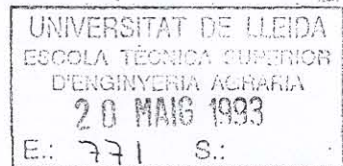


(043) "1993" Mor



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

III.3.4. ÍNDICE KOLBACH

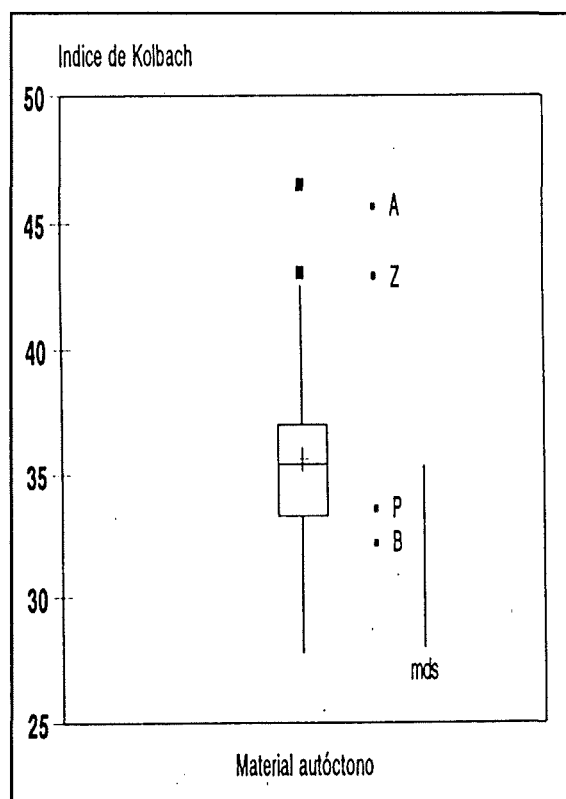
Tabla III.12. Análisis de la varianza para el Índice de Kolbach del conjunto de accesiones

Fuente de variación	GL	CM	F
Año	1	1014,41	2834,8 **
Repetición (año)	2	0,07	0,2ns
Genotipo	49	62,75	2,5**
Año x Genotipo	45	25,21	70,4**
Error	96	0,35	
Total	193		

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

Existen diferencias significativas entre años y entre genotipos. No existen diferencias entre repeticiones y hay interacción año x genotipo. La distribución de las medias del Índice Kolbach de los genotipos analizados, se representa en la Figura III.12. El valor de referencia para el Índice Kolbach es 39,58 ($\sigma=4.48$, Tabla II.2). Entre el material autóctono, destacan los genotipos AD-122, AD-21 y LCC-63 con Índices de Kolbach 40,6, 40,1, y 39,6 respectivamente.

Figura III.12. Distribución del Índice Kolbach que determina la relación entre proteína total y proteína soluble de los diferentes genotipos autóctonos, con respecto a los testigos Alexis (A), Beka, (B),Plaisant (P) y Zaida (Z).



III.3.5. ATENUACIÓN LÍMITE

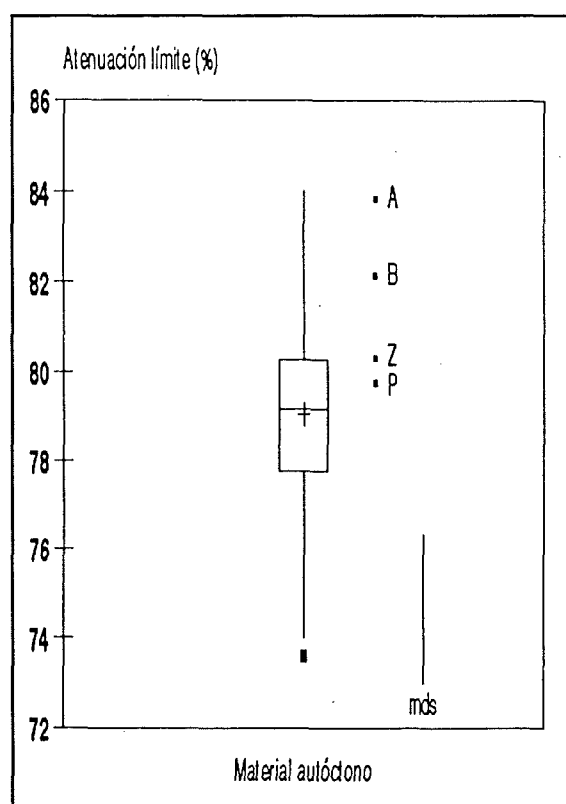
Tabla III.13. Análisis de la varianza de la atenuación límite del conjunto de accesiones.

Fuente de variación	GL	CM	F
Año	1	179,89	882,0 **
Repetición (año)	2	0,58	2,9 ns
Genotipo	49	11,89	2,3 **
Año x Genotipo	45	5,19	25,5 **
Error	96	0,20	
Total	193		

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

Existen diferencias significativas entre años y entre genotipos. No existen diferencias entre repeticiones y hay interacción año x genotipo. En la Figura III.13 se representa la distribución de las medias de la atenuación límite del conjunto de genotipos analizados. El valor de referencia para la atenuación límite es 79.80 ($\sigma=2.96$, Molina-Cano, 1986). Los valores más elevados correspondieron a los testigos Alexis y Beka. Entre el material autóctono cabe destacar al genotipo AD-122 con un valor del 81,5%, superior incluso a los testigos Zaida y Plaisant.

Figura III.13. Distribución de la atenuación límite de los diferentes genotipos autóctonos estudiados, con respecto a los testigos Alexis (A), Beka, (B), Plaisant (P) y Zaida (Z).



III.3.6. VISCOSIDAD

Tabla III.14. Análisis de la varianza de la viscosidad del conjunto de accesiones

Fuente de variación	GL	CM	F
Año	1	5,21	1567,4 **
Repetición (año)	2	0,00	1,6 ns
Genotipo	49	0,07	
Año x Genotipo	45	0,05	1,5 ns
Error	96	0,00	
Total	193		145,2 **

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

Existen diferencias significativas entre años e interacción año x genotipo. No existen diferencias entre las repeticiones realizadas cada año ni entre los genotipos. La viscosidad del mosto es un parámetro relacionado con el contenido de β -glucanos del grano, así como con la degradación del almidón. Una degradación incompleta del almidón implica la presencia en el mosto de dextrinas, azúcares insolubles que contribuyen a la viscosidad del mosto. A su vez un elevado contenido protéico dificulta el acceso de los enzimas hidrolíticos a los gránulos de almidón por lo que el contenido en proteína total del grano está relacionado con la viscosidad del mosto.

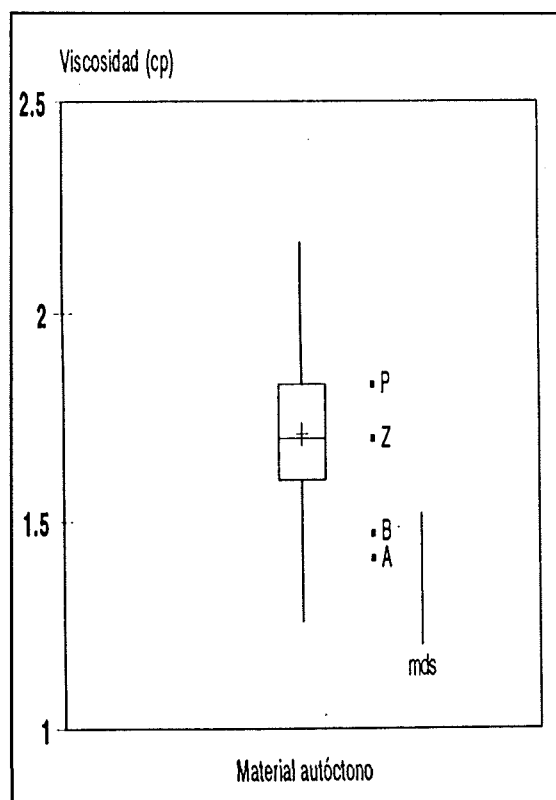


Figura III.14. Distribución de la viscosidad del material autóctono con respecto a los testigos Alexis (A), Beka, (B), Plaisant (P) y Zaida (Z).

La distribución de las medias de la viscosidad obtenidas durante los dos años estudiados se representa en la Figura III.14. El valor de referencia para la viscosidad es 1,601 ($\sigma = 0,134$; Tabla II.2). La viscosidad media para los dos años fue de 1,71.

III.3.7. INDICE DE CALIDAD Q

Tabla III.15. Análisis de la varianza para el índice de calidad Q del conjunto de accesiones

Fuente de variación	GL	CM	F
Año	1	194,17	7925,5 **
Repetición (año)	2	0,02	0,9 ns
Genotipo	49	3,68	2,7 **
Año x Genotipo	45	1,34	54,7 **
Error	96	0,02	
Total	193		

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

Valores de Q comprendidos entre 7 y 9 se consideran de alta calidad maltera. En este caso solamente la variedad Alexis queda comprendida entre estos márgenes, pero hay que señalar que esta variedad no se ensayó en el año 1991, caracterizado por el elevado contenido protéico de los genotipos. Entre el material autóctono destaca el genotipo AD-122 (Fig. III.15) con un valor de Q extremo y superior al de los testigos Beka y Plaisant de conocida calidad cervecera.

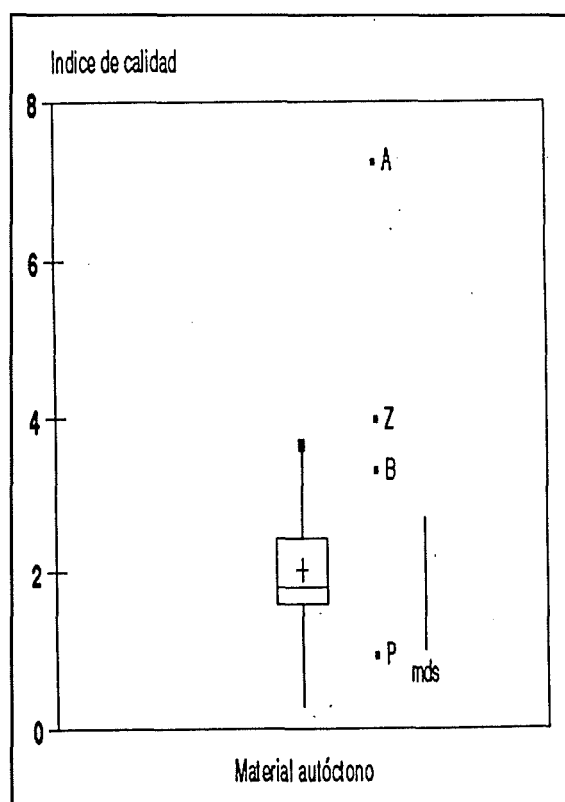


Figura III.15. Distribución del Índice de calidad Q del material autóctono con respecto a los testigos Alexis (A), Beka, (B), Plaisant (P) y Zaida (Z).

III. 3.8. β -GLUCANOS

En el año 1992, además de los parámetros de calidad maltera anteriormente analizados, se estudió el contenido de β -glucanos de las accesiones de cebada de origen español y los testigos Alexis, Beka, Cameo y Zaida. Los resultados del análisis de la varianza entre genotipos con dos repeticiones cada uno, dieron diferencias significativas entre las mismas ($F=69,88$ **). La distribución de las medias obtenidas para las cebadas españolas y los testigos aparece en la Figura III.16, donde se observa un amplia variabilidad para este carácter.

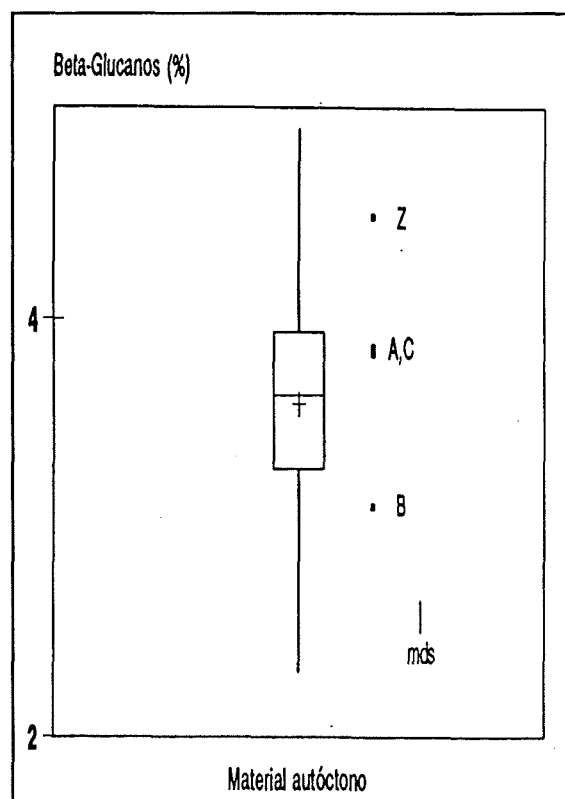


Figura III.16. Distribución del contenido en β -glucanos del material autóctono con respecto a los testigos Alexis (A), Beka, (B), Plaisant (P) y Zaida (Z).

III. 3.9. HEREDABILIDAD DE LOS CARACTERES DE CALIDAD MALTERA

Para analizar la variación fenotípica de los parámetros de calidad maltera, atribuibles a una varianza genética, se estudió la heredabilidad de los mismos. Los resultados (Tabla III.16) son en general más bajos que los citados en la literatura (Molina-Cano, 1987).

Tabla III.16. Valores de heredabilidad de proteína total (PRT), proteína soluble (PRS), extracto (EXT), Índice Kolbach (KOL), atenuación límite (ATE), viscosidad (VIS) e Índice de calidad (Q).

Fte. variación	PRT	PRS	EXT	KOL	ATE	VIS	Q
h^2	0.093	0.215	0.608	0.477	0.354	0.115	0.282
error	0.019	0.045	0.128	0.10	0.075	0.024	0.056

III.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS: HORDEÍNAS B, C Y D

La electroforesis (SDS-PAGE) para la separación de proteínas de endospermo de cebada extraídas con mezclas alcohol/agua, da como resultado la aparición de unos patrones compuestos por múltiples polipéptidos distribuidos en el gel con masas moleculares que oscilan entre 29 kDa y 97 kDa (Figura III.17). Debido al método simplificado de extracción de hordeínas, en el gel se aprecian muchas más bandas que las descritas habitualmente como tales. Con el fin de llegar a distinguir aquellas bandas que realmente fueran hordeínas, se realizaron una serie de extracciones específicas para estas bandas (etanol 70%) y se compararon con los geles obtenidos de extracciones menos selectivas.

