. Poner los 5 gr de malta en una placa metálica e introducir en el horno a 105-107°C. Mantener durante 3h.
2. Dejar enfriar.

$$H = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \cdot 100$$

### II.2.2.3.2. Proteína total

El contenido en proteína total se determina a partir de 1,5 gr de malta de fina molturación, antes de macerarse.

1. Tomar 1,5 gr de harina de malta y añadir 10 gr de catalizador<sup>#</sup> + 20 ml de ácido sulfúrico.
2. Calentar hasta 450°C durante 30 min.
3. Dejar enfriar y diluir con 150 ml de agua.
4. Transferir el líquido cuantitativamente al destilador.
5. Añadir al mismo destilador 70 ml de solución de hidróxido sódico al 40% (p/v) y después una mezcla de unos 25 ml de solución de ácido bórico al 2% p/v y 0,5 ml de indicador mixto (pH 4,4 - 5,8).
6. Se destilan unos 180 ml y se valora el destilado con ácido sulfúrico 0,1 N.

$$Pt = \frac{T \times F}{g \text{ malta} - (100 - H)}$$

$$T = (V_o - V')$$

$V_o$  = Volumen gastado de ácido sulfúrico 0,1N para el problema.

$V'$  = idem para el blanco.

F = factor de corrección = 87,5

H = Humedad (ver apartado II.2.2.3.1.)

- Disoluciones

#Catalizador	
SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O	30g
TiO <sub>2</sub>	30g
SO <sub>4</sub> K	1kg



### II.2.2.3.3. Proteína soluble

La determinación de la proteína soluble se realiza a partir del mosto.

1. Tomar 20 ml de mosto y añadir 3 ml de ácido sulfúrico concentrado junto con 2 o 3 gotas de antiespumante.
2. Añadir 10 gr de catalizador<sup>#</sup> y 17 ml de ácido sulfúrico concentrado.
3. Calentar a 450°C durante 30 min y dejar enfriar.

A partir de aquí, el proceso es el mismo que el de la proteína total.

$$P_s = \frac{P_v \times E'}{1000 \times E_w}$$

Ps = Proteína soluble expresada como mg/100ml de mosto

Pv = T x 43,75

E' = Extracto en porcentaje sobre materia seca.

Ew = Gramos de extracto en 100 ml de mosto

### II.2.2.3.4. Índice Kolbach

El índice Kolbach se obtiene por el valor del cociente entre proteína soluble y proteína total.

### II.2.2.3.5. Rendimiento del Extracto

El contenido del extracto de malta se determina después de macerar y filtrar y equivale al máximo volumen de mosto obtenido por kilo de malta. Desde un punto de vista económico una malta será tanto mejor cuanto más elevado sea el rendimiento del extracto.

$$E = \frac{P ( H + 800 )}{100 - P}$$

H = Humedad

P = Contenido de extracto de mosto en gr por 100 gr de mosto; esta medida se realiza con un sacarímetro o picnómetro directamente sobre 100 ml de mosto.

### II.2.2.3.6. Atenuación límite

La atenuación límite expresa la fermentabilidad potencial de un mosto. Un mosto será de mejor calidad cuanto mayor sea su fermentabilidad y presente la cantidad suficiente de aminoácidos en solución para que el desarrollo de las levaduras sea óptimo.

1. Tomar 300-500 ml de mosto y llevar a ebullición para inhibir las enzimas amilolíticas.
2. Enfriar y añadir agua destilada hasta alcanzar el peso inicial.
3. Filtrar.
4. Determinar el contenido en azúcares mediante el uso del sacarímetro.
3. Tomar unos 200 ml de mosto hervido y añadir 10 gr de levadura.
4. Mantener a temperatura constante entre 20-25°C y dejar actuar durante 18 h.
5. Volver a medir el contenido de azúcar del mosto con el sacarímetro.

$$\text{Atenuación aparente (\%)} = \frac{(E_1 - E_2) \cdot 100}{E_1}$$

E1 = medida inicial del extracto

E2 = medida después de actuar la levadura

Atenuación límite = Atenuación aparente x 0,81

### II.2.2.3.7. Viscosidad

La viscosidad del mosto se determina a 20°C utilizando un viscosímetro calibrado.

