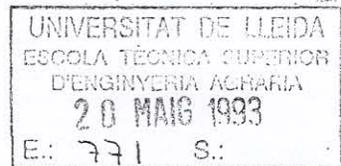


(043) "1993" Mor



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

IV.2.5. β -GLUCANOS Y VISCOSIDAD

Desde un punto de vista estrictamente cualitativo, una malta debe tener bajo contenido en β -glucanos para que la viscosidad del mosto sea baja, facilitando su filtración, y para que aumente el extracto (Bamforth, 1982; Wainwright, 1990).

El contenido de β -Glucanos de los genotipos en estudio, sólo se determinó en el año 1992. La distribución de los valores medios obtenidos, se representa en la Figura III.16. Se observa que existen diferencias significativas entre genotipos, correspondiendo los valores inferiores a diferentes genotipos autóctonos. El testigo con menor contenido en β -glucanos fue Beka (3,11 %).

En cuanto a la viscosidad, es un parámetro que depende tanto del contenido de β -glucanos del mosto, como del contenido en proteína soluble, responsable de la formación de compuestos de estructura gelatinosa (Van den Berg et al., 1981; Smith y Lister, 1983). También una degradación incompleta del almidón conlleva la presencia en el mosto de dextrinas (ver Figura I.1), azúcares insolubles que contribuyen a la viscosidad del mosto.

La distribución de los valores medios de viscosidad de los genotipos autóctonos y testigos, se muestra en la Figura III.14, siendo el valor de referencia de 1,6 c.p. (Molina-Cano et al., 1987). El valor menor de viscosidad corresponde al testigo Alexis (1,4), seguido del genotipo LCC-63 y Beka. Los testigos Zaida y Plaisant, han presentado valores superiores al valor de referencia, existiendo múltiples genotipos autóctonos con valores inferiores. El genotipo AD-122, presentó un valor inferior al límite, de 1,5 c.p.

IV.2.6. INDICE Q DE CALIDAD CERVECERA

El índice Q, determinado por el Comité de Cebada y Malta de la EBC (European Brewery Convention), se utiliza para evaluar la calidad cervecera de las cebadas, y se

determina a través de algunos de los parámetros analíticos anteriormente mencionados (rendimiento del extracto, índice Kolbach, atenuación límite y viscosidad). Este índice estima el valor de calidad de una variedad determinada, con cifras comprendidas entre 1 y 9. Cebadas con índices Q entre 5 y 7, se consideran de calidad cervecera moderada y entre 7 y 9 de alta calidad.

La distribución de los valores del Índice Q obtenidos para los genotipos y testigos estudiados, se representa en la Figura III.15. Como puede observarse, existen diferencias significativas entre variedades y solamente el testigo Alexis presentó un valor de 7,24, quedando el resto de genotipos por debajo de 5 (incluidos testigos). Si bien los valores absolutos obtenidos del índice Q y sus componentes (Tabla III.8) son muy poco favorables, estos valores sirven para poder establecer comparaciones relativas entre variedades.

El proceso del malteado se basa, fundamentalmente, en producir los enzimas hidrolíticos óptimos para modificar la estructura del endospermo y liberar los carbohidratos de los gránulos de almidón contenidos en el interior de la matriz protéica. Los bajos valores del índice de calidad obtenidos, podrían ser el reflejo del elevado contenido en proteína total, presentado por el conjunto de genotipos. Estos valores influyen negativamente en el resto de los parámetros que determinan el índice de calidad, distorsionando los resultados.

La constitución morfológica del grano, es un parámetro de suma importancia en la determinación de la calidad maltera (Palmer, 1976). Un grano con un endospermo compacto, donde las proteínas y el almidón se encuentran fuertemente empaquetadas, puede retardar la acción de los enzimas glucanolíticos, proteolíticos y amilolíticos, causando determinadas modificaciones que disminuirán el rendimiento del extracto (Palmer y Bathgate, 1983; Mac Gregor et al., 1992). Asimismo, la cantidad de proteínas solubles que pasan al mosto será menor, con lo que también disminuirán los valores de la atenuación límite. Por otra parte elevados porcentajes de proteína en el grano, implican un aumento en la viscosidad, con la formación de estructuras gelatinosas en el mosto (Van den Berg et al., 1981; Smith y Lister, 1983).