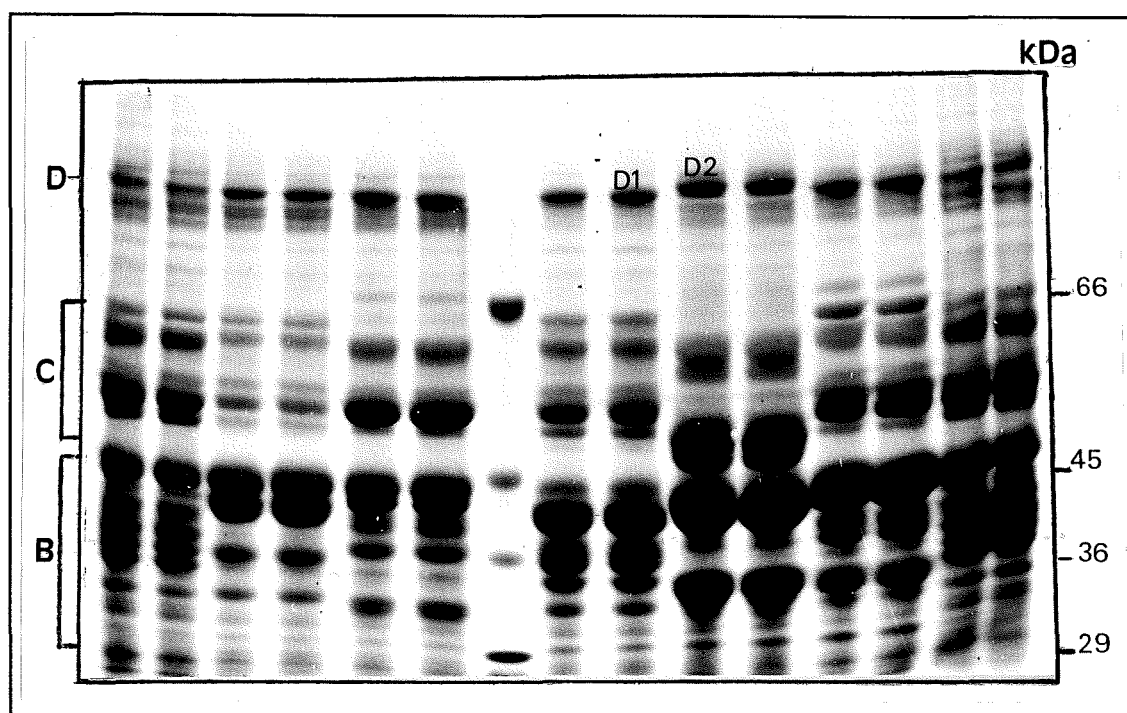


Figura III.17. SDS-PAGE de Hordeínas B, C y D de endospermo de cebada.

No todas las bandas que se aprecian tienen el mismo poder discriminatorio de genotipos, por lo que únicamente se han considerado en este trabajo aquellas bandas que, tratándose de hordeínas, fueran fácilmente discernibles del resto. De este modo el número

de bandas a tener en cuenta se redujo de forma considerable, facilitando la interpretación de los patrones electroforéticos.

La composición de los grupos de hordeínas depende, en general, del protocolo electroforético empleado, por lo que siempre debe utilizarse el mismo y bajo las mismas condiciones de manera que los perfiles electroforéticos sean comparables. En cada uno de los geles, además, se incluye una variedad que se tomará como referencia o patrón, y que en este caso ha sido la variedad comercial "Hassan". Para asegurar la determinación de los patrones de hordeínas presentados por cada genotipo, se analizaron un mínimo de tres granos por cada muestra, cada una de las cuales se supone homogénea, por haber sido depurada previamente en ensayos de campo (ver apartado II.2.1.1.1.).

En un gel de SDS-PAGE pueden distinguirse cuatro zonas bien diferenciadas correspondientes a grupos de polipéptidos de diferentes pesos moleculares. Genéricamente estos grupos han sido denominados como A, B, C y D en orden creciente de peso molecular. Las hordeínas A de menor peso molecular, son proteínas solubles en cloroformo-metanol (proteínas CM) y apenas presentan variación entre genotipos (Salcedo et al., 1984; Shewry et al., 1988), por lo que son muy útiles como marcadores filogenéticos y se estudiarán con detalle en el apartado III.5.

En el presente trabajo se tiene la finalidad de comparar los patrones polipeptídicos que presentan 95 accesiones de cebada de diferente origen geográfico y agruparlos por similitudes. De la colección de accesiones de cebada analizadas, existen 44 genotipos antiguos de origen español, 4 genotipos de origen desconocido, uno de Marruecos y el resto procede de Turquía, Europa Central y del Este.

Al comparar los perfiles electroforéticos de las 95 accesiones, se observa una amplia variedad de patrones que afectan a las hordeínas B, C y D, por lo que se contemplarán en principio, por separado.

III.4.1. HORDEÍNAS B

El grupo de hordeínas B incluye polipéptidos con pesos moleculares comprendidos entre 29 y 45 kDa. Pueden definirse en este grupo dos regiones diferenciadas, una correspondiente a pesos moleculares de 29 kDa a 40 kDa y otra de 40 kDa a 45 kDa. La primera región puede presentar un número variable de polipéptidos mientras que la segunda presenta una proteína muy abundante que puede aparecer en dos posiciones alternativas denominadas B7 y B8.

En la Figura III.18.A se presentan los patrones electroforéticos de las hordeínas B de las accesiones estudiadas y en la Figura III.18.B, la interpretación esquemática de los mismos. Como puede observarse, se han obtenido un total de 13 patrones diferentes, cada uno de ellos con un número variable de genotipos, excepto el grupo 12 que únicamente presenta el genotipo LCC-308 (cv. Rapid).

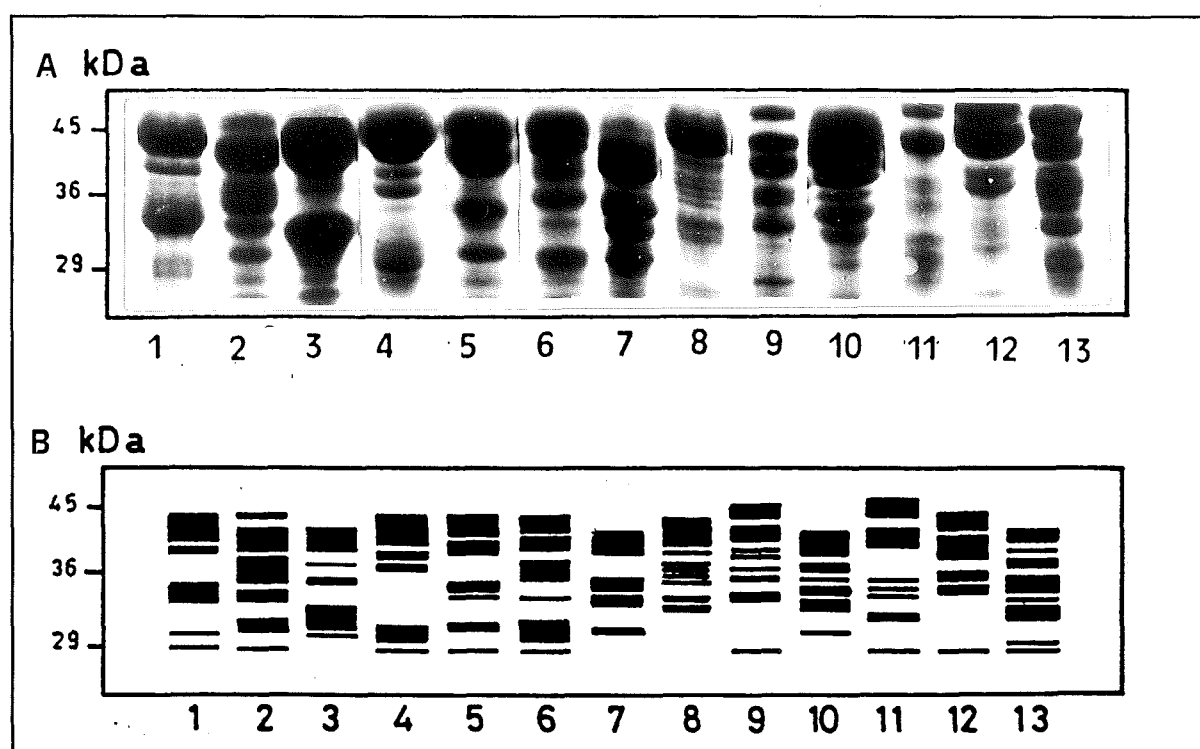


Figura III.18. A: Patrones electroforéticos de las hordeínas B.
B: Interpretación esquemática de los patrones electroforéticos

El patrón que presenta mayor número de genotipos es el 1 donde se incluyen un total de 28 genotipos, 20 de las cuales son de origen español (un 44% de los genotipos españoles).

El resto de agrupaciones presenta en general, heterogeneidad en cuanto a número y origen de los genotipos que incluyen.

III.4.2. HORDEÍNAS C

Con respecto a las hordeínas C, se observa una menor variabilidad en cuanto a patrones de polipéptidos, pudiéndose agrupar en un total de 9 grupos denominados de la A a la I (Figura III.19.A). Su representación esquemática se muestra en la Figura III.19B.

Como puede observarse, en los geles existen dos zonas diferenciadas. La primera zona de un peso molecular algo superior a 66 kDa, puede presentar hasta un máximo de tres bandas, contrariamente a lo expuesto por otros autores en cebadas de seis carreras (Shewry et al., 1988; Jouve et al., 1990). En la segunda zona de peso molecular inferior a 66 kDa, aparecen de 3 a 4 bandas, siendo una de ellas bastante prominente.

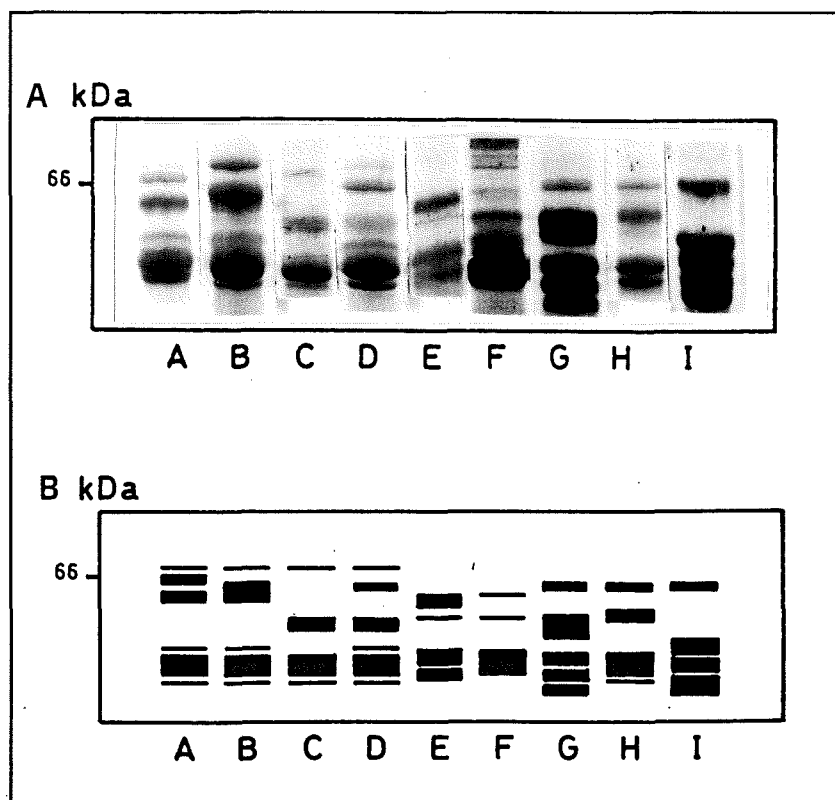


Figura III.19. A: Patrones electroforéticos de las hordeínas C.

B: Interpretación esquemática de los patrones electroforéticos.

Los patrones que presentan un mayor número de genotipos son los grupos A y B con 20 y 28 genotipos respectivamente (un 50% del total de los genotipos analizados). El grupo A presenta 14 genotipos españoles y el grupo B, 13. Por tanto, un 60% de los genotipos de origen español presentan patrones de hordeínas C de los tipos A y B.

III.4.3. HORDEÍNAS D

Las hordeínas D son las de mayor peso molecular, alrededor de 97 kDa, y presentan un solo polipéptido en dos posiciones alternativas, denominados D1 y D2 (Fig. III.17). Sólo 12 accesiones de las 95 analizadas, presentan la banda D2. Entre las accesiones españolas, el genotipo 295L es el único que presenta esta banda, mientras que un 99% presentan fijada la banda D1, contrariamente a lo citado por otros autores para cebadas de seis carreras españolas (Jouve et al., 1990).

Los patrones electroforéticos totales (hordeínas B, C y D) obtenidos de las 95 accesiones analizadas, se presentan en la Tabla III.17. En la Figura III.20 se representa el dendrograma que resume la semejanza existente entre las 95 accesiones de cebada analizadas, en base a los electroforegramas de las hordeínas B y C. Como puede observarse en el dendrograma, se han formado múltiples agrupaciones entre genotipos, destacando 4 grupos o "clusters" principales:

- **Grupo 1:** presenta un total de 10 genotipos, todos ellos de origen español.
- **Grupo 2:** es el grupo más numeroso, con 13 genotipos, de los cuales 10 son españoles.
- **Grupo 3:** comprende 9 genotipos, 6 de ellos españoles y 1 de origen desconocido y 2 europeos.
- **Grupo 4:** está formado por 7 genotipos, todos de origen español.