### II.2.2.3.8. Índice Q de calidad cervecera

La evaluación de la calidad cervecera, como hemos visto, se realiza a través de una serie de parámetros analíticos que se determinan en la cebada, la malta y el mosto. Esta evaluación produce tablas de datos bastante complejas, cuya interpretación global es difícil. Para obviar esta dificultad, el Comité de Cebada y Malta de la EBC ha desarrollado un índice de calidad denominado Q, capaz de medir, con una sola cifra entera del 1 al 9, la calidad global de una variedad (Molina-Cano, et al., 1986; Molina-Cano, 1987). El índice se determina a partir de los valores siguientes:

- Rendimiento del extracto
- Índice de Kolbach
- Atenuación límite
- Viscosidad
- Poder diastático (actividad amilolítica). La contribución máxima de este parámetro al índice Q, tan sólo supone un 5% por lo que suele prescindirse su determinación).

$$Q = \sum_j w_j \cdot Q_{ijk} ;$$

i = variedad  
j = parámetro de calidad  
k = año

$w_j$  = coeficientes de ponderación para cada parámetro:

- Rendimiento del extracto: 0,45
- Índice Kolbach: 0,10
- Atenuación límite: 0,15
- Viscosidad: 0,25

$Q_{ijk} = 9 \cdot \Phi(z_{ijk})$ , donde  $\Phi$  representa el valor normalizado para cada variable y entrada en el análisis ( $z_{ijk}$ ).

$$0 \leq Q_{ijkl} \leq 9$$

$$z_{ijk} = \frac{x_{ijk} - x_{cj}}{\frac{s_j}{\sqrt{n_{ijk}}}}$$

$c$  = valor de referencia (patrón)

$x_{ijk}$  = valor del parámetro  $j$ , para la variedad  $i$ , el año  $k$

$x_{cj}$  = valor de referencia para el parámetro  $j$

$s_j$  = desviación típica europea (Molina-Cano et al., 1987)

Los valores de referencia de cada uno de los parámetros de calidad y sus desviaciones estándar, se representan en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Valores de referencia y desviación estándar para los parámetros de calidad maltero-cervecera

Parámetro	$x_{cj}$	$s_j$
Rendimiento del extracto	79,87	1,70
Indice Kolbach	39,58	4,48
Atenuación límite	79,80	2,96
Viscosidad	1,60	0,134

Este índice, cuya validez estadística está demostrada (Molina-Cano et al., 1986), permite clasificar las variedades de la siguiente forma:

Valor de Q	Observaciones
$1 < Q < 5$	Cebada pienso
$5 < Q < 7$	Cebadas cerveceras de calidad moderada
$7 < Q < 9$	Cebadas cerveceras de alta calidad

## **II.2.3 MÉTODOS BIOQUÍMICOS**

### **II.2.3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

#### **II.2.3.1.1. Extracción de proteínas a escala preparativa**

Se siguió esencialmente el método de Sánchez-Monge et al. (1986).

##### **- Procedimiento**

1. Extraer la harina con NaCl 0,15 M en una relación 1:3 (p/v) durante 2 h a 4°C.
2. Centrifugar a 10000 rpm durante 20 min a 4°C.
3. Precipitar el sobrenadante con sulfato amónico (100%) hasta un 50% de saturación. Mantener 3h a 4°C.
4. Centrifugar a 10000 rpm durante 20 min a 4°C.
6. Resuspender el precipitado en acetato amónico 0,1M.
7. Dializar frente a agua destilada durante 24 h a 4°C y liofilizar.
8. Conservar liofilizado a -20°C.

El extracto crudo obtenido, enriquecido en la familia de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas/tripsina se denomina Extracto Bruto de Inhibidores (EBI)

#### **II.2.3.1.2. Extracción de proteínas a escala analítica.**

Este método se realizó de forma rutinaria en el laboratorio para la obtención de mapas bidimensionales de las diferentes variedades estudiadas en el presente trabajo. A partir de granos individuales se obtuvieron extractos de proteínas en tubos "eppendorf", siguiendo el método de Salcedo et al. (1984).