IV.2.7. VARIABILIDAD GENOTÍPICA PARA LOS PARÁMETROS DE CALIDAD MALTERA.

La calidad maltera de los genotipos es difícil de predecir, puesto que la influencia de la interacción genotipo x ambiente puede ser variable (Hockett y Nilan, 1985). Para un mejorador, es esencial minimizar los efectos medioambientales y seleccionar de acuerdo a los parámetros más estables (Molina-Cano et al., 1991). En este sentido, se ha determinado la heredabilidad de los parámetros analíticos estudiados y los resultados se muestran en la Tabla III.16. Los valores obtenidos, son en general inferiores a los citados por otros autores (Molina-Cano, 1987). Los valores de la heredabilidad de la proteína total son extremadamente bajos y se atribuyen a una elevada variabilidad ambiental. En el resto de parámetros se observan valores superiores, que indican la existencia de variabilidad genética entre los genotipos autóctonos. Cabría señalar genotipos como **AD-122**, **AD-21** y **201L**, de bajo contenido en proteína (dentro de los valores extremadamente altos obtenidos) y elevado rendimiento en extracto, susceptibles a futuros seguimientos en programas de mejora para evaluaciones de calidad maltero-cervecera.

IV.3. ORIGEN DE LAS CEBADAS ESPAÑOLAS DE DOS CARRERAS

El origen de las cebadas cultivadas (*Hordeum vulgare* L.) es un tema discutido por múltiples autores con diferentes puntos de vista. La teoría más ampliamente aceptada, hasta el momento, sostiene que la cebada es un cultivo monocentrico, con un único centro de origen en el Creciente Fértil, donde tuvo lugar la domesticación a partir de *H.spontaneum* C. Koch en la era Neolítica (Harlan, 1992).

Sin embargo, el descubrimiento de *H.spontaneum* en Marruecos (Molina-Cano y Conde, 1980; Molina-Cano et al., 1982) y en China (Xu, 1982) amplió considerablemente los límites de distribución de *H.spontaneum*, llevando a postularse la hipótesis de considerar

a Marruecos como un posible centro de origen de las cebadas cultivadas (Molina-Cano et al., 1987). Este estudio confirmó trabajos realizados previamente (Wiebe, 1968), donde se sugería un posible origen marroquí de las cebadas españolas de seis carreras.

En el presente trabajo, se ha realizado un estudio sobre la filogenia de las cebadas españolas de dos carreras, basado en una caracterización morfológica y bioquímica (hordeínas y proteínas CM) de un conjunto de accesiones antiguas de origen español de dos carreras, y diferentes cultivares de cebada europeos para su posterior comparación. Asimismo, se han tenido en cuenta 20 accesiones de *H.spontaneum* del Creciente Fértil y de diferentes zonas mediterráneas, caracterizadas previamente en otros trabajos (Molina-Cano et al., 1987).

IV.3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ACCESIONES DE CEBADA.

La caracterización morfológica de cultivares de cebadas españolas, ha sido realizada extensamente por diversos autores (Alvarez-Peña, 1952; Villena, 1955; Molina-Cano, 1977a) aunque no se ha utilizado con fines filogenéticos.

Los caracteres morfológicos que se han tenido en cuenta para la descripción del material estudiado, se detallan el apartado II.2.1.3 y, en función de los fenotipos observados para el conjunto de caracteres morfológicos, se realizó una agrupación de las accesiones de cebada consideradas en el presente trabajo (Figura III.8).

Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias morfológicas entre las cebadas españolas y las europeas. El dendrograma de la Figura III.8, muestra múltiples agrupaciones, con orígenes geográficos heterogéneos. Este resultado contrasta con los obtenidos por Molina-Cano et al.(1977a), donde un grupo de cebadas españolas estudiadas, presentaban claras diferencias morfológicas con las cebadas europeas tomadas como referencia. No obstante, se trataba de un grupo reducido de cebadas españolas, quizá no

representativo del total de las mismas, ya que procedían de la misma área geográfica (provincia de Soria).

En resumen podría decirse que no existe relación entre los caracteres morfológicos de un genotipo determinado y la zona geográfica de donde procede.