Tabla III.17. Hordeínas, B, C y D presentes en los genotipos en estudio

Nº	VARIEDAD	ORIGEN	HORD-B	HORD-C	HORD-D
1	BNG-7757	SORIA	1	A	D1
2	BNG-9024	VALLADOLID	1	B	D1
3	BNG-8740	TOLEDO	6	G	D1
4	BNG-9015	CUENCA	1	B	D1
5	BNG-8741	TOLEDO	7	B	D1
6	BNG-9003	SORIA	1	A	D1
7	BNG-9016	CUENCA	1	A	D1
8	BNG-9031	VALLADOLID	1	A	D1
9	BNG-8739	TOLEDO	6	G	D1
10	BNG-9018	CUENCA	1	G	D1
11	BNG-8321	GUADALAJARA	9	G	D1
12	BNG-8742	BADAJOS	1	A	D1
13	BNG-9028	VALLADOLID	4	A	D2
14	BNG-9007	SORIA	1	A	D1
15	BNG-9017	CUENCA	1	A	D1
16	BNG-9026	VALLADOLID	1	B	D1
17	BNG-8744	BADAJOS	2	B	D1
18	BNG-8743	BADAJOS	1	B	D1
19	BNG-9013	BARCELONA	1	G	D1
20	BNG-2128	LEON	1	E	D1
21	BNG-9005	SORIA	4	B	D1
22	BNG-8786	CUENCA	7	B	D1
23	LCC-49	ALEMANIA	4	A	D1
24	LCC-50	DINAMARCA	5	A	D1
25	LCC-63	PAMULA ARTES	6	C	D1
26	LCC-64	PAMULA SOLS.	7	C	D1
27	LCC-72	GRAN BRETAÑA	4	I	D1
28	LCC-286	ALMAZAN	1	B	D1
29	LCC-287	JUDES	1	B	D1
30	LCC-288	BELTEJAR	1	B	D1
31	LCC-289	MOSAREJOS	1	B	D1
32	LCC-290	RETORTILLO	1	A	D1
33	LCC-291	S.P.MANRIQUE	1	A	D1
34	LCC-304	CHECOSLOVAQUIA	1	B	D1
35	LCC-305	CHECOSLOVAQUIA	1	C	D1
36	LCC-306	CHECOSLOVAQUIA	9	B	D1
37	LCC-307	CHECOSLOVAQUIA	9	B	D1
38	LCC-308	CHECOSLOVAQUIA	12	B	D1
39	LCC-309	CHECOSLOVAQUIA	1	B	D1
40	LCC-310	CHECOSLOVAQUIA	7	C	D1
41	LCC-311	CHECOSLOVAQUIA	14	B	D1
42	AD-5	NAVARRA	1	I	D1
43	AD-21	desconocido	1	B	D1
44	AD-34	GRAN BRETAÑA	2	I	D1
45	AD-36	desconocido	2	G	D1
46	AD-47	CADIZ	3	D	D1
47	AD-53	CADIZ	4	A	D1
48	AD-54	CADIZ	4	A	D1
49	AD-75	FRANCIA	1	G	D1

Tabla III.17. (Continuación)

<i>Nº</i>	<i>VARIEDAD</i>	<i>ORIGEN</i>	<i>HORD-B</i>	<i>HORD-C</i>	<i>HORD-D</i>
50	AD-77	FRANCIA	9	E	D1
51	AD-78	FRANCIA	13	D	D1
52	AD-79	CIUDAD REAL	6	G	D1
53	AD-88	CHECOSLOVAQUIA	2	G	D1
54	AD-89	ALEMANIA	2	G	D1
55	AD-98	desconocido	7	A	D1
56	AD-112	MARRUECOS	5	H	D1
57	AD-122	NAVARRA	6	F	D1
58	AD-138	desconocido	4	A	D1
59	AD-161	CASTEJON SOS	7	A	D1
60	AD-177	SAMPER CALANDA	7	A	D1
61	AD-179	SAMPER CALANDA	3	E	D1
62	AD-182	TORRES BERR.	7	E	D1
63	AD-200	BISCARRUES	4	B	D1
64	AD-234	GUDAR 1	6	F	D1
65	AD-244	TARAZONA	3	E	D1
66	AD-248	PAMULA SOLSONA	2	F	D1
67	1-E	TURQUIA	8	D	D2
68	4-E	TURQUIA	6	E	D1
69	5-E	RUMANIA	10	B	D1
70	6-E	RUMANIA	6	E	D1
71	7-E	HUNGRIA	10	B	D1
72	8-E	BULGARIA	8	H	D1
73	9-E	TURQUIA	8	H	D1
74	10-E	TURQUIA	5	B	D2
75	11-E	TURQUIA	10	B	D1
76	12-E	TURQUIA	8	F	D1
77	13-E	TURQUIA	6	C	D1
78	14-E	TURQUIA	1	F	D1
79	15-E	TURQUIA	5	F	D2
80	16-E	AUSTRIA	5	E	D2
81	17-E	AUSTRIA	5	E	D2
82	18-E	CHECOSLOVAQUIA	5	F	D1
83	19-E	TURQUIA	10	E	D1
84	20-E	TURQUIA	10	E	D1
85	21-E	CHECOSLOVAQUIA	6	B	D1
86	22-E	CHECOSLOVAQUIA	14	E	D1
87	23-E	HUNGRIA	6	B	D1
88	24-E	HUNGRIA	5	B	D1
89	26-E	RUMANIA	5	D	D2
90	35-E	TURQUIA	10	E	D1
91	36-E	TURQUIA	13	C	D2
92	39-E	ALEMANIA	4	A	D1
93	40-E	ALEMANIA	14	A	D1
94	41-E	ALEMANIA	1	D	D1
95	42-E	ALEMANIA	1	B	D1

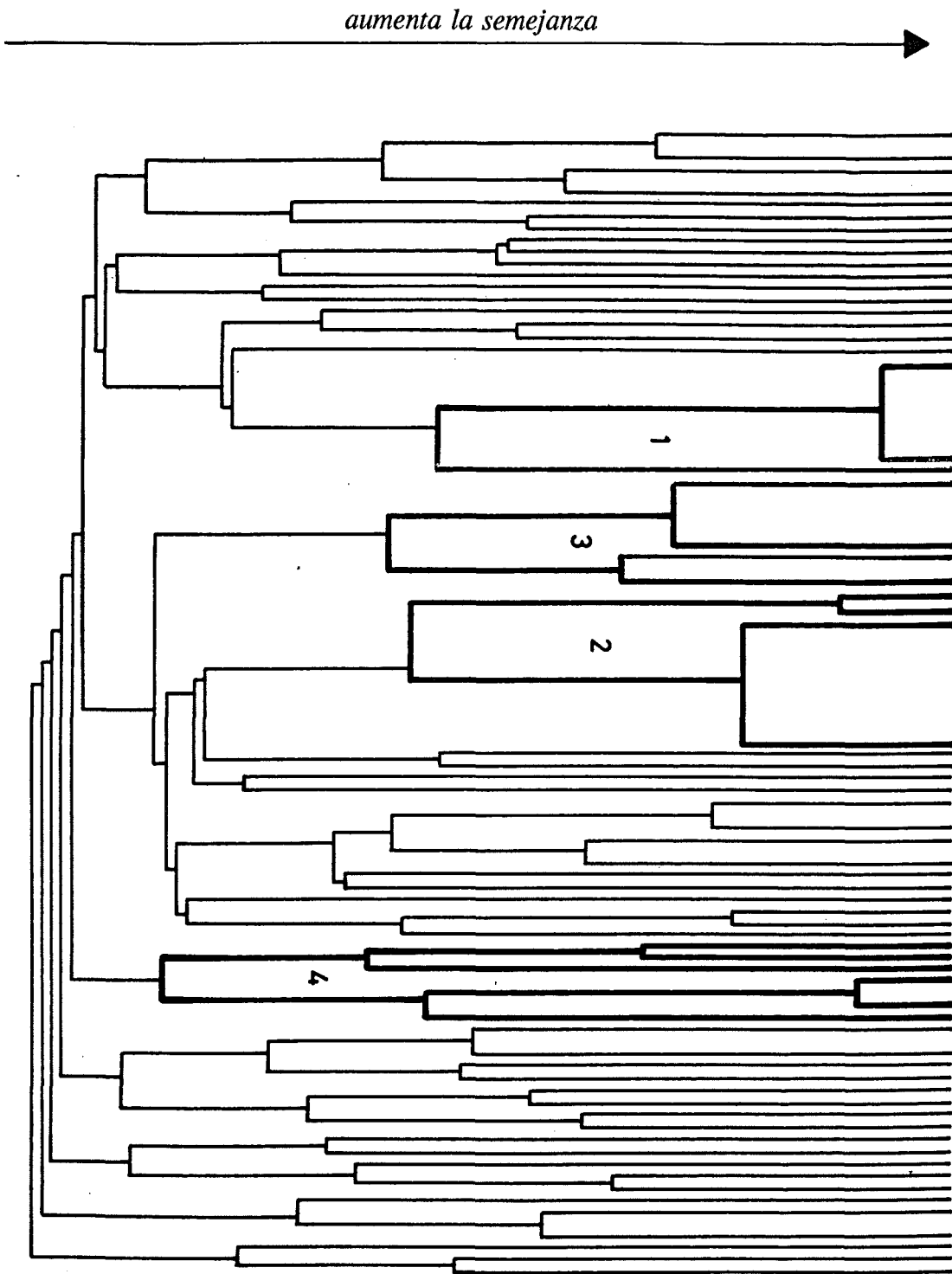


Figura III.20. Agrupaciones de genotipos en función de los patrones electroforéticos de las Hordeínas B y C.

Como resumen de lo observado en el dendrograma, cabe destacar que un 73% de los genotipos de origen español, quedan incluidos en 4 grupos principales. Se observa por tanto, una cierta homogeneidad para estos genotipos, en cuanto al perfil electroforético de hordeínas B y C. El resto de "clusters" están formados por un menor número de accesiones, siendo estas agrupaciones generalmente heterogéneas en cuanto a origen geográfico se refiere.

III.5. MARCADORES FILOGENÉTICOS: PROTEÍNAS CM

La baja variabilidad que presentan las proteínas CM (solubles en cloroformo-metanol) hace de ellas una útil herramienta en estudios de tipo filogenético (Salcedo et al., 1984; Molina-Cano et al. 1987). Estas proteínas del endospermo de cebada, no presentan una buena resolución en SDS-PAGE, debido a la similitud de sus pesos moleculares, por lo que es necesario un fraccionamiento bidimensional de las mismas, combinando el isoelectroenfoco con la electroforesis en geles de almidón, para obtener una mayor resolución que facilite su análisis.

El fenotipo considerado hasta el momento como estándar, presenta cinco componentes de proteínas CM denominados CMa-1, C Mb-1, C Mc-1, C Md-1 y C Me-1 respectivamente.

Con el fin de establecer posibles relaciones filogenéticas entre cebadas antiguas autóctonas españolas, se ha analizado la variabilidad genética de las proteínas CM de 95 accesiones de *H. vulgare* de diferente origen geográfico y dos accesiones de *H. spontaneum*. Los genotipos europeos empleados en el presente trabajo, se seleccionaron por su origen geográfico teniendo en cuenta la posibilidad de que las cebadas españolas procedieran del Creciente Fértil y llegaran hasta la Península Ibérica por la cuenca mediterránea. Las accesiones de *H. spontaneum* son de Grecia y Creta.

La asignación de un nuevo componente como variante de una proteína estándar determinada, se basó en su aparición alternativa en las muestras estudiadas. La posición relativa de cada variante en el mapa bidimensional fue comprobada por electroforesis de una

mezcla del fenotipo variante y el fenotipo estándar o, cuando fue necesario, de una mezcla de dos fenotipos variantes.

Las variantes genéticas detectadas en el presente trabajo y su posición relativa en el mapa bidimensional, se muestran en la Figura III.21. En todos los casos estudiados, no se ha detectado variante alguna para las proteínas CMc y CMD, aunque sí se han observado variantes alternativas a CMc en accesiones de *H. spontaneum* analizadas en anteriores trabajos (Salcedo et al., 1984; Molina-Cano et al., 1987).

En la Tabla III.18 aparece la composición de proteínas CM de las accesiones de *H. vulgare* analizadas así como de las accesiones de *H. spontaneum*. Cabe señalar en lo que respecta a *H. spontaneum* procedente de Creta, que se observaron dos fenotipos diferentes, como consecuencia de la heterogeneidad de la población analizada.

III.5.1. VARIANTES DE CMb

Con respecto a las variantes de CMb, se ha observado en un 37% del total de accesiones, una variante alternativa a CMb-1, denominada CMb-2. Esta variante ha sido observada con anterioridad en accesiones marroquíes de *H. spontaneum*, en algunos cultivares españoles de seis carreras (Almunia, Albacete, Berta y Cerro), en el cultivar francés "Hatif de Grignon" y en el cultivar de dos carreras "Porthos" (Molina-Cano et al., 1987).

En el presente trabajo un 77% de los genotipos españoles presentan la variante CMb-2, lo que un 99% de las accesiones de cebada que presentan la variante CMb-2 son de origen español.

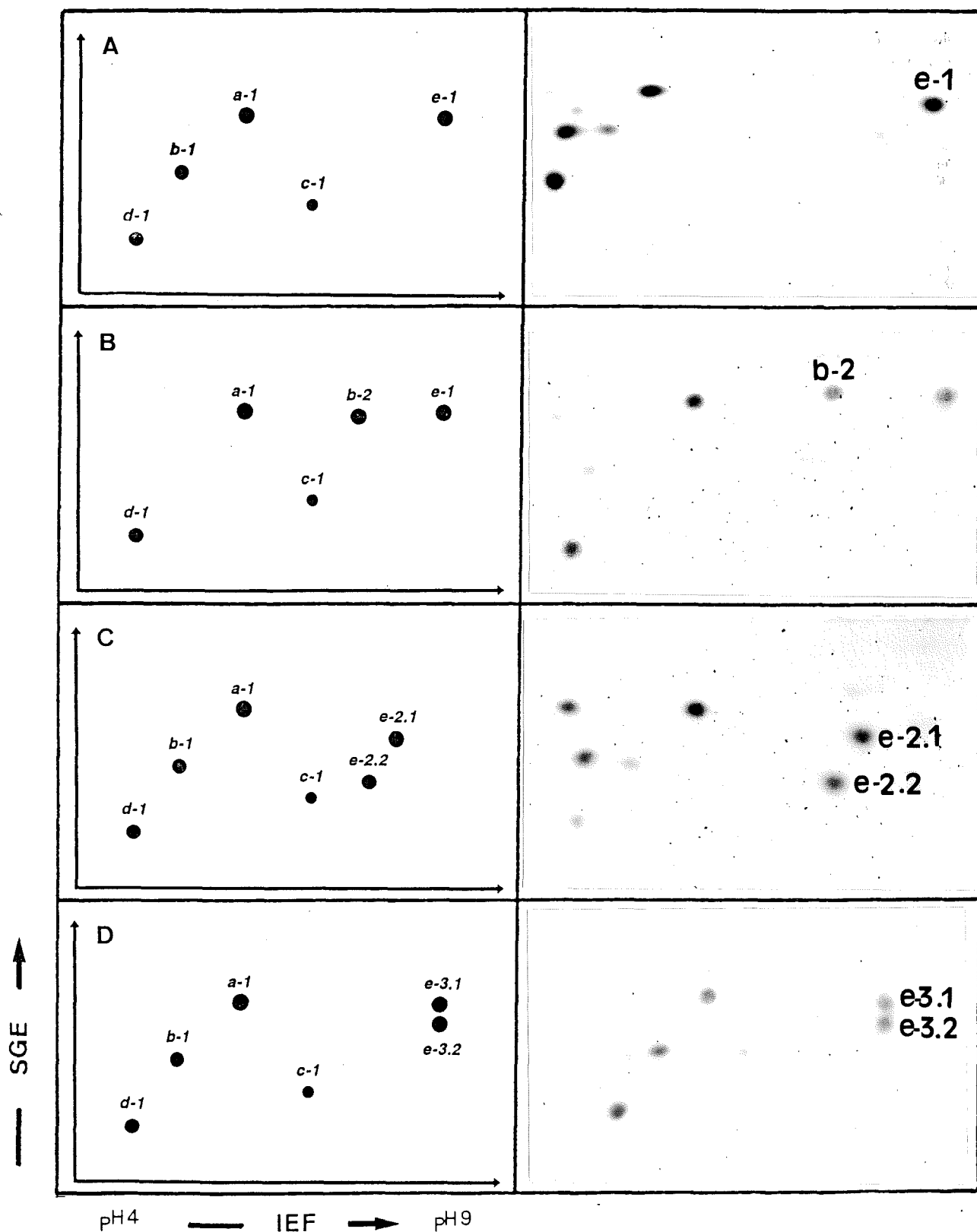


Figura III.21. Mapas bidimensionales (IEF x SGE) e interpretación esquemática de las variantes alélicas de proteínas CM aparecidas en el presente trabajo: A) fenotipo estándar; B) variante CMb-2; C) variantes CMe2.1-2.2; D) variantes CMe3.1-3.2.