**- Procedimiento**

1. Deslipidar la harina con éter de petróleo (p.e. 40-60°C) en una relación 1:10 (p/v), durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente.
2. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min, y eliminar el sobrenadante. Dejar secar la harina.
3. Extraer dos veces con 500  $\mu$ l de Etanol 70% o con una mezcla Cloroformo-Metanol 2:1 (v/v), en una relación de disolvente 1:6 (p/v), durante 1h.
4. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min.
5. Evaporar el disolvente al vacío.

## **II.2.3.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

### **II.2.3.2.1. Cromatografía de filtración molecular**

La cromatografía de filtración molecular, se realizó con el fin de fraccionar el Extracto Bruto de Inhibidores. La cromatografía se realizó utilizando como soporte Sephadex G-100 (Pharmacia) en columnas de 2,5 x 90 cm y como tampón de elución, acetato amónico 0.1 M, a un flujo de 25 ml/h . Las muestras (200 mg de proteína) se aplicaron disueltas en el mismo tampón y la lectura de la absorbancia se realizó a 280 nm. Las fracciones obtenidas se liofilizaron directamente.

### **II.2.3.2.2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).**

Se utilizaron los siguientes soportes:

- Columna Ultrapore 300-5 C3 de 250 mm X 10 mm.
- Columna Vydac C4 (Knauer) de 250 x 25 mm y un tamaño medio de partícula de 5  $\mu$ m.

La separación tuvo lugar a temperatura ambiente y flujos de 0,5-1 ml/min, utilizando distintos gradientes lineales :

25-40 % de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético durante 150 ó 225 min según la variante protéica a purificar, en las fracciones de 12,5 kDa con actividad anti-tripsina.

28-40 % de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético durante 180 min, para las fracciones correspondientes a los inhibidores tetraméricos.

La lectura de la absorbancia se realizó a 214 nm y las fracciones eluídas, se liofilizaron directamente.

### **II.2.3.3. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS**

**II.2.3.3.1. Electroforesis unidimensional: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfáto sódico (SDS-PAGE).**

#### **- Procedimiento**

Con el fin de conseguir una mejor resolución, se utilizaron electroforesis discontinuas siguiendo básicamente el método de Laemmli (1970). Este sistema consta de un gel separado en dos partes: Un gel superior, preparado a baja concentración de acrilamida, y otro gel separador en la parte inferior, mucho más largo y a una concentración de acrilamida superior.

1. Preparar la mezcla de polimerización del gel separador (inferior), que variará según el porcentaje de acrilamida que deseemos. Para el presente trabajo se utilizaron concentraciones del 10% :

acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8% (p/v)	12,3 ml
tampón tris 1.5 M pH 8,8	9,37 ml
H <sub>2</sub> O	15,25 ml
SDS 10 %	375 μl

2. Añadir TEMED (60 μl), y persulfato amónico al 10 % (375 μl).
3. Dejar polimerizar a T<sup>a</sup> ambiente de 15 a 30 min.
4. Preparar la mezcla de polimerización del gel de apilamiento (superior), que siempre es en la misma relación:

acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8%	1,7 ml
tampón tris 1 M pH 6,8	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	6,8 ml
SDS 10%	100μl

5. Añadir TEMED (20 μl) y persulfato amónico al 10% (200μl).
6. Dejar polimerizar a T<sup>a</sup> ambiente de 15 a 30 min.
7. Preparar las muestras añadiendo un volumen de tampón de muestra (x2) con 10% (v/v) de β-mercaptoetanol. Calentar durante 10 min en un baño a 100°C.

Para la determinación de pesos moleculares mediante este sistema, se utilizaron como marcadores las siguientes proteínas:

Proteína	P. M. (kDa)
Fosforilasa B	92,5
Albúmina de suero bovino	67
Ovoalbúmina	45
Anhidrasa carbónica	29
Inhibidor de tripsina de soja	21
Citocromo C	12,5

8. La electroforesis se realiza normalmente a 20 mA, durante 10-15 horas. Los geles utilizados fueron de 16 x 18 cm.

**- Disoluciones**

Tampón de cubeta (x10)	Tampón de muestras (x2)
Tris HCl (pH 8,3) 0,2 M	Tris HCl pH 6,8 125 mM
Glicina 1,92 M	Glicerol 10%
SDS 1%	SDS 4%
H <sub>2</sub> O hasta 1 l	β-mercaptoetanol 10% (v/v)
	Azul de bromofenol 0,08 %