IV.3.2. EVIDENCIAS BIOQUÍMICAS: HORDEÍNAS Y PROTEÍNAS CM

Las hordeínas (proteínas de reserva del endospermo de cebada), han sido utilizadas ampliamente en estudios de clasificación varietal (Shewry et al., 1978a, 1978b; Marchylo y Laberge, 1980, 1981; Jouve et al., 1990), por lo que se han considerado en el presente trabajo, para evaluar las accesiones de cebada españolas con fines filogenéticos. Asimismo, se han utilizado las proteínas CM, debido a la baja variabilidad intergenotípica que presentan (Salcedo et al., 1984; Molina-Cano et al., 1987).

IV.3.2.1. Hordeínas B y C

Los diferentes patrones de hordeínas B, C y D, obtenidos por SDS-PAGE para cada una de las accesiones de cebada analizadas, se muestran en la Tabla III.17. El dendrograma correspondiente a la agrupación de las hordeínas B y C aparece en la Figura III.20.

Como puede observarse, en el dendrograma aparecen múltiples agrupaciones donde destacan, por n° de accesiones y similitud de origen, los grupos o "clusters" 1,2,3 y 4. Estos grupos están constituidos principalmente por genotipos españoles, suponiendo un 73% del total de los mismos. Se observa, por tanto, una cierta homogeneidad en cuanto a hordeínas se refiere, para las cebadas españolas de dos carreras.

IV.3.2.2. Proteínas CM

La distribución geográfica de las variantes genéticas de las proteínas CM (Figura III.24), indica una clara diferencia entre las cebadas españolas (caracterizadas por la elevada frecuencia de aparición de las proteínas CMb-2 y CMe2.1-2.2) y las cebadas europeas.

En el dendrograma correspondiente a las proteínas CM (Figura III.23), también se observan grupos compuestos total o parcialmente por accesiones españolas. En todos los genotipos analizados, no se ha observado variabilidad para las proteínas CMA-1, CMC-1 y CMD-1 por lo que las variantes CMb y CMe son las que han determinado las diferentes agrupaciones.

Cabe destacar el "cluster" 2, donde la combinación de genes que presentan los 22 genotipos que lo componen (CMb-2, CMe-1), son de origen español, con la única excepción de un genotipo procedente de Turquía. La presencia de este genotipo podría deberse a una mutación puntual ocurrida en esta zona, ya que el resto de accesiones de Turquía presentan la variante CMb-1.

También hay que destacar el cluster 4 formado por 12 genotipos, todos españoles. Estos genotipos presentan una constitución genética (CMb-2, CMe2.1-2.2), que sólo ha sido detectada, hasta el momento, en accesiones de cebadas de seis carreras y de *H. spontaneum* procedentes de Marruecos, en el cultivar francés Hatif de Grignon (de posible origen marroquí) y derivados de éste, y en el cultivar Porthos (Molina-Cano et al., 1987).

Por tanto, podríamos considerar a los clusters 2 y 4, grupos de origen mediterráneo occidental. Un 75% de los genotipos españoles, quedan agrupados entre estos dos "clusters".

Los genotipos españoles que constituyen las agrupaciones obtenidas para las hordeínas B y C, no presentan ninguna correspondencia con los genotipos de los "clusters" 2 y 4 de las proteínas CM. Este hecho queda justificado por tratarse de proteínas que se heredan

independientemente, ya que los genes que codifican para las hordeínas B y C, están localizados en el cromosoma 5 (Kreis y Shewry, 1992) mientras que los genes de CMb y CMe se han mapeado en los cromosomas 4 y 3 respectivamente (Salcedo et al., 1984).

IV.3.3. IMPLICACIONES RELEVANTES EN EL ORIGEN DE LAS CEBADAS ESPAÑOLAS DE DOS CARRERAS.

La combinación de proteínas CMb-2, CMe-1 sólo ha sido detectada en cebadas cultivadas españolas (la única excepción la constituye el genotipo de Turquía, anteriormente mencionado). Por otra parte, no se conoce la existencia de ninguna accesión de *H. spontaneum* con este genotipo (Molina-Cano et al., 1987), lo que podría implicar la ocurrencia de una antigua domesticación *in situ* y una posterior desaparición del antecesor silvestre.