Tabla III.18. Proteínas CM presentes en los genotipos en estudio

Nº	GENOTIPO	ORIGEN	PROTEÍNAS CM
1	209L	SORIA	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
2	293L	VALLADOLID	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
3	230L	TOLEDO	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
4	288L	CUENCA	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
5	231L	TOLEDO	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
6	284L	SORIA	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
7	289L	CUENCA	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
8	296L	VALLADOLID	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
9	229L	TOLEDO	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
10	291L	CUENCA	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
11	223L	GUADALAJARA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
12	232L	BADAJOS	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
13	295L	VALLADOLID	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
14	286L	SORIA	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
15	290L	CUENCA	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
16	294L	VALLADOLID	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
17	234L	BADAJOS	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
18	233L	BADAJOS	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
19	287L	BARCELONA	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
20	201L	LEON	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
21	285L	SORIA	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
22	246L	CUENCA	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
23	LCC-49	ALEMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
24	LCC-50	DINAMARCA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
25	LCC-63	PAMULA ARTES	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
26	LCC-64	PAMULA SOLSONA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
27	LCC-72	GRAN BRETAÑA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
28	LCC-286	ALMANZAR	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
29	LCC-287	JUDES	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
30	LCC-288	BELTEJAR	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
31	LCC-289	MOSAREJOS	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
32	LCC-290	RETORTILLO	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
33	LCC-291	S.P.MANRIQUE	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
34	LCC-304	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
35	LCC-305	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
36	LCC-306	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
37	LCC-307	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
38	LCC-308	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
39	LCC-309	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
40	LCC-310	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
41	LCC-311	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
42	AD-5	CER.BURGUETE	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
43	AD-21	desconocido	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
44	AD-34	GRAN BRETAÑA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
45	AD-36	desconocido	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
46	AD-47	CADIZ	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
47	AD-53	CADIZ	a-1 b-1 c-1 d-1 e2.1 e2.2
48	AD-54	CADIZ	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
49	AD-75	FRANCIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1

Tabla III.18. (Continuación)

Nº	VARIEDAD	ORIGEN	PROTEINAS CM
50	AD-77	FRANCIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
51	AD-78	FRANCIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
52	AD-79	CIUDAD REAL	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
53	AD-88	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
54	AD-89	ALEMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
55	AD-98	desconocido	a-1 b-1 c-1 d-1 e2.1 e2.2
56	AD-112	MARRUECOS	a-1 b-1 c-1 d-1 e2.1 e2.2
57	AD-122	NAVARRA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
58	AD-138	desconocido	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
59	AD-161	CASTEJON DE SOS	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
60	AD-177	SAMPER CALANDA	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
61	AD-179	SAMPER CALANDA	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
62	AD-182	TORRES BERR.	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
63	AD-200	BISCARRUES 4	a-1 b-2 c-1 d-1 e2.1 e2.2
64	AD-234	GUDAR 1	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
65	AD-244	TARAZONA	a-1 b-2 c-1 d-1 e3.1 e3.2
66	AD-248	PAMULA SOLSONA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
67	H.spont	CRETA 1	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
68	H. spont	CRETA 2	a-1 b-1 c-1 d-1 e2.1 e2.2
69	H.spont	GRECIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
70	1-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
71	4-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
72	5-E	RUMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
73	6-E	RUMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
74	7E	HUNGRIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
75	8-E	BULGARIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
76	9-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
77	10-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
78	11-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
79	12-E	TURQUIA	a-1 b-2 c-1 d-1 e-1
80	13-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
81	14-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
82	15-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
83	16-E	AUSTRIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e2.1 e2.2
84	17-E	AUSTRIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e2.1 e2.2
85	18-E	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
86	19-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
87	20-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
88	21-E	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
89	22-E	CHECOSLOVAQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
90	23-E	HUNGRIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
91	24-E	HUNGRIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
92	26-E	RUMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
93	35-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1
94	36-E	TURQUIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
95	39-E	ALEMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
96	40-E	ALEMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
97	41-E	ALEMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e3.1 e3.2
98	42-E	ALEMANIA	a-1 b-1 c-1 d-1 e-1

III.5.2. VARIANTES DE CMe

El componente estándar CMe-1, aparece en un 63% de las accesiones analizadas. Cuatro variantes de CMe-1 se han observado entre estas accesiones : CMe-2.1, CMe-2.2, CMe-3.1 y CMe-3.2

Las variantes CMe-2.1 -2.2 se heredan conjuntamente (Salcedo et al., 1984), estando presentes en 19 genotipos, 14 de los cuales son españoles. Estas variantes hasta el momento sólo habían sido detectadas en el cultivar francés "Hatif de Grignon" y derivados del mismo, en cultivares de seis carreras de Marruecos y en diversas accesiones de *H.spontaneum* de origen marroquí (Molina-Cano et al., 1987). En el presente trabajo, también se ha observado CMe-2.1 -2.2 en una población polimórfica para este locus de *H.spontaneum* procedente de Creta.

Las variantes CMe-3.1 -3.2 siempre aparecen juntas en mapas de electroforesis bidimensionales (Fig. III.21D), estando presentes en un 18% del total de accesiones y, hasta el momento, no habían sido descritas en ningún cultivar de cebada ni accesión de *H.spontaneum*. Solamente tres genotipos españoles presentan CMe-3.1 -3.2 y el resto aparecen distribuidos de forma heterogénea. Las accesiones de *H.spontaneum* procedentes de Grecia y Creta también presentan las variantes CMe-3.1 -3.2.

En el presente trabajo también se ha detectado, por primera vez, una proteína que presenta dos posiciones alternativas debajo de CMa, en los mapas bidimensionales (Figura III.22 A y B. En un 25% del total de las muestras analizadas se ha detectado este componente (indicado con flechas en la Figura III.21), pero las frecuencias con que aparece en cebadas europeas (13%) y españolas (12%) son similares, por lo que tiene bajo poder discriminatorio en lo que a filogenia se refiere. No se tiene información bioquímica ni genética sobre ninguna de las formas alternativas de esta proteína. Sin embargo, el componente se ha detectado en el cultivar Betzes y su correspondiente gen estructural se ha

localizado en el cromosoma 6H (Lama y Salcedo, comunicación personal). Este dato indica que dicho componente no debe ser variante alélica de ninguna de las proteínas CM utilizadas en este trabajo, cuyos genes estructurales se encuentran localizados en los cromosomas 3H (CMe), 4H (CMb y CMd) y 7H (CMA y CMc) (Salcedo et al., 1984). Por todo lo anteriormente expuesto, estas proteínas no se tendrán en cuenta como marcadores bioquímicos en el presente trabajo.

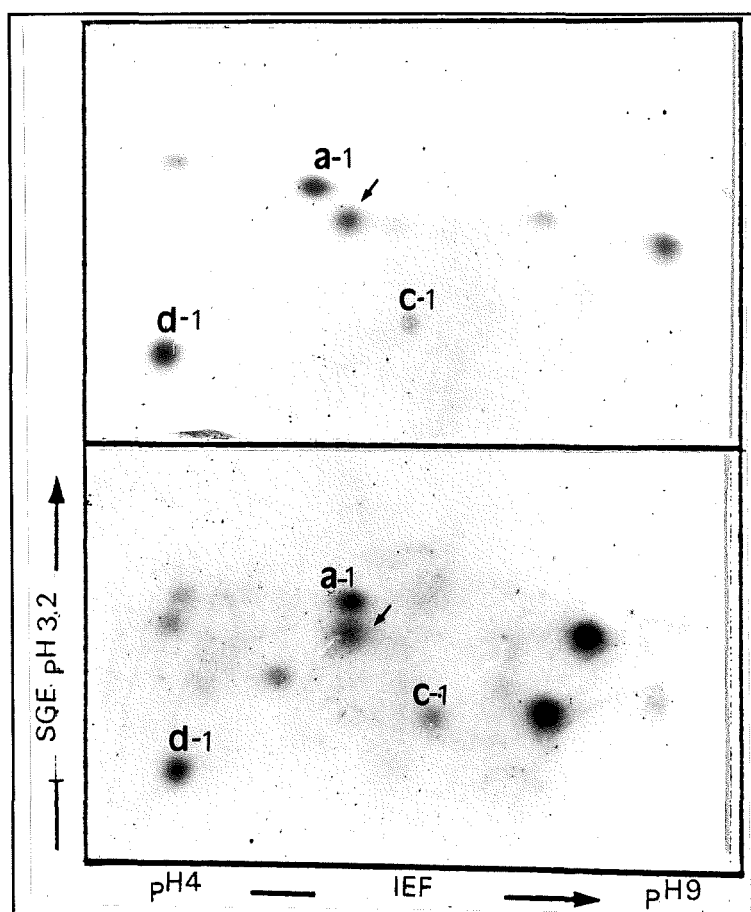


Figura III.22. Mapa bidimensional (IEF x SGE) donde se indican con flechas otras proteínas detectadas, por primera vez, en el presente trabajo.

III.5.3. AGRUPACIONES ENTRE GENOTIPOS

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas entre todas las accesiones de cebada analizadas en base a las variantes genéticas de las proteínas CM, se ha realizado un dendrograma que agrupa los genotipos por grupos de semejanza. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura III.23.

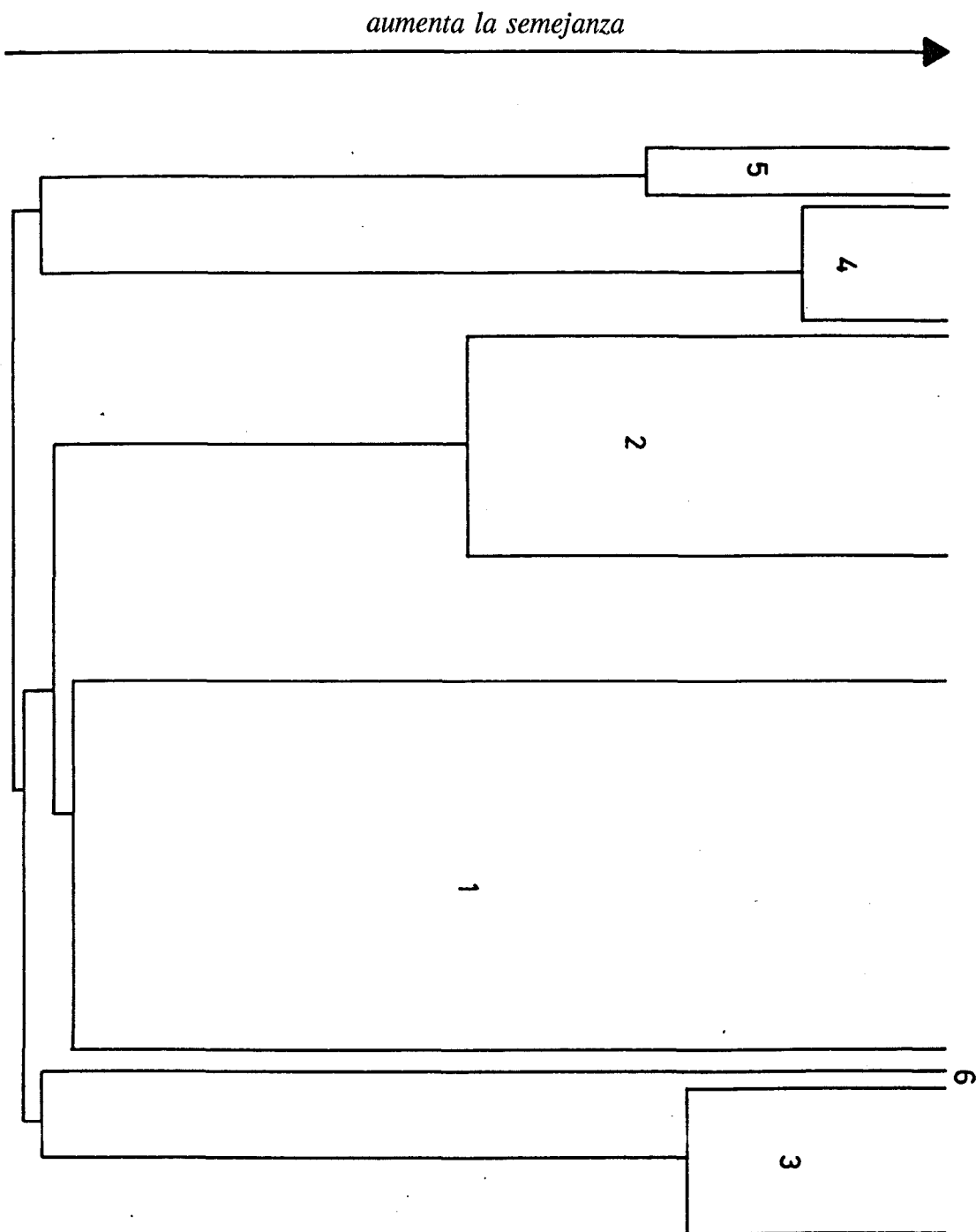


Figura III.23. Agrupaciones de genotipos de cebada en función de las proteínas CM. Teniendo en cuenta que en todos los genotipos CMA-1, CMc-1 y CMd-1 son constantes, la constitución genética de cada *cluster* es:

1. CMb-1, CMe-1
2. CMb-2, CMe-1
3. CMb-1, CMe3.1-3.2
4. CMb-2, CMe2.1-2.2
5. CMb-1, CMe2.1-2.2
6. CMb-2, CMe3.1-3.2

En el dendrograma se aprecian 5 grupos mayoritarios :

-Grupo 1: es el grupo más numeroso, formado por 42 accesiones cuya composición en proteínas CM es el fenotipo estándar CMa-1, CMb-1, CMc-1, CMD-1 y CMe-1. Dentro de este grupo tan sólo aparecen 4 genotipos registrados como españoles (AD-122, AD-161, AD-248 y LCC-64).

-Grupo 2: está formado por 22 accesiones que presentan las proteínas CMa-1, CMb-2, CMc-1, CMD-1 y CMe-1. Todos los genotipos de este grupo son de origen español, excepto la accesión 12-E (Turquía).

-Grupo 3: lo constituye 13 genotipos de cebada cultivada y dos accesiones de *H.spontaneum* de Grecia y Creta, presentando la composición CMa-1, CMb-1, CMc-1, CMD-1 y CMe-3.1 -3.2. Un único genotipo de los 13, es de origen español (223L).

-Grupo 4: formado por 12 genotipos cuya constitución en proteínas CM es CMa-1, CMb-2, CMc-1, CMD-1 y CMe-2.1 -2.2. Los 12 genotipos son de origen español.

-Grupo 5: en este grupo aparecen 5 genotipos con fenotipo CMa-1, CMb-1, CMc-1, CMD-1 y CMe-2.1 -2.2. Dos de estos genotipos son de origen español y uno de origen desconocido. También se ha observado este fenotipo en *H.spontaneum* de Creta.

Sólo existe un genotipo de origen español (AD-244), que no queda incluido en ninguno de los grupos anteriores, cuya composición en proteínas CM es CMa-1, CMb-2, CMc-1, CMD-1 y CMe-3.1 -3.2.

Como puede observarse, los genotipos españoles de cebada se agrupan de forma homogénea entre ellos y de forma diferente a la mayoría de los genotipos europeos. En la Figura III.23 queda reflejada la distribución de las variantes genéticas de las proteínas CM de las cebadas españolas frente a la presentada por las europeas.