## **- Tinción de Geles**

Durante la realización de este trabajo, se utilizaron dos tipos básicos de tinción: con Azul de Coomassie y con plata. El método escogido dependió básicamente de la cantidad de proteína a detectar. Mientras que con Azul de Coomassie se detecta 1  $\mu\text{g}$  de proteína por banda, la tinción con plata detecta 50 ng, aunque los márgenes de detección varían de una proteína a otra. En ambos casos, las proteínas se encuentran fijadas a la matriz de poliacrilamida.

### **.Tinción con Azul de Coomassie**

1. Sumergir el gel durante media hora en la disolución de tinción, que a la vez fijará las proteínas (50% TCA y 0,2% Azul de Coomassie R).
2. Para desteñir el gel deben realizarse varios lavados con la disolución desteñidora (30% metanol, 10% ácido acético), hasta que alcance el contraste deseado.

### **.Tinción con plata (Wray et al., 1981)**

1. Fijar el gel en metanol 50% durante más de una hora con agitación. Es preferible dejar el gel el mayor tiempo posible para eliminar el SDS.
2. Lavar abundantemente con agua Milli Q.
3. Preparar una disolución con 0,8 g de nitrato de plata en 4 ml de agua. Añadir 21 ml de NaOH al 0,36% (la plata precipita). Añadir lentamente 1,4 ml de hidróxido amónico concentrado hasta que el precipitado se redisuelva. Añadir agua hasta 100 ml. No usar después de transcurridos 20 min.
4. Retirar el agua del gel y verter los 100 ml de la disolución de plata.
5. Agitar durante 15 min. Decantar.
6. Lavar con agua durante 5 min. Decantar.

7. Revelar el gel con 500 ml de agua a los que se le han añadido 2,5 ml de ácido cítrico al 1% y 250  $\mu$ l de formol. Agitar hasta que se haya alcanzado un suficiente revelado.

8. Decantar. Parar la reacción con metanol 50%.

### **II.2.3.3.2. Electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque (IEF) x electroforesis en geles de almidón (SGE) a pH 3,2**

#### **Primera dimensión**

La primera dimensión o electroenfoque se realizó según el método de Wrigley (1970) con las modificaciones descritas por Fra-Mon et al. (1984).

#### **- Procedimiento**

1. Mezclar 500  $\mu$ l de disolución A con 120  $\mu$ l de disolución B y 40  $\mu$ l de anfollinas (40% p/v) del intervalo de pH 4-9 ó 5-8, por cada tubo que se desee preparar. En el caso de que el electroenfoque se realice en condiciones no disociantes, se sustituirá la disolución A, por agua.
2. Añadir 30  $\mu$ l de disolución de persulfato amónico al 1% y 30  $\mu$ l de disolución C.
3. Llenar el interior de los tubos de vidrio cilíndricos, con dimensiones 160 mm x 2 mm (diámetro interno), hasta una altura de 140 mm.
4. Fotopolimerizar durante 30 min con la ayuda de luz fluorescente.
5. Insertar los tubos en la cubeta de electroforesis correspondiente. Añadir en la cubeta superior (ánodo), ácido sulfúrico al 0,2 % y en la inferior (cátodo), etanolamina al 0,4%.
6. Realizar un pre-enfoque aplicando una corriente continua de 0,5 mA/tubo, intensidad que se mantiene hasta alcanzar un voltaje de 470 V.

7. Redissolver la muestra a insertar en 25  $\mu$ l de disolución A. En el caso de geles no disociantes, las muestras se incluyen en la mezcla de polimerización.
8. Insertar la muestra en el extremo ácido del tubo, y realizar la electroforesis durante 6 h a 470 V.
9. Sacar los geles del interior de los tubos, inyectando agua a presión. Procesarlos para la segunda dimensión o guardarlos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**- Disoluciones**

<b>Disolución A</b>	urea 9M	
<b>Disolución B</b>	acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8%	
<b>Disolución C</b>	Riboflavina	3,2 mg
	TEMED	1200 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	20 ml

**Segunda dimensión: Electroforesis en geles de almidón (SGE) pH 3,2.**

Se siguió básicamente el método de Woychick et al.(1961), efectuando la electroforesis sobre geles de almidón en tampón láctico-lactato de aluminio, urea 3 M, con la modificación en el espesor del gel, que se reduce a 1 mm.