La similitud geográfica y climática entre Grecia (donde existen actualmente poblaciones de *H. spontaneum*) y España, podría sugerir la existencia de poblaciones antiguas de *H. spontaneum* en la Península Ibérica en tiempos Neolíticos. La desaparición de estas poblaciones podría haber ocurrido de forma similar a lo postulado por Hadjichristodoulou (1992) en Chipre donde los pastos naturales de la isla, fueron eliminados por el sucesivo pastoreo a través de los años. Un caso similar podría haber ocurrido en Siria (Molina-Cano, comunicación personal).

Estrabón, geógrafo e historiador griego, (año 23 d.d.C.), describió a Iberia en sus "Apuntes Geográficos", como una tierra completamente cubierta por bosques y montañas (Mangas, 1980). A su vez, diversos documentos históricos relatan que en la Edad Media, la Península Ibérica sufrió una fuerte deforestación para permitir el pastoreo de las ovejas de raza Merina, y el consiguiente desarrollo de la industria de la lana. Esta brusca perturbación ecológica, podría haber sido la causa de la desaparición de *H. spontaneum* de la Península Ibérica.

Por otra parte, la existencia de genotipos CMb-2, CMe2.1-2.2, en cebadas cultivadas de origen español, francés y marroquí, así como en *H.spontaneum* de Marruecos (Molina-Cano et al., 1987), podría deberse a la introducción en la Península Ibérica y Francia de cebadas previamente domesticadas en el Magreb. Alternativamente no puede descartarse la posible existencia en tiempos prehistóricos, de cebadas silvestres con este genotipo.

IV.3.4. EVIDENCIAS HISTÓRICAS

Diversos autores sostienen que todas las cebadas cultivadas han sido importadas del Creciente Fértil, posiblemente de la Península de Anatolia (Renfrew, 1989). Sin embargo, otros autores postulan la idea de una posible domesticación en Europa (Dennell, 1983; Barker, 1985) o en paralelo en regiones Mediterráneas como Grecia, donde se han encontrado restos de cebadas silvestres de la era Paleolítica (Hansen y Renfrew, 1978).

Las primeras invasiones históricas de la Península Ibérica por Fenicios y Griegos, datan del año 800 a.d.C.(Tuñón de Lara et al., 1980), aunque se han encontrado restos de cebadas cultivadas en dos cuevas de Alicante, cuyas fechas medidas con ^{14}C , datan de los años 4500 y 5590 a.d.C. (Buxó, comunicación personal). En este sentido, algunos investigadores postulan que el Neolítico no es exclusivo de la zona del Creciente Fértil. También existen evidencias del Neolítico en los países del Mediterráneo Occidental, aunque posiblemente debido a migraciones de poblaciones procedentes del Creciente Fértil (Tuñón de Lara et al., 1980). La penetración de la onda Neolítica se podría haber realizado a través de dos vías alternativas. La más importante sería siguiendo la costa del Mediterráneo y la segunda, a través de Europa central por la cuenca del Danubio (Tuñón de Lara et al., 1980) (Figura IV.1)

Iberia ha sido invadida diversas veces en tiempos históricos, por Griegos, Fenicios y poblaciones procedentes de Europa Central y del Este, que invadían la península a comienzos del siglo V (Sayas Abengoechea y García Moreno, 1980).