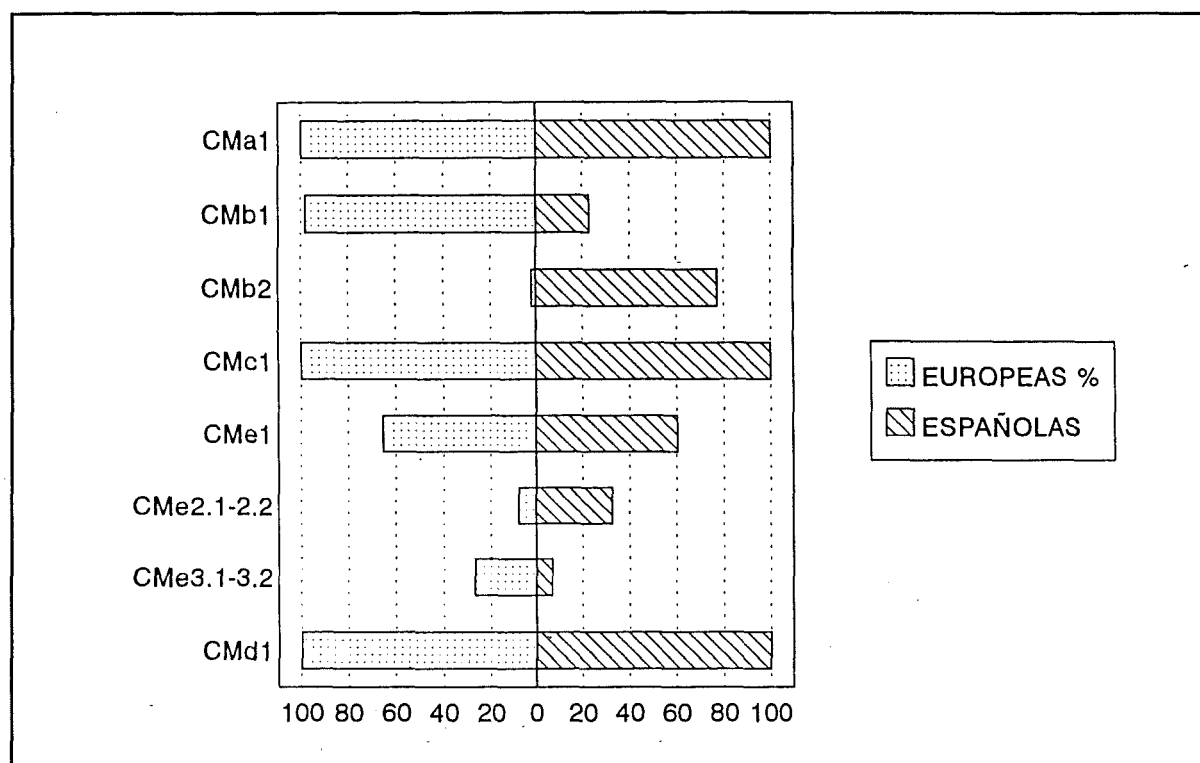


Figura III.24. Distribución del porcentaje de las variantes genéticas de las proteínas CM de las cebadas españolas frente a las europeas.

III. 6. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE CMB-2

Un 77% de las accesiones de cebadas españolas analizadas en el presente trabajo, presentan una variante alélica, CMB-2, de la proteína BTAI-CMb1 (ver Figura III.21B). Esta proteína junto con BTAI-CMa1 y BTAI-CMd1, constituye el inhibidor heterotetramérico (1CMa1: 1CMb1: 2CMd1) de α -amilasas de insectos descrito en endospermo de cebada (Sánchez-Monge et al., 1986; Gómez et al., 1989). Con objeto de comparar las características químicas y la actividad inhibitoria de CMB-2 respecto a CMb-1, se han purificado las subunidades del inhibidor tetramérico a partir de harina de los cultivares Bomi (subunidades BTAI-CMa1, -CMd1 y -CMb1) y Hatif de Grignon (subunidades BTAI-CMa1, -CMd1 y la variante CMB2). La Fig III.25 muestra la posición de estos componentes en los mapas bidimensionales de extractos etanol correspondientes a ambos cultivares. El

solapamiento de las subunidades BTAI-CMa1 y -CMd1 de las dos cebadas (a_{1B}/a_{1H} y d_{1B}/d_{1H} en la Fig.III.25) fue comprobado por análisis de una mezcla de sus extractos correspondientes.

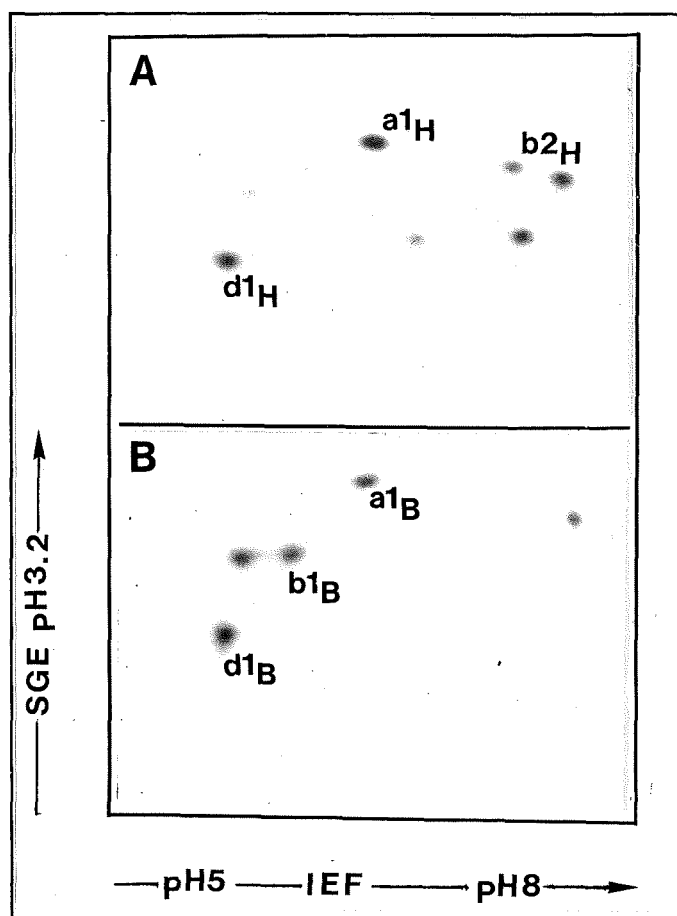


Figura III. 25. Mapa bidimensional (IEF x SGE) del extracto etanol de harina de los cultivares Hatif de Grignon (A) y Bomi (B). Se indica la posición de las subunidades de los inhibidores tetraméricos (proteínas CM).

III.6.1. OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN INHIBIDORES TETRAMÉRICOS.

En primer lugar se obtuvieron preparaciones crudas de inhibidores a partir de harina de ambos cultivares, mediante precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ del extracto 0.15 M NaCl (ver apartado II.2.3.1.1.). Posteriormente, las preparaciones de inhibidores se fraccionaron por cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100, utilizando condiciones no disociantes. El perfil de elución obtenido para el cultivar Hatif de Grignon (similar al del

cultivar Bomi), se muestra en la Fig.III.26. De los cinco picos que pueden apreciarse en el perfil, F2 tiene una masa molecular aparente de 60.000 e incluye a los inhibidores tetraméricos. Esta fracción contiene a las proteínas BTAI-CMb2, -CMA1 y -CMd1, así como un componente minoritario (CMb2*), como puede observarse cuando se somete a electroforesis bidimensional (Fig. III.27).

Figura III.26. Filtración molecular en Sephadex G-100 (condiciones no disociantes) de la preparación de inhibidores del cultivar Hatif de Grignon. La flecha señala el pico de elución de los inhibidores tetraméricos.

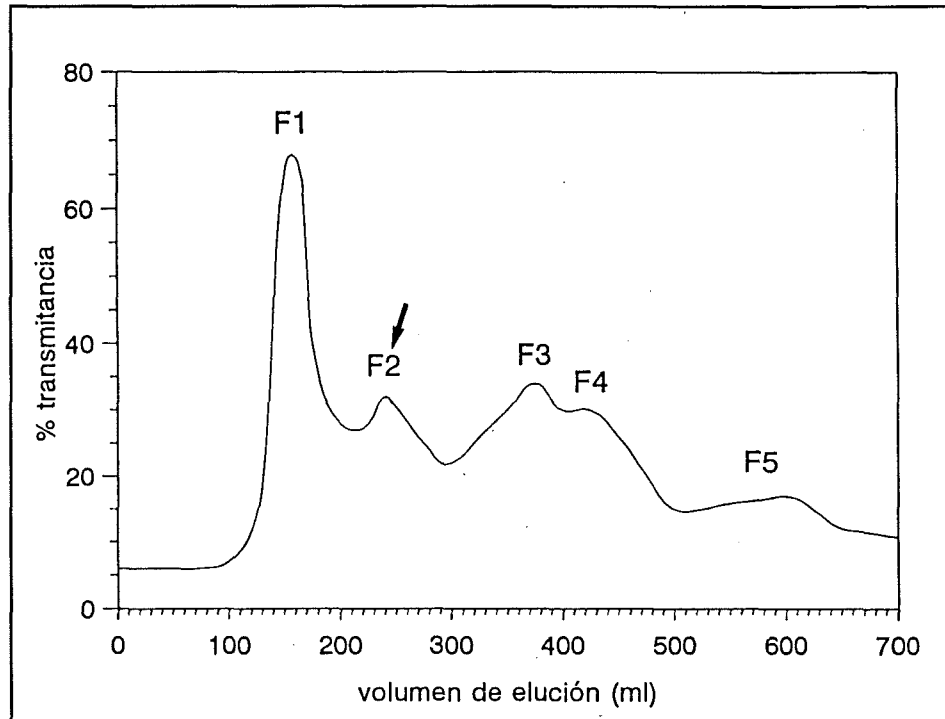
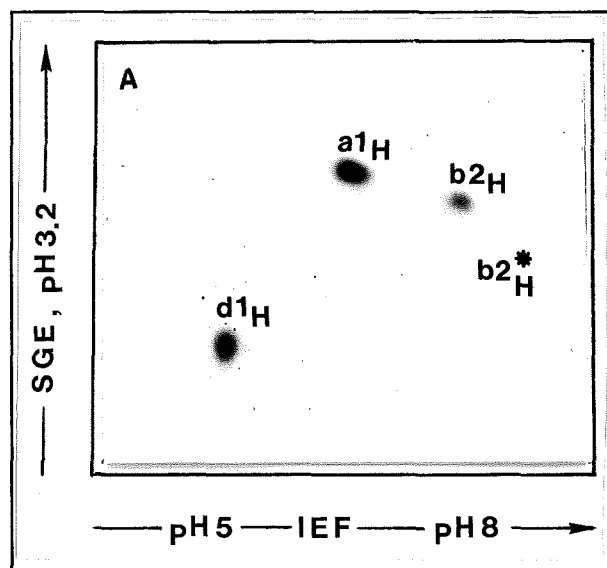


Figura III.27. Mapa bidimensional (IEF x SGE) de la fracción F2 correspondiente a los inhibidores tetraméricos del cultivar Hatif de Grignon



III. 6.2. AISLAMIENTO DE LA VARIANTE BTAI-CMb2.

La preparación de proteína correspondiente al pico F2 del perfil de filtración molecular (ver Fig III.26 y III.27) se fraccionó por RP-HPLC preparativo con el fin de purificar las subunidades de los inhibidores tetraméricos. La Fig.III.28 muestra el perfil obtenido en el caso del cultivar Hatif de Grignon.

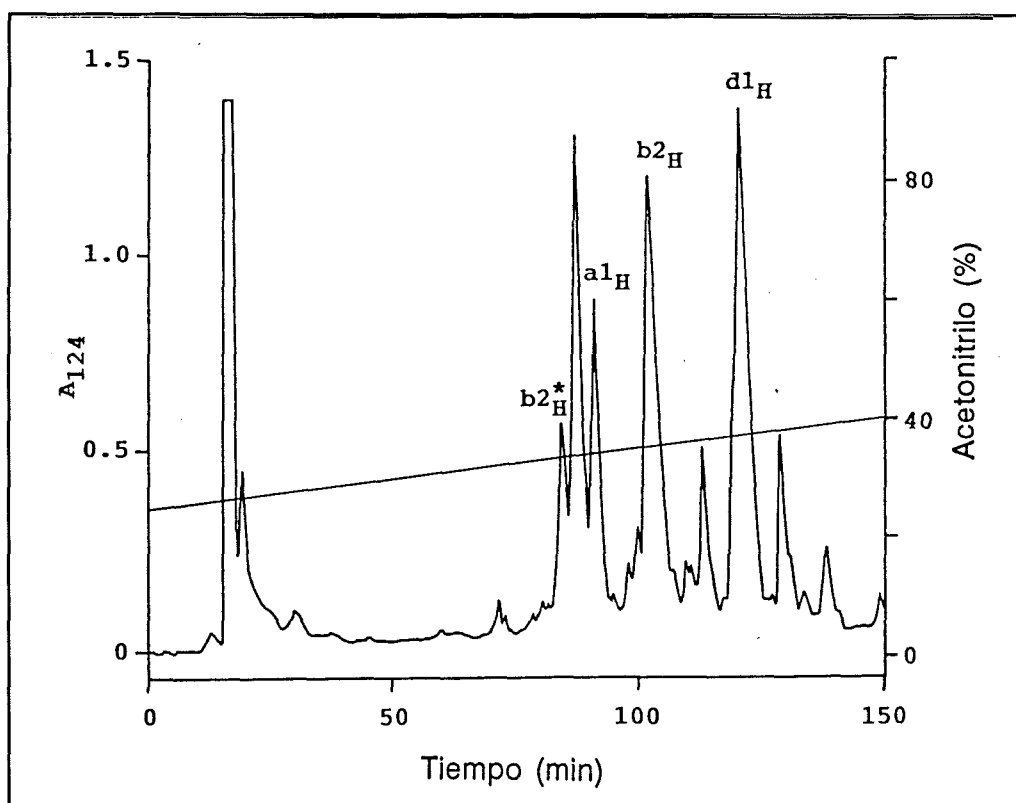
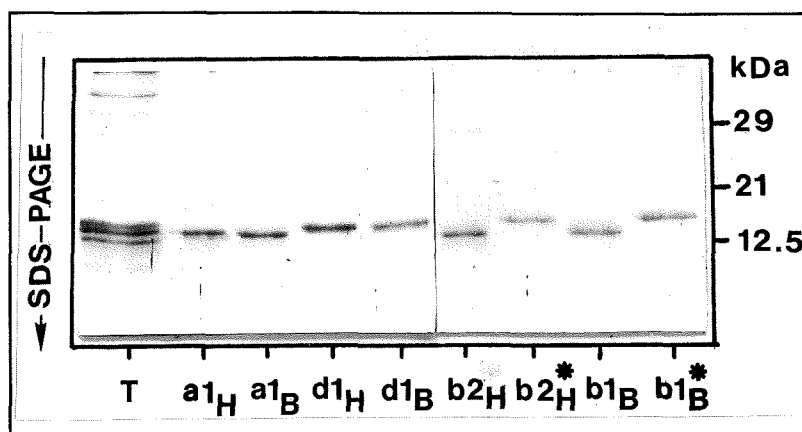


Figura III.28. Fraccionamiento mediante RP-HPLC de la fracción de filtración molecular de inhibidores tetraméricos (F2) del cultivar Hatif de Grignon.