**- Procedimiento**

1. Diluir 38 g de almidón hidrolizado en 380 ml de tampón de electroforesis láctico-lactato. La mezcla se agita constante y enérgicamente, en un baño maría a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 3 min.
2. Moldear la masa obtenida entre dos placas de vidrio separadas por un marco de metacrilato de dimensiones internas 180 x 280 x 1 mm, y dejar enfriar a temperatura

ambiente durante un mínimo de tres horas. Eliminar las posibles burbujas con la ayuda de una jeringa hipodérmica.

3. Efectuar en el gel una ranura con bisturí, de 140 mm x 2 mm, donde se inserta el gel de primera dimensión.
4. Colocar el gel entre dos cubetas de plástico con tampón láctico-lactato y establecer un contacto por medio de esponjas empapadas en tampón.
5. Aplicar un voltaje de 20 V/cm durante 4h a 4°C.

#### - Tinción del Gel

Es la más favorable para estas proteínas según el estudio realizado por Aragoncillo et al. (1975).

1. Disolver 0,5 g de Nigrosina en 454,5 ml de agua destilada, 454,5 ml de metanol y 91 ml de ácido acético. Agitar la mezcla durante 6 h y filtrar.
2. Sumergir el gel en la solución de nigrosina 0,05% y mantener durante 16 h.
3. Lavar el gel con agua y desteñir el fondo del gel con etanol al 70%.

#### - Disoluciones

<b>Tampón de electroforesis*</b>	
Urea	750 g
Lactato de aluminio	19,62 g
H <sub>2</sub> O	4 l

\*Ajustar el pH a 3,2 con ácido láctico.

#### **II.2.3.4. DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS**

Se realizó según el método de Gershoni et al.(1985). Las proteínas purificadas (2-5 $\mu$ g) se sometieron a SDS-PAGE, junto con un control positivo (transferrina) y otro negativo (quimotripsinógeno). Después de la electroforesis, las muestras se electrotransferieron a membranas de PVDF (Inmobilon, Millipore), en las condiciones que se indican.

1. Sumergir el gel en tampón de transferencia (Tris 50 mM, ácido bórico 50 mM, pH8,3), durante 15 min.
2. Sumergir la membrana en metanol absoluto y después, introducir en tampón de transferencia, durante 15 min.
3. Montar la cubeta de transferencia donde se sitúan por orden, dos filtros Whatman n° 1 del mismo tamaño de las membranas, el gel, la membrana y otros dos filtros. Vigilar que no queden burbujas entre los diferentes componentes.
4. Realizar la transferencia a 100 V durante 1 h.

Posteriormente la membrana se procesa para la tinción de glicoproteínas.

#### **- Procedimiento**

1. Lavar la membrana varias veces con agua.
2. Mantener 30 min en oscuridad y agitación suave en 10 mM ácido peryódico.
3. Lavar varias veces con agua hasta la neutralidad.
4. Sumergir la membrana en 50 ml de disolución B + 10 ml de solución A. Mantener en agitación suave y oscuridad durante 45 min.
5. Lavar varias veces con agua (3 veces).
6. Lavar varias veces con solución B (3 veces).
7. Lavar con metanol 50%.
6. Secar la membrana y mirar con luz ultravioleta.

**- Disoluciones**

**.Disolución A** : 10 mg dansilhidrazina en 10 ml etanol absoluto

**.Disolución B** : 0,2 M acetato sódico. Ajustar a pH 5,4 con ácido acético

**II.2.3.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: Método del ácido bicinonínico (BCA).**

Se siguió fundamentalmente el método de Smith et al. (1985) para soluciones diluidas, hasta 0,05 mg/ml. Este método está basado en la formación de un complejo coloreado entre el BCA y los iones  $\text{Cu}^+$  producidos por el efecto reductor de cisteína, cistina, triptófano y el enlace peptídico.