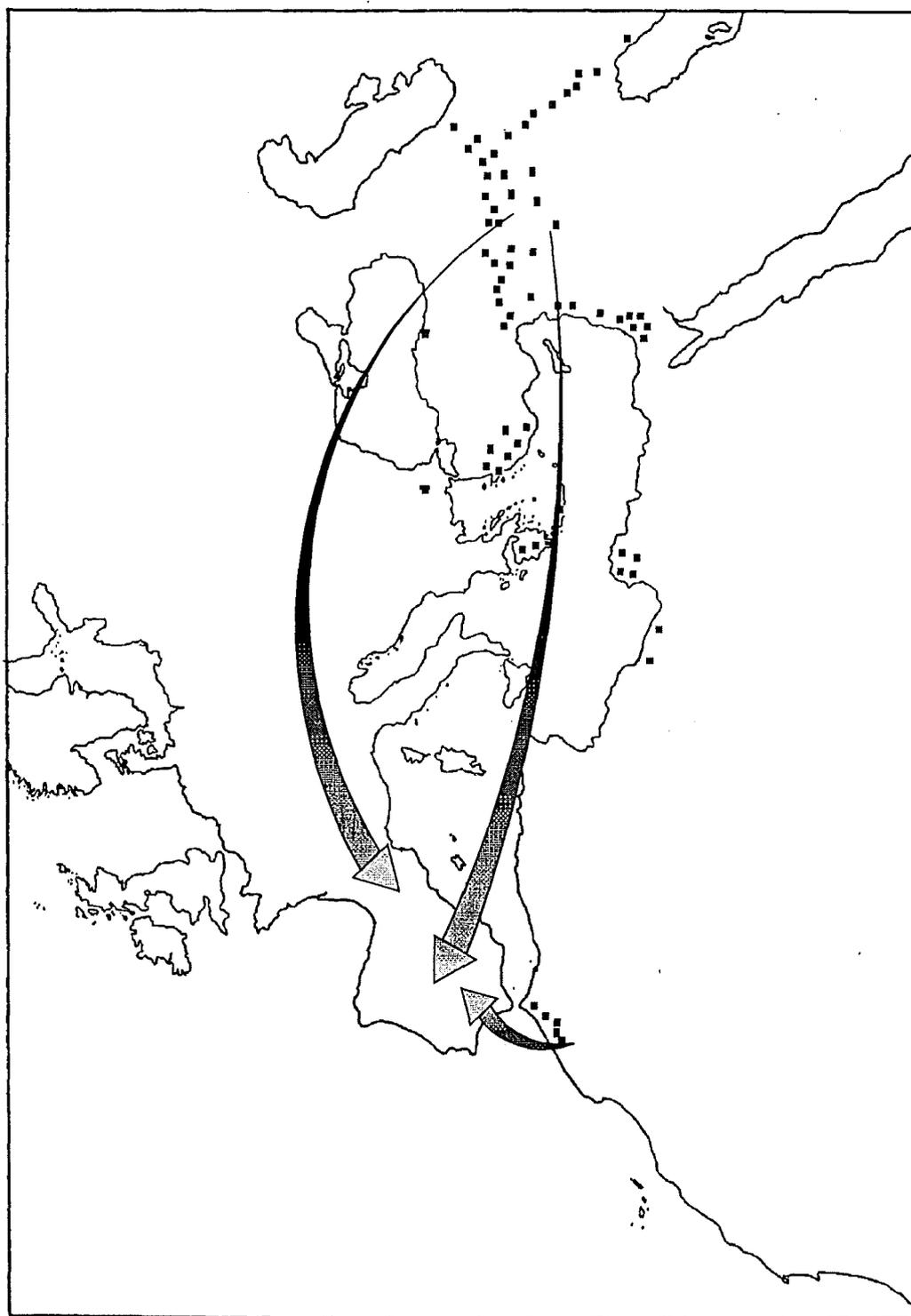


Figura IV.1. Distribución de *H. spontaneum* y posibles vías de introducción de *H. vulgare* en la Península Ibérica.

Además también fue invadida por los árabes que cruzaron el estrecho de Gibraltar desde Marruecos, a comienzos del siglo VIII (Arié, 1980). Todos estos invasores, podrían haber traído semillas de cebada de su lugar de procedencia.

Como resultado de las diferentes posibilidades resultantes de las evidencias históricas y genéticas aportadas en el presente trabajo, se podrían postular las siguientes hipótesis (Figura IV.1):

1. El origen de las cebadas españolas de dos carreras, puede explicarse mediante tres posibilidades complementarias, ordenadas por su relativa importancia:

- a) Domesticación *in situ*, a partir de un *H.spontaneum* ancestral, desaparecido en la actualidad.
- b) Procedente del Magreb, a través de las invasiones árabes ocurridas en el siglo VIII.
- c) A través del Mediterráneo oriental, en el Neolítico u otros tiempos históricos.

2. La cebada sería por tanto, un cultivo de origen multicentrico, domesticado a lo largo de la cuenca del Mediterráneo y quizá también en el Tíbet.

IV.4. CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE CMb-2

Como se ha visto en apartados anteriores, CMb-2 es una variante alélica de BTAI-CMb1, asociada a un origen geográfico determinado. Esta variante se ha detectado en un 77% de las accesiones de cebadas españolas analizadas, por lo que se ha considerado de interés su caracterización bioquímica y el estudio de su actividad inhibitoria.