Un método similar se utilizó para aislar las subunidades BTAI-CMa1, -CMb1 y -CMd1, así como la forma glicosilada CMb1*, del cultivar Bomi (Sánchez-Monge et al., 1992; datos no mostrados). La homogeneidad de las proteínas purificadas se comprobó por SDS-PAGE (Figura III.29) y por electroforesis bidimensional, donde todas ellas mostraron una sola mancha.

Figura III.29. SDS-PAGE de las siguientes muestras: (T) preparación de inhibidores tetaméricos; proteínas purificadas BTAI-CMa1 (a1), -CMd1 (d1), -CMb1 (b1), -CMb2 (b2), CMb1* (b1*) y CMb2* (b2*). Se designan con B y H los componentes aislados de los cultivares Bomi y Hatif de Grignon respectivamente.



III. 6.3. SECUENCIA NH₂-TERMINAL DE BTAI-CMb2 Y BTAI-CMb2*

La secuencia NH₂-terminal de la variante CMb2_H obtenida por secuenciación directa de la proteína purificada por HPLC, aparece en la Figura III.30. El alineamiento con la secuencia NH₂ terminal de la subunidad BTAI-CMb1 de Bomi (Barber et al., 1986b) muestra una única aunque significativa diferencia en los 23 primeros residuos de ambas secuencias. El cambio de ácido aspártico (CMb1) por lisina (CMb2) en posición cuarta, es coherente con el mayor punto isoeléctrico y movilidad electroforética a pH ácido de la variante BTAI-CMb2 con respecto a CMb1. La Figura III.30 muestra también la secuencia NH₂-terminal del componente CMb2*, la cual es idéntica a la de BTAI-CMb2 en los siete residuos determinados.

PROTEÍNA	SECUENCIA																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
CMb1 _B	V	G	S	E	D	C	T	P	W	T	A	T	P	I	T	P	L	P	S	C	R	D	Y
CMb2 _H	V	G	S	K	D	C	T	P	W	T	A	T	P	I	T	P	L	P	S	C	R	D	Y
CMb2* _H	V	G	S	K	D	C	T																

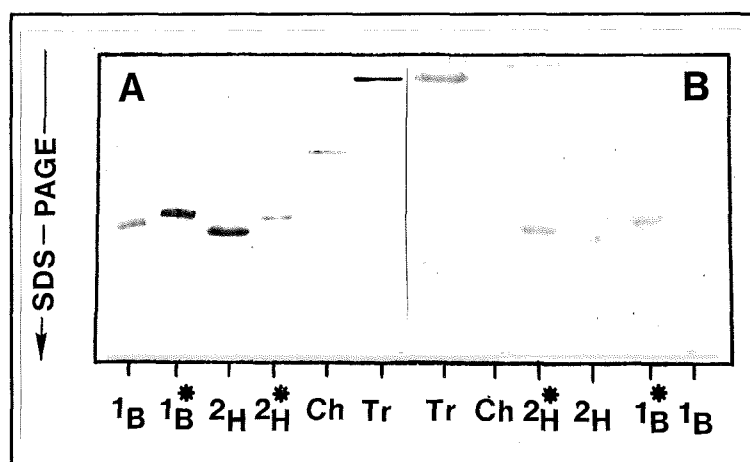
Figura III.30. Alineamiento de las secuencias NH₂-terminales de las proteínas BTAI-CMb1, -CMb2 y CMb2*. Se incluye la secuencia de BTAI-CMb1 tomada como referencia (Barber et al., 1986b).

III.6.4. DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

La proteína CMb2* tiene una masa molecular aparente mayor en SDS-PAGE (Fig. III.29), que la subunidad BTAI-CMb2, así como un tiempo de retención menor en HPLC de fase reversa (Fig III.28). Estos hechos, junto con la identidad en la secuencia NH₂-terminal de las dos proteínas, sugirió que CMb2* fuera una forma glicosilada de CMb2.

Cuando se comprobaron los pares de proteínas CMb1/CMb1* de Bomi y CMb2/CMb2* de Hatif de Grignon en ensayos de detección de glicoproteínas después de SDS-PAGE y electrotransferencia, los resultados mostraron que mientras que BTAI-CMb2 y -CMb1 no fueron reactivos, CMb2* y CMb1* se tiñeron positivamente (Fig III.31). Estos resultados indican que CMb2* es una forma glicosilada de BTAI-CMb2, y que la glicosilación no es exclusiva de BTAI-CMb1, sino que también afecta a su variante alélica. No se han encontrado formas glicosiladas correspondientes a las otras subunidades tetraméricas, BTAI-CMa1 y -CMd1.

Figura III.31. Tinción de glicoproteínas de las siguientes muestras: BTAI-CMb1 (1_B), CMb1* (1_B*), BTAI-CMb2 (2_H) y CMb2* (2_H*). Se designaron con B y H las proteínas de los cultivares Bomi y Hatif de Grignon respectivamente. Se utilizaron transferrina (Tr) y quimiotripsinógeno (Ch) como controles positivo y negativo respectivamente. Las muestras se separaron por SDS-PAGE, y se transfirieron a membranas de PVDF. Posteriormente se tiñeron con Azul de Coomassie (A) o con tinción para glicoproteínas (B).



III.6.5. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE BTAI-CMb2 Y BTAI-CMb2* COMO SUBUNIDADES DEL INHIBIDOR TETRAMÉRICO.

La reconstitución *in vitro* del tetrámero se ha conseguido en varias ocasiones mezclando las subunidades purificadas bajo condiciones no disociantes, tanto en trigo como en cebada (Sánchez-Monge et al., 1986, Gómez et al., 1989). En el presente trabajo se ha tenido en cuenta la estequiometría del tetrámero demostrada con anterioridad, en la relación 1CMA: 1CMb: 2CMd (Gómez et al., 1989).

Aunque la proteína CMb1* ha sido previamente identificada (Sánchez-Monge et al., 1992), hasta el momento no se había realizado ningún experimento de inhibición utilizando esta forma modificada. El efecto de la glicosilación (BTAI-CMb1 *versus* CMb1* y BTAI-CMb2 *versus* CMb2*) así como de la variación alélica (BTAI-CMb1 *versus* a CMb2) puede observarse en la Tabla III.19. Ensayos preliminares mostraron que las proteínas purificadas eran inactivas por sí mismas frente al enzima de *T. molitor*, excepto en el caso de BTAI-CMa1 (12% de inhibición usando 5 μ g de proteína/ensayo) tal y como se había descrito previamente (Barber et al., 1986b, Sánchez-Monge et al., 1986).

Como aparece en la Tabla III.19, no se han observado diferencias significativas entre la actividad inhibitoria de los tetrámeros reconstituídos de los cultivares Bomi y Hatif de Grignon. Por otra parte las formas glicosiladas BTAI-CMb1* y BTAI-CMb2* no afectan a los valores de inhibición del tetrámero de Bomi y Hatif de Grignon respectivamente, cuando sustituyen a sus correspondientes formas no glicosiladas. Como era de esperar, los componentes glicosilados no pueden sustituir a ninguna de las otras dos subunidades del tetrámero (BTAI-CMa1 y -CMd1), como puede observarse en las drásticas disminuciones de los valores de inhibición cuando se producen estos cambios (ver Tabla III.19)

Tabla III.19. Actividad inhibitoria frente a α -amilasa de *Tenebrio molitor* L., del tetrámero de cebada reconstituido con las subunidades purificadas.

Subunidades ^a	Inhibición (%) ^b
1a-1 _B + 1b-1 _B + 2d-1 _B	80
1a-1 _B + <u>1b-1_B*</u> + 2d-1 _B	74
<u>1b-1_B*</u> + 1b-1 _B + 2d-1 _B	9
1a-1 _B + 1b-1 _B + <u>2b-1_B*</u>	4
1a-1 _H + 1b-2 _H + 2d-1 _H	79
1a-1 _H + <u>1b-2_H*</u> + 2d-1 _H	84
<u>1b-2_H*</u> + 1b-2 _H + 2d-1 _H	19
1a-1 _H + 1b-2 _H + <u>2b-2_H*</u>	0

^a: Las subunidades purificadas fueron BTAI-CMa1 (a-1), -CMb1 (b-1), -CMb2 (b-2), CMd1 (d-1) y las formas glicosiladas CMb1* (b-1*) y CMb2* (b-2*). Las proteínas aisladas de los cultivares Bomi y Hatif de Grignon, han sido designadas con B y H respectivamente y se han subrayado las subunidades substituidas en el tetrámero. Los experimentos se realizaron utilizando 1 μ g de inhibidor (mezcla indicada) por ensayo.

^b: Los ensayos se realizaron con 1 unidad de α -amilasa como se describe en el apartado II.2.3.6.1. Los valores son media de tres repeticiones. El error estándar fue inferior al 10% de inhibición en todos los casos.

III.7. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA CMe

Un 60% de los genotipos de cebada analizados en el presente trabajo (incluyendo el cultivar Bomi) presenta un inhibidor de tripsina denominado genéricamente BTI-CMe1. Además un 20% de los genotipos (entre ellos Hatif de Grignon) presentan un par de variantes genéticas de este inhibidor que se heredan conjuntamente, denominadas con anterioridad CMe2-2' (Salcedo et al., 1984) y en el presente trabajo CMe2.1 y CMe2.2. También se ha detectado en un 18% otro par de posibles variantes genéticas de BTI-CMe1, denominadas BTI-CMe3.1 y -CMe3.2, que siempre aparecen juntas en los mapas de electroforesis bidimensional.

Los mapas bidimensionales de extractos de harina de los cultivares Bomi, Hatif de Grignon y Valticky, mostrando la posición de las variantes de CMe, se recogen en la Figura III.32. Una posible variante adicional fue detectada en los extractos de Hatif de Grignon (designada como 2.3 en la Figura III.32.B).

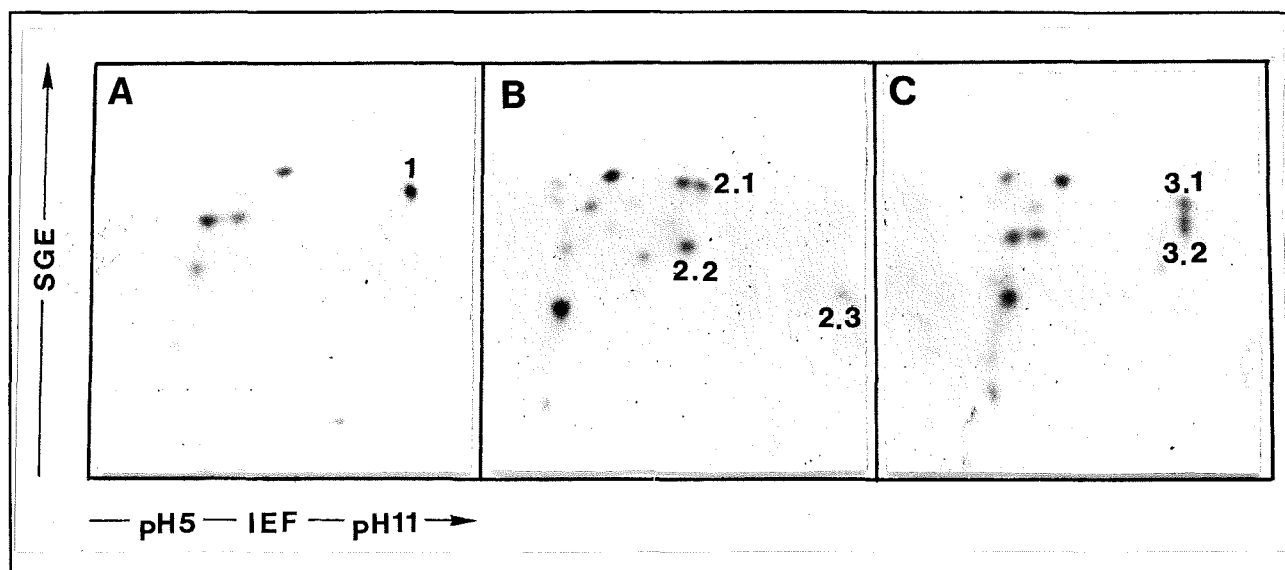


Figura III.32. Mapa bidimensional (IEF x SGE) del extracto etanol de harina de los cultivares Bomi (A), Hatif de Grignon (B) y Valticky (C). Se indica la posición de las variantes genéticas de BTI-CMe.

III.7.1. OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN INHIBIDORES DE TRIPSINA.

Para obtener una preparación de proteínas enriquecidas en las variantes de BTI-CMe de los cultivares Hatif de Grignon y Valticky, se realizó una extracción con 0.15 M ClNa de harina de ambos cultivares y posterior precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La siguiente etapa fue fraccionar las preparaciones crudas de inhibidores, mediante cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100. Los perfiles de elución obtenidos para ambos cultivares aparecen en las Figuras III.26 y III.33.

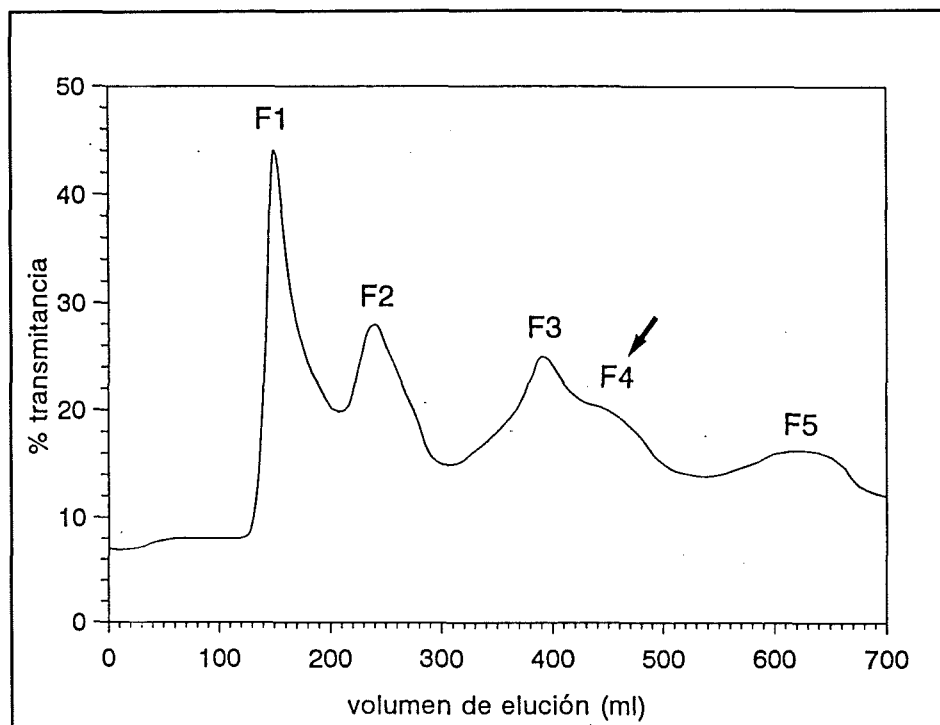


Figura III.33. Filtración molecular en Sephadex G-100 (condiciones no disociantes) de la preparación de inhibidores del cultivar Valticky. La flecha señala el pico de elución de los inhibidores monoméricos.