**- Procedimiento**

1. Preparar patrones de proteínas estándar (albúmina de suero bovino), a distintas concentraciones, desde 0,025 a 0,25 mg/ml.
2. Disponer tubos con 100  $\mu\text{l}$  de cada una de las disoluciones patrón, así como un tubo blanco con 100  $\mu\text{l}$  de agua y los tubos con las disoluciones a cuantificar en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ .
3. Añadir a cada tubo 2,5 ml de una solución 50:1 de los reactivos A y B comercializados por Pierce (Protein Assay Kit).
4. Incubar a 60°C durante 30 min.
5. Medir la absorbancia a 562 nm.
6. Representar una recta patrón y determinar en base a ella, la concentración de proteína problema.

## II.2.3.6. ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.

### II.2.3.6.1. Inhibición de $\alpha$ -amilasas

Los ensayos de inhibición de  $\alpha$ -amilasas se realizaron mediante una modificación del método de Bernfeld (1955).

#### - Procedimiento

El extracto con actividad  $\alpha$ -amilasa de *Tenebrio molitor* se preparó de la siguiente manera:

1. Macerar las larvas en tampón acetato sódico pH 5,4 durante 10 min a 4°C.
2. Centrifugar a 12000 rpm durante 20 min a 4 °C.
3. Dializar frente al mismo tampón y diluir hasta alcanzar la actividad específica deseada, conservándose a -20 °C.

Los ensayos se realizan con aproximadamente una unidad de actividad enzimática (1 U.A.), definida como la cantidad de enzima necesaria para producir los equivalentes reductores de 1  $\mu$ mol de maltosa en las condiciones del ensayo. Los valores de inhibición se determinan en al menos dos pruebas independientes, como se indica a continuación:

1. Preparar cuatro tubos control que contendrán respectivamente, 1 U.A., 1  $\mu$ mol de maltosa, 1 U.A. + 10  $\mu$ g de BSA (como control negativo), y un blanco. A su vez preparar los tubos con la muestra problema liofilizada.
2. Añadir a cada tubo 230  $\mu$ l de tampón (con 1 U.A. en las muestras de inhibidores).
3. Preincubar durante 30 min a 25 °C.
4. Añadir 230  $\mu$ l de almidón soluble al 1% (p/v) en tampón.
5. Incubar durante 30 min a 25 °C.

6. Añadir 460  $\mu$ l de ácido 2- hidroxí-3,5-dinitrobenzoico al 1% (p/v) en NaOH 0,4 N, 30% tartrato sódico-potásico (p/v).
7. Incubar 5 min en agua hirviendo.
8. Introducir los tubos en hielo para detener la reacción y diluir con 2 ml de agua destilada.
9. Medir la absorbancia a 540 nm.

**- Disoluciones**

**.Reactivo dinitrosalicílico:**

1. Disolver 10 g de 3,5-dinitrosalicílico en 200 ml de NaOH 2N.
2. Disolver 200 g de tartrato sódico-potásico en 500 ml de agua.
3. Calentar cada una de las soluciones con calor, hasta ebullición y mezclar.

<b>Tampón acetato sódico pH 5,4.</b>	
Disolución A <sup>a</sup>	17,6 ml
Disolución B <sup>b</sup>	82,4 ml
NaCl	5,58 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	14,7 mg
H <sub>2</sub> O	1 l

<sup>a</sup>.Disolución A: 288,75  $\mu$ l de ácido acético en 25 ml de agua.

<sup>b</sup>.Disolución B: 2,23 g de acetato sódico anhidro en 100 ml de agua.

### II.2.3.6.2. Inhibición de tripsina

Para el ensayo de inhibición de tripsina se siguió el procedimiento de Boisen y Djurtoft (1981), basado en el método de Erlanger et al. (1961).

#### - Procedimiento

1. Preparar los tubos con las muestras problema liofilizadas. Así mismo preparar un control positivo con un inhibidor de tripsina de soja comercial (Serva), un blanco y otro tubo con el enzima solo.
2. Añadir a los tubos 150  $\mu$ l de disolución de tripsina (equivalentes a 0,13 unidades del enzima).
3. Añadir 2 ml de solución substrato.
4. Incubar la mezcla 45 min a 37 °C.
5. Detener la reacción añadiendo 1 ml de ácido acético al 20% (v/v).
6. Medir la absorbancia a 410 nm.