La purificación de CMb-2 del cultivar Hatif de Grignon se ha llevado a cabo por RP-HPLC, partiendo de preparaciones de filtración molecular enriquecidas en inhibidores

tetraméricos (ver Figura III.27). La coincidencia en peso molecular (SDS-PAGE, Fig. III.29) y en 23 de los primeros aminoácidos NH₂-terminales (Fig. III.30) con BTAI-CMb-1, confirman el carácter de variantes alélicas de ambas proteínas, y complementa los datos genéticos previamente publicados (Salcedo et al., 1984).

IV.4.1. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA SUBUNIDAD BTAI-CMb2 *versus* BTAI-CMb1

La reconstitución *in vitro* del inhibidor tetramérico, se ha conseguido en el presente trabajo mezclando las subunidades purificadas, a partir de los cultivares Bomi (CMA1, CMb1 y CMd1) y Hatif de Grignon (CMA1, CMb2 y CMd1). Para obtener valores de inhibición óptimos, se ha asumido la estequiometría del tetrámero (1CMA: 1CMb: 2CMd) demostrada por otros autores (Gómez et al., 1989).

Los resultados de la actividad inhibitoria frente a α -amilasa de *Tenebrio molitor* de los tetrámeros reconstituidos, se muestran en la Tabla III.19. Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre las actividades inhibitorias de los tetrámeros de los cultivares Bomi y Hatif de Grignon, es decir, BTAI-CMb1 y BTAI-CMb2 actúan de forma similar en el tetrámero junto a las subunidades BTAI-CMA1 y BTAI-CMd1. Los elevados valores de actividad inhibitoria obtenidos para cada uno de los tetrámeros, frente a los publicados previamente (Sánchez-Monge et al., 1986) pueden explicarse por la estequiometría de las subunidades utilizadas. Asimismo, los ensayos de inhibición se realizaron inmediatamente después de purificar las proteínas por HPLC, evitando una posible inactivación.

IV.4.2. EFECTO DE LA GLICOSILACIÓN EN LA ACTIVIDAD DE BTAI-CMb1 Y BTAI-CMb2.

Sánchez-Monge et al. (1992) detectaron y aislaron una forma glicosilada de BTAI-CMb1, con alta capacidad para ligar IgE de pacientes alérgicos a la harina de cereales ("asma de panadero"). En el presente trabajo se ha purificado la forma glicosilada correspondiente a la variante alélica BTAI-CMb2 (ver Fig. III.29). No se han encontrado formas glicosiladas de las otras dos subunidades del tetrámero, BTAI-CMa1 y BTAI-CMd1. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los clones cDNA correspondientes a cada una de las subunidades del inhibidor tetramérico, BTAI-CMa1, BTAI-CMb1 y BTAI-CMd1, confirman estos resultados. Mientras que no existe ninguna señal de glicosilación en los clones cDNA de BTAI-CMa1 (Rasmussen et al., 1992) ni de BTAI-CMd1 (Halford et al., 1988), sí ha sido detectada esta señal en el clon cDNA de BTAI-CMb1 (NLT, residuos 100-102; Medina et al., 1993).

Como puede observarse en la Tabla III.19, cuando se sustituye la subunidad BTAI-CMb1 por su forma glicosilada (BTAI-CMb1*) en el inhibidor tetramérico del cultivar Bomi, no se aprecian cambios significativos en los niveles de inhibición. Asimismo, el componente glicosilado no puede sustituir a ninguna de las otras dos subunidades del tetrámero (BTAI-CMa1 y BTAI-CMd1), como queda reflejado en las drásticas disminuciones de los valores de inhibición cuando se producen estos cambios. Estos resultados se confirman en el cultivar Hatif de Grignon, cuando la subunidad BTAI-CMb2 es substituida por la forma glicosilada BTAI-CMb2*.

Los resultados observados con respecto al efecto de la glicosilación, sugieren que este tipo de modificación no está directamente relacionada con la regulación de la actividad inhibitoria del tetrámero.