Una vez fraccionado el extracto C1Na, se comprobó la actividad inhibitoria frente a tripsina de cada una de las fracciones obtenidas. En los dos casos, la máxima actividad anti-tripsina esta asociada a las fracciones correspondientes al pico F4, que incluye inhibidores monoméricos con tamaños moleculares de aproximadamente 13 kDa (Tabla III.20).

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.

Fracciones ^a	Inhibición (%) ^b			
	Hatif de Grignon		Valticky	
	5 µg	10µg	5 µg	10µg
F2	0	0	0	0
F3	19	30	2	6
F4	58	78	3	64

^a Fracciones resultantes de la filtración molecular del extracto crudo de inhibidores. F2, tetaméricos; F3, diméricos; F4, monoméricos. F1 y F5 no se ensayaron por carecer de componentes de la familia de inhibidores en sus mapas bidimensionales.

^b Los valores son media de dos repeticiones.

^c Microgramos de proteína por ensayo.

III.7.2. AISLAMIENTO DE LAS VARIANTES BTI-CMe2.1, - CMe2.2 Y -CMe2.3.

El mapa bidimensional de la preparación de inhibidores monoméricos (F4 de la Figura III.24) del cultivar Hatif de Grignon, aparece en la Figura III.34.

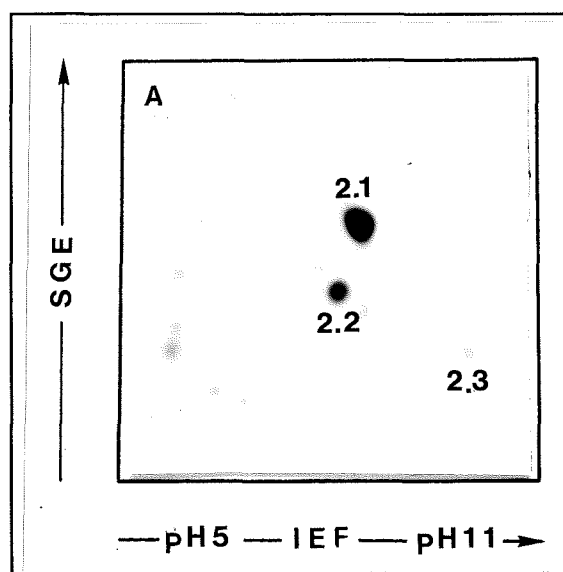


Figura III.34. Mapa bidimensional (IEF x SGE) de la preparación de inhibidores monoméricos del cultivar Hatif de Grignon.

La preparación de inhibidores monoméricos de Hatif de Grignon se fraccionó por RP-HPLC, y el perfil resultante se presenta en la Figura III.35. Como puede observarse, BTI-CMe2.1 se pudo recoger en un solo pico mientras que BTI-CMe2.2 co-eluía junto con un componente adicional (BTI-CMe2.3) que presentaba un punto isoeléctrico más básico en electroforesis bidimensional (Fig III.34) y un menor peso molecular en SDS-PAGE (aproximadamente 1400 Da, Fig III.36). La separación completa de estas dos proteínas utilizando diferentes columnas en RP-HPLC (Nucleosil C4, Ultrapore 300-5 C3) y diferentes gradientes (acetonitrilo/H₂O, isopropanol/H₂O), no se llegó a conseguir. Sin embargo, se obtuvieron preparaciones altamente enriquecidas en cada uno de los dos componentes, recogiendo por separado las dos mitades del pico indicadas en la Figura III.35, correspondientes a BTI-CMe2.2 y BTI-CMe2.3 (ver Fig. III.36, muestras 2.2 y 2.3).

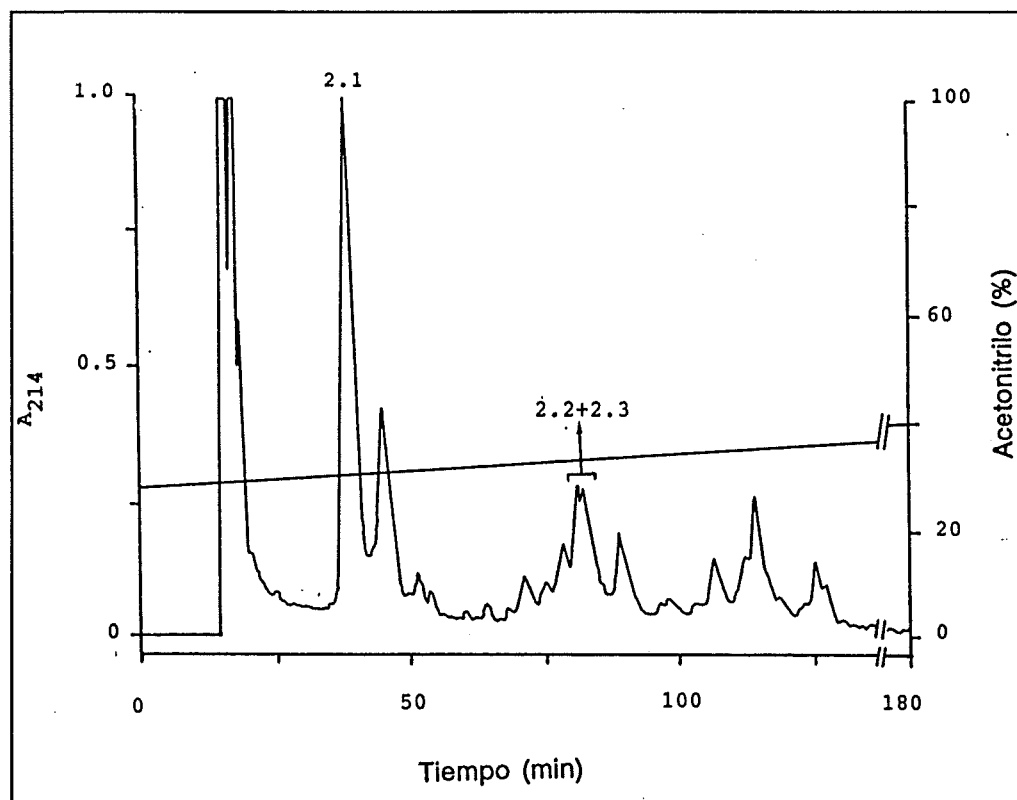
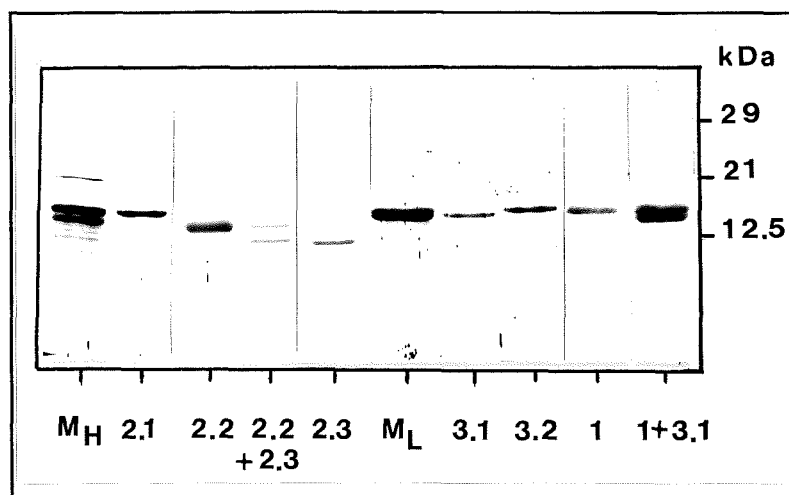


Figura III.35. Fraccionamiento mediante RP-HPLC de la fracción de filtración molecular correspondiente a inhibidores monoméricos (F4) del cultivar Hatif de Grignon.

Figura III.36. SDS-PAGE de las siguientes muestras: fracción de inhibidores monoméricos del cultivar Hatif de Grignon (M_H), BTI-CMe2.1 (2.1), BTI-CMe2.2 (2.2), BTI-CMe2.2 + CMe2.3 (2.2+2.3), BTI-CMe2.3 (2.3), fracción de inhibidores monoméricos del cultivar Valticky (M_V), BTI-CMe3.1 (3.1), BTI 3.2 (3.2), BTI-CMe1 (1) y BTI-CMe1 + CMe3.1. (1+3.1)

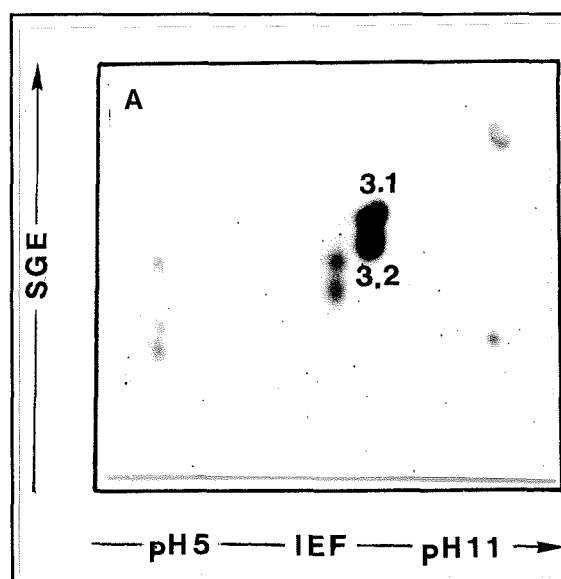


III.7.3. AISLAMIENTO DE LAS VARIANTES BTI-CMe3.1 Y -CMe3.2

Un método similar al utilizado en el caso del cultivar Hatif de Grignon se siguió para purificar las variantes BTI-CMe3.1 y -CMe3.2 del cultivar Valticky. Dichas variantes son los componentes mayoritarios de la fracción de filtración molecular correspondiente a inhibidores monoméricos (F4 de la Fig.III.33), como puede apreciarse en la Figura III.37.

BTAI-CMe3.1 y BTI-CMe3.2 se aislaron por RP-HPLC preparativo a partir de dicha fracción (Fig. III.38). La homogeneidad de las dos proteínas aisladas se comprobó por SDS-PAGE (Fig.III.36) y electroforesis bidimensional (datos no mostrados).

Figura III.37. Mapa bidimensional (IEF x SGE) de la fracción de inhibidores monoméricos (F4) del cultivar Valticky.



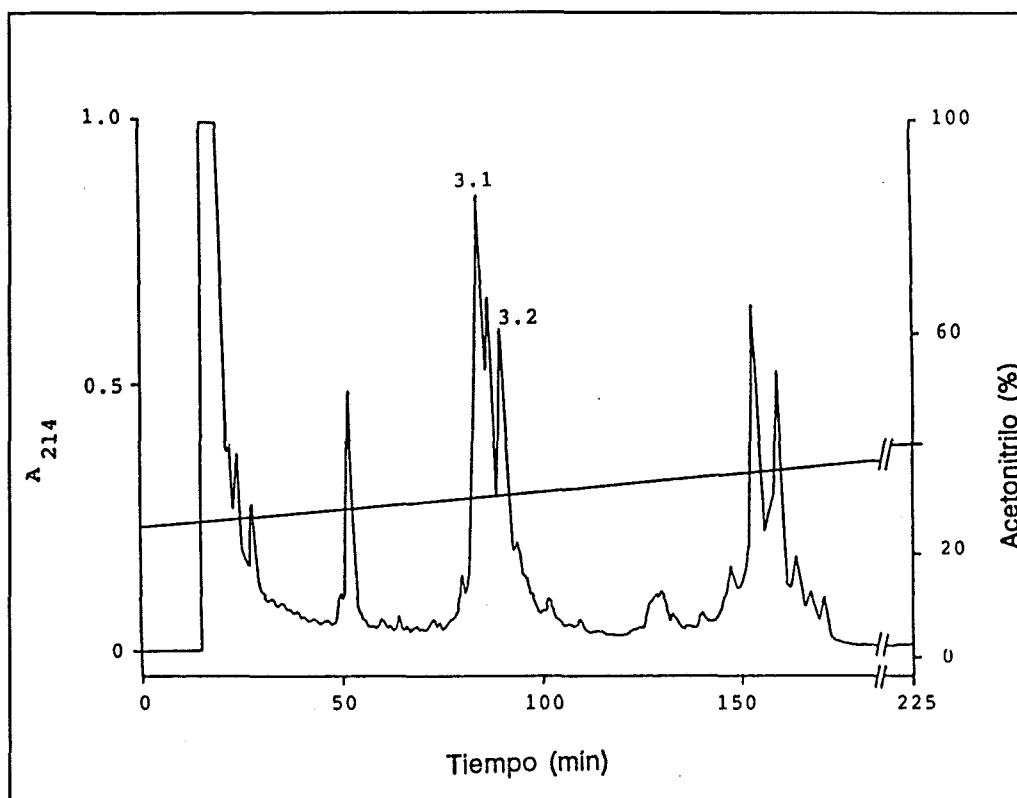


Figura III.38. Fraccionamiento mediante RF-HPLC de la fracción de filtración molecular correspondiente a inhibidores monoméricos (F4) del cultivar Valticky

III.7.4. SECUENCIAS NH₂-TERMINALES DE LAS VARIANTES PURIFICADAS.

Las secuencias NH₂-terminales de las cinco variantes de BTI-CMe aisladas, se presentan en la Figura III.39. La secuencia previamente publicada de BTI-CMe1 del cultivar Bomi (Odani et al., 1983b; Lázaro et al., 1985) se incluye como referencia.

Las tres variantes purificadas del cultivar Hatif de Grignon, no mostraron heterogeneidad en ninguno de los residuos secuenciados, excepto en la posición 15 (Q/P) de BTI-CMe2.3. Las tres proteínas mostraron diferencias en sus secuencias NH₂-terminales con respecto a BTI-CMe1. Sin embargo, los datos obtenidos, junto a los presentados en la Figura

III.36, son compatibles con que BTI-CMe2.3 sea una forma modificada de BTI-CMe2.2, por pérdida de un péptido del extremo C-terminal.

PROTEÍNA	SECUENCIA																							
	1	5	10	15	20																			
CMe1	F	G	D	S	C	A	P	G	D	A	L	P	H	N	P	L	R	A	C	R	T	Y	V	V
CMe2.1	F	G	D	M	C	A	P	G	D	E	L	P	H	N	P									
CMe2.2	F	G	D	M	C	A	P	G	D	A	L	P												
CMe2.3	F	G	D	M	C	A	P	G	D	A	L	P	H	N	Q	L	R	A						
CMe3.1	F	G	D	S	C	A	P	G	D	A	L	P	H	N	P	L	R	A						
CMe3.2	F	G	D	S	C	A	P	G	D	A	L	P	H	N	Q	L	R	A	C	R	T	Y	V	V

Figura III.39. Alineamiento de las secuencias NH₂ terminales de las proteínas BTI-CMe1, -CMe2.1, -CMe2.2, -CMe2.3, -CMe3.1 y -CMe3.2. La secuencia de BTI-CMe1 se incluye como referencia (Odani et al. 1983; Lázaro et al. 1985)

Por lo que respecta a las variantes del cultivar Valticky (en las que no se detecta heterogeneidad en ninguno de los residuos secuenciados), BTI-CMe3.2 tiene una secuencia distinta a la de cualquiera de las otras variantes estudiadas. Un caso distinto es el de BTI-CMe3.1 que presenta los primeros 18 residuos idénticos a los de BTI-CMe1. Este dato, junto con el solapamiento de ambos componentes en los mapas bidimensionales, puede inducir a pensar que se trata de la misma proteína en ambos casos. Sin embargo, ambas variantes difieren tanto en su tamaño molecular cuando se analizan por SDS-PAGE (aproximadamente 700 Da; Figura III.36), como en su capacidad inhibitoria (ver siguiente epígrafe).