#### - Disoluciones

**.Disolución de tripsina:** 150  $\mu$ g/ml de tripsina en HCl 1 mM

Disolución Sustrato			
Disolución 1-BAPA		Disolución Tris-CaCl <sub>2</sub>	
*1-BAPA	21,8 mg	Tris-HCl pH 8,2	0.05 M
		CaCl <sub>2</sub>	0,02 M

\*Disolver en 1 ml de Dimetilsulfóxido

Mezclar 1 ml de disolución 1-BAPA con 99 ml de Disolución Tris-CaCl<sub>2</sub> precalentada a 37°C.

### **II.2.3.7. SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS.**

La secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de los inhibidores de tripsina CMe-2.1., CMe-2.2, CMe-2.3, CMe-3.1, CMe-3.2, así como la de las subunidades de inhibidores tetraméricos de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas CMb-2 y CMb-2\*, fueron obtenidas por el Dr. C. López-Otín (Dpto. de Biología Funcional. Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo). Para ello se utilizó un secuenciador de fase gaseosa Applied Biosystems 470 A y los PTH-aminoácidos generados en cada ciclo se analizaron mediante RP-HPLC.

### **III. RESULTADOS**

### **III.1. EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS**

#### **III.1.1. DESARROLLO FENOLÓGICO DE LOS GENOTIPOS**

Uno de los factores principales que determinan el rendimiento en la cebada es el ajuste fenológico de la misma a las condiciones de cultivo. Este ajuste es función del número de hojas en el tallo principal, filo o plastocrono (determinantes de fecha de antesis) así como de la maduración. En el presente apartado se pretende evaluar el grado de variabilidad existente entre los genotipos españoles, para cada uno de los factores mencionados.

El seguimiento del desarrollo fenológico de los genotipos, se realizó durante el año 1991-92 en la localidad de Bell.Lloc (comarca del Pla d'Urgel, Lleida) siguiendo la escala de Zadoks-Chang (1974).

Para el estudio del filocrono del conjunto de accesiones de cebadas españolas, se contaron periódicamente el número de hojas en el tallo principal, según la notación de Haun (1973). Estos datos se ajustaron mediante regresión lineal con los grados días acumulados en cada toma de datos. Los coeficientes determinados fueron altos, en todos los casos superiores al 95%.

La pendiente de estas regresiones lineales, es la tasa de aparición foliar (hojas/grados-día) y su inversa es el filocrono (número de grados día necesarios para la aparición de una hoja en el tallo principal).

El análisis de la varianza del n° de hojas del tallo principal de la planta y del filocrono del conjunto de genotipos se representa en la Tabla III.1

En la Figura III.1 se representa la distribución de la fecha de antesis (A) de los genotipos autóctonos estudiados y la distribución de las medias del n° de hojas en el tallo principal (B) y el filocrono (C), con respecto a los testigos Plaisant y Zaida.

Tabla III.1. Cuadrados medios y su significación para el nº de hojas y filocrono en 50 genotipos autóctonos.

Fte. variación	GL	Nº hojas	Filocrono
Genotipo	49	8,67 *	465,99 **
error	183		

\* :  $0,05 < p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01$

### III.1.2. RENDIMIENTO

Paralelamente al estudio del desarrollo fenológico de los genotipos autóctonos de cebada, se desarrollaron ensayos de rendimiento, en tres localidades diferentes, dos en la provincia de Lleida, Bell.Lloc (comarca del Pla d'Urgel) y Gimennells (comarca del Segrià), y un tercero en Zamadueñas en la provincia de Valladolid. Debido a las limitaciones de semilla y superficie disponible, el diseño del experimento fue bloques al azar con sólo dos repeticiones y se incluyeron como testigos los genotipos comerciales Alexis, Cameo, Kym y Zaida. El análisis de la varianza para el rendimiento, se representa en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Análisis de la varianza para el rendimiento (t/ha) de 50 genotipos autóctonos, en las localidades de Gimennells, Bell.Lloc y Zamadueñas.

Fuente de variación	GL	CM	F
Localidad	2	22,76	195,9 **
Localidad (Bloque)	3	0,22	1,9 ns
Genotipo	49	0,42	3,6 **
Localidad x Genotipo	98	0,21	1,8 **
Error	147	0,12	

ns:  $p > 0,05$  ; \* :  $0,05 > p > 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,01$

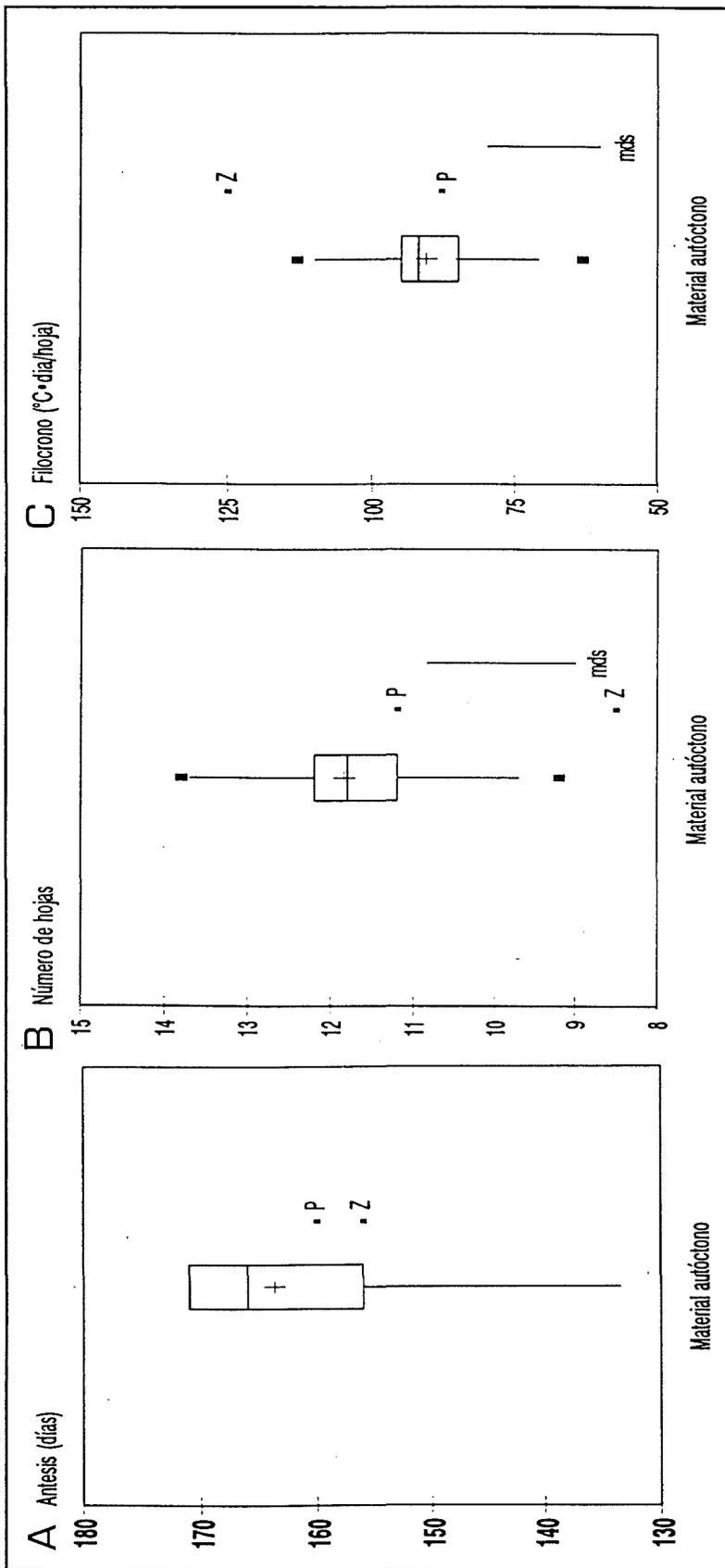


Figura III.1. Distribución de las variables Fecha de antesis (A), N° de hojas (B) y Filocrono (C) del material autóctono, con respecto a los testigos Plaisant (P) y Zaida (Z).