III. 7.5. ACTIVIDAD INHIBITORIA FRENTE A TRIPSINA DE LAS VARIANTES DE BTI-CMe PURIFICADAS.

La inhibición de tripsina (de páncreas bovino) por las variantes de BTI-CMe aisladas de los cultivares Bomi, Hatif de Grignon y Valticky, está resumida en la Tabla III.21

Tabla III.21. Actividad inhibitoria frente a tripsina de las variantes de BTI-CMe purificadas.

Variantes*	Inhibición (%)**		
	#1 μ g	3 μ g	5 μ g
CMe1	18,0 ^b	45.1 ^b	81.3 ^{a,b}
CMe2.1	18,6 ^b	50.3 ^b	74.4 ^b
CMe2.2 + CMe2.3	6,7 ^c	19.5 ^c	28.7 ^c
CMe2.2	8,0 ^c	15.0 ^c	41.0 ^c
CMe2.3	8,5 ^c	18.5 ^a	43.0 ^c
CMe3.1	28,8 ^a	68.6 ^a	92.3 ^a
CMe3.2	23,0 ^{a,b}	67.0 ^a	92.7 ^a

* CMe2.2 + CMe2.3: mezcla de ambos componentes recogidos en el pico correspondiente de la Figura III.34.

** Los valores son medias de n=6, excepto para CMe2.2 y CMe2.3 (n=2). Medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren significativamente para $p=0,05$.

#: μ g de inhibidor / ensayo.

Todas las proteínas purificadas presentan actividad inhibitoria, mostrando mayores niveles de inhibición cuando se incrementa la cantidad de las mismas en el ensayo. Las variantes genéticas de BTI-CMe, se pueden agrupar en tres clases de acuerdo con su actividad antitripsina, en orden decreciente:

1. BTI-CMe3.1 / BTI-CMe3.2
2. BTI-CMe1 / BTI-CMe2.1
3. BTI-CMe2.2 / BTI-CMe2.3

Cabe resaltar el hecho de que las dos variantes del cultivar Valticky presentan niveles de inhibición superiores incluso a los presentados por BTI-CMe1.

IV. DISCUSIÓN

IV.1. EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS

IV.1.1. CICLO Y DESARROLLO DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS

El n° de hojas en el tallo principal y el filocrono (°C días/hoja), son factores determinantes de la fenología y, como consecuencia, del rendimiento final en la cosecha de los cereales. En concreto, estos factores influyen directamente sobre la fecha de antesis y, por tanto, sobre el llenado y la maduración del grano (Ludlow y Muchow, 1988).

En nuestro caso, el material autóctono en estudio, presenta un filocrono que se distribuye normalmente (Figura III.1.A), donde la media de los genotipos autóctonos tiene un comportamiento similar al del testigo Plaisant. En cuanto al n° de hojas, también existe variabilidad genotípica, aunque relativamente menor, y se observa una compensación con el filocrono (Figura III.1.B) de manera que aquellos genotipos con mayor n° de hojas son los que presentan menor filocrono.

Respecto a la fecha de antesis, los datos indican que, en general, los genotipos autóctonos presentan fechas de antesis más tardías que los testigos, aunque también existe variabilidad para genotipos tempranos.

IV.1.2. RENDIMIENTO

El rendimiento (kg/ha) se determinó en el año 1992, en condiciones de secano en las localidades de Gimènells, Bell.Lloc (Lleida) y Zamadueñas (Valladolid), con el fin de comparar el comportamiento diferencial de los genotipos.

Los valores del rendimiento medio obtenido para cada una de las localidades, se indican en la Tabla III.3. y la distribución del rendimiento medio del material autóctono

frente a los testigos, aparece en la Figura III.2. Como se observa, la distribución de los materiales autóctonos es una distribución normal donde existe una elevada variabilidad genotípica. El análisis de la varianza para el rendimiento, indica que existen diferencias significativas entre localidades y entre genotipos (Tabla III.2). Gimennells fue la localidad donde se alcanzaron los rendimientos más elevados, seguida de Bell.Lloc y Zamadueñas. El año 1992 fue particularmente seco en Castilla-León, por lo que el ensayo en la localidad de Zamadueñas sufrió un déficit hídrico muy acusado. En las localidades de Lleida, no hubieron incidencias señalables, siendo más productiva la localidad de Gimennells que la de Bell.Lloc.

Hay que señalar que los resultados obtenidos para el rendimiento, son en general bajos ya que se trata de genotipos poco adaptados a las condiciones actuales de cultivo, con unas características de morfología y desarrollo muy diferentes a las presentadas por las variedades comerciales utilizadas como testigos. En este sentido, los testigos fueron los genotipos con rendimientos más elevados, aunque también existen genotipos autóctonos con rendimientos similares e incluso superiores a algunos de éstos (288L, LCC-63, AD-182 y LCC-64).

Cabe destacar que el genotipo 288L presentó de forma constante un rendimiento relativamente elevado en las tres localidades, igual que el testigo Zaida. El resto de genotipos rindió de forma diferente en función de la localidad.

IV.1.3. COMPONENTES DE RENDIMIENTO E INDICE DE COSECHA

Los componentes del rendimiento se han determinado en las localidades de Gimennells y Bell.Lloc. El n° de espigas/m², n° de granos por espiga y el peso de 1000 granos, son caracteres para los cuales aparentemente no existe variabilidad entre los genotipos autóctonos evaluados, aunque sí existen diferencias entre localidades (Tabla III.4).

El comportamiento del material autóctono con respecto a los testigos indica que, en

general, presentan pesos de 1000 granos menores (Figura III.5), posiblemente debido a que se trata mayoritariamente de genotipos tardíos y muy sensibles al encamado, ya que éste parámetro se encuentra altamente influenciado por las condiciones ambientales (Hay y Walker, 1989). Asimismo se observa una menor tendencia al ahijamiento y menor n° de espigas/m². Por el contrario, el n° de granos/espiga es más parecido al de los testigos (Figura III.4). El hecho de que los componentes del rendimiento se determinen de forma secuencial a lo largo del desarrollo, proporciona al cultivo la capacidad de compensar efectos adversos que ocurran sobre los primeros componentes del rendimiento, mediante la elevación de los siguientes, logrando equilibrar la cosecha bajo una gran diversidad de ambientes y circunstancias (García del Moral y Ramos, 1989). En nuestro caso, se puede apreciar claramente la existencia de mecanismos de compensación, especialmente entre el n° de espigas por unidad de superficie y el n° de granos por espiga, a nivel de las medias de cada ensayo (Tabla III.5.).

Respecto al índice de cosecha, no se ha observado variabilidad entre genotipos ni entre localidades (Tabla III.4.). Los modernos genotipos de cebada, se caracterizan por presentar un mayor índice de cosecha que sus predecesores, adquirido principalmente por un acortamiento de la caña, aunque sin modificación de la biomasa total (Austin et al., 1989; Romagosa y Araus, 1991). En nuestro caso, los valores más elevados los presentan los testigos Cameo y Alexis (Figura III.6.), y los genotipos autóctonos presentan valores generalmente inferiores debido a su mayor porte y peso de la paja.

IV.1.4. VARIABILIDAD GENOTÍPICA PARA EL RENDIMIENTO Y SUS COMPONENTES

Los datos obtenidos sobre la heredabilidad en sentido amplio, del rendimiento y sus componentes en el conjunto de genotipos autóctonos, se detallan en la Tabla III.6.

Sorprendentemente, se han obtenido valores extremadamente bajos para todos los

caracteres. Otros autores, han publicado valores más elevados, incluso determinando la heredabilidad en sentido estricto (Rasmusson et al., 1987). Estos resultados posiblemente sean debidos a un valor muy elevado de la interacción genotipo x ambiente. Por otra parte, para las condiciones de ensayo utilizadas, existe una elevada variabilidad ambiental que puede enmascarar la variabilidad genética, obteniéndose, por tanto, una baja heredabilidad de las variables estimadas (Tabla III.6).

Desde un punto de vista agronómico, el objetivo final de cualquier programa de mejora genética es la obtención de variedades mejoradas, generalmente mediante el incremento del rendimiento en diferentes condiciones. La primera etapa para iniciar estos programas es disponer de recursos genéticos necesarios para la creación de variabilidad. En este sentido, existen tres niveles de germoplasma disponibles para cruzamientos : variedades de elevado potencial productivo y de baja adaptabilidad, ecotipos locales de bajo potencial productivo y altos niveles de adaptación a zonas específicas y ,finalmente, se puede utilizar germoplasma exótico del tipo de materiales silvestres, botanicamente próximos a los cultivados. Como era de esperar, en nuestro caso los genotipos autóctonos han presentado bajos rendimientos, aunque se podrían destacar algunos tales como **288L**, **LCC-63**, **AD-182** y **LCC-64**, con productividades superiores a algunos de los testigos. Sería de interés hacer un seguimiento de estos genotipos quizá susceptibles a incluirse en futuros programas de mejora como fuente de variabilidad genética.

En este trabajo, se ha centrado el estudio agronómico en caracteres directamente relacionados con el rendimiento. Sin embargo, sería conveniente completar estas medidas con otras de índole más fisiológico o fitopatológico, que pueda permitir identificar genotipos para su uso como parentales con expresiones fenotípicas adecuadas para la adaptación a condiciones ambientales específicas tales como sequía, salinidad, altas temperaturas, plagas y otras (Clarke y Romagosa, 1991; Romagosa et al., 1993; Romagosa y Fox, 1993; Nicks et al., 1993).

IV.2. CALIDAD MALTERA DE LOS GENOTIPOS AUTÓCTONOS

Las cebadas de dos carreras han sido utilizadas ampliamente para la fabricación de cerveza, debido a las óptimas propiedades físicas y químicas que presenta la estructura de sus granos. En el presente trabajo, se ha evaluado la calidad maltera de los genotipos autóctonos en estudio y se ha comparado con variedades comerciales de elevada calidad, con objeto de poder encontrar genotipos potencialmente utilizables por la industria en cuestión.

Los parámetros físico-químicos empleados para determinar la calidad maltera de los genotipos, se detallan en el apartado II.2.2.3. Los resultados obtenidos durante los años 1991 y 1992, se muestran en la Tabla III.3

IV.2.1. PROTEÍNA TOTAL Y PROTEÍNA SOLUBLE

El contenido de proteína total del grano es un parámetro ampliamente utilizado para evaluar la calidad maltera de la cebada. Un elevado contenido de proteína, dificulta la hidratación óptima en el proceso de germinación del grano y, por tanto, disminuye la calidad de la malta.

La distribución de los valores medios de proteína total de los genotipos en estudio (años 91 y 92), se muestran en la Tabla III.3.1. Se observa que no hubo diferencias significativas entre los genotipos, ya que todos presentaron niveles de proteína muy elevados (incluyendo testigos), por encima del valor de referencia (11,5%; Molina-Cano et al., 1987). Únicamente Alexis presentó un contenido en proteína total inferior a este valor, aunque esta variedad sólo se empleó como testigo durante el año 92, en el cual las condiciones ambientales propiciaron un menor contenido protéico.

El contenido en proteínas del grano es un valor fuertemente influenciado por las condiciones ambientales durante el ahijamiento y el llenado del grano (Home, 1992). En el presente trabajo se han evaluado genotipos autóctonos muy antiguos que se encaman fácilmente, proceso que determina una alteración en la estructura del grano, con un posible aumento en la cantidad de proteína total, en detrimento de la de almidón. Por otra parte, condiciones ambientales adversas tales como un excesivo abono nitrogenado del ensayo en campo, puede haber determinado valores superiores a los normales, a partir de los cuales los resultados de calidad maltero-cervecera pueden considerarse erráticos (Molina-Cano, 1989).

Con respecto a la proteína soluble en el mosto, tampoco se han observado diferencias significativas entre genotipos ya que está directamente correlacionada con el contenido de proteína total y depende, en gran medida, de la actividad proteolítica desarrollada en el grano durante el proceso de la germinación.

IV.2.2. RENDIMIENTO DEL EXTRACTO

El rendimiento del extracto es el volumen de mosto obtenido por kilo de malta y está correlacionado negativamente con el porcentaje de proteína total y de glumillas del grano y positivamente con el contenido de almidón del mismo (Molina-Cano et al., 1989).

La distribución de los valores medios obtenidos para éste parámetro durante los años 91 y 92, se muestra en la Figura III.11, siendo el valor de referencia del índice de calidad Q, de 79,87% (Molina-Cano et al., 1987). Como puede observarse, los testigos Alexis y Zaida, son los que presentan mayor rendimiento en extracto, aunque existen genotipos autóctonos con valores superiores a los testigos Beka y Plaisant de conocida calidad cervecera. Cabe destacar el genotipo **AD-122**, con un valor medio de 78,5%. Este genotipo presentó el valor más elevado del extracto en el año 91, incluso por encima de los testigos. Asimismo destacarían los genotipos **AD-21** y **201L**, que en el año 1992 presentaron valores de extracto elevados, superiores a los de Beka.

IV.2.3. INDICE KOLBACH

El índice de Kolbach determina la relación porcentual entre el nitrógeno total de la malta y el nitrógeno del mosto (proteína total en relación a la proteína soluble). Teniendo en cuenta que el valor de referencia es de 39,58 (Molina-Cano et al., 1987), existen genotipos autóctonos con índices próximos a este valor, tales como **AD-122**, **AD-21** y **LCC-63**.

El índice Kolbach, como parámetro derivado que es, debe referirse en relación al nivel máximo de proteína admisible en la práctica, que no debería superar el 11,5%. Un simple incremento del índice, no sería una medida de calidad "per se". Los valores obtenidos en nuestro caso son, en general, bajos debido por un lado al elevado contenido de proteína total y por otro a una baja actividad proteolítica durante el proceso de la germinación.

IV.2.4. ATENUACIÓN LÍMITE

La atenuación límite indica la fermentabilidad potencial de un mosto. Una malta será de buena calidad cuanto mayor sea su fermentabilidad y con la cantidad de aminoácidos en solución suficientes para un desarrollo óptimo de las levaduras.

La distribución de los valores medios de la atenuación de los genotipos estudiados aparece en la Figura III.13. Como puede observarse, existe diferencia significativa entre los genotipos, correspondiendo los valores mayores a los testigos Alexis y Beka (el valor de referencia es 79,8%; Molina-Cano et al., 1987). También existen genotipos autóctonos con valores superiores a testigos de alta calidad maltera como Zaida y Plaisant. Hay que destacar nuevamente el genotipo **AD-122**, con un valor inmediatamente inferior al de Beka, de 81,5%.