IV.5. NUEVAS VARIANTES ALELICAS DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA CMe

En el presente trabajo, se han aislado y caracterizado cinco variantes alélicas del inhibidor de tripsina de cebada BTI-CMe (CMe2.1, CMe2.2, CMe2.3, CMe3.1 y CMe3.2). Las variantes han sido detectadas tanto en accesiones de *H. vulgare* como de *H. spontaneum* de distinto origen geográfico y con frecuencias de aparición diferentes.

Las variantes CMe2.1 y CMe2.2 presentes en el cultivar Hatif de Grignon (Fig. III.32, B), se heredan conjuntamente y se expresan de forma codominante con respecto a BTI-CMe1 (Salcedo et al., 1984), apareciendo en un 43% del total de accesiones de cebada analizadas.

Con respecto a las proteínas CMe3.1 y CMe3.2, siempre aparecen juntas en los mapas de electroforesis bidimensional (Fig. III.32 C) y en una frecuencia del 23% en las accesiones de cebadas analizadas.

IV.5.1. SECUENCIAS NH₂-TERMINALES DE LAS VARIANTES DE BTI-CMe EN EL CULTIVAR HATIF DE GRIGNON.

Las secuencias NH₂-terminales de las variantes purificadas a partir de harina del cultivar Hatif de Grignon (CMe2.1, CMe2.2 y CMe2.3), se muestran en la Figura III.39.

Las tres variantes mostraron diferencias en sus secuencias con respecto a BTI-CMe1 del cultivar Bomi (Odani et al., 1983b; Lázaro et al., 1985). Las secuencias que aparecen en la Figura III.39 indican la presencia de, al menos, dos genes diferentes que codifican para variantes de BTI-CMe en el endospermo del cultivar Hatif de Grignon, en contraste con el cultivar Bomi donde sólo se ha detectado una única variante (Salcedo et al., 1984; Rodríguez-Palenzuela et al., 1989). Royo et al. (1991, datos sin publicar) han caracterizado un clon genómico de BTI-CMe1, que contiene dos copias del gen en un fragmento de 3.9 kb. Mientras la primera copia codifica un producto con la secuencia de BTI-CMe1, la segunda

es un pseudogen con un marco de lectura abruptamente interrumpido por codones de terminación. Estos datos, junto a los presentados por otros autores (Salcedo et al., 1984; Rodríguez-Palenzuela et al., 1989) sugieren que en los cultivares Hatif de Grignon y Valticky (ver epígrafe posterior), existen duplicaciones en tándem del gen BTI-CMe, y que, a diferencia del cultivar Bomi, en estas cebadas ambas copias son activas.

Con respecto a las variantes BTI-CMe2.2 y BTI-CMe2.3, presentan secuencias idénticas en los primeros 12 residuos. Estas dos proteínas eluyen conjuntamente en RP-HPLC (ver Figura III.35), aunque presentan diferente movilidad en mapas de electroforesis bidimensional (Fig.III.34) y diferente peso molecular en SDS-PAGE (Fig.III.36). Aunque no puede descartarse la existencia de tres variantes genéticas de BTI-CMe1 en el endospermo de Hatif de Grignon, los resultados pueden explicarse bajo la hipótesis de que BTI-CMe2.2 y BTI-CMe2.3 sean una misma proteína, siendo BTI-CMe2.3 una forma modificada de BTI-CMe2.2 por pérdida de un péptido C-terminal. En este sentido existen evidencias tanto en BTI-CMe1 como en MTI (inhibidor de tripsina de maíz), de existencia de péptidos C-terminales en sus cDNA respectivos, que no aparecen en las proteínas secuenciadas (Royo, 1991; Wen et al., 1992). Estos péptidos C-terminales pueden ser de tan sólo tres aminoácidos como en el caso de BTI-CMe, o incluso de 17 residuos en MTI, pudiendo atribuirse a señales de empaquetamiento vacuolar ya que las proteínas que se almacenan en vacuolas, sufren un procesamiento por el extremo C-terminal (Bednarek et al., 1992).

IV.5.2. SECUENCIAS NH₂-TERMINALES DE LAS VARIANTES DE BTI-CMe EN EL CULTIVAR VALTICKY

Las variantes BTI-CMe3.1 y -CMe 3.2 aisladas del cultivar Valticky, se muestran en el mapa de electroforesis bidimensional de la Figura III.32 C. Las secuencias de estas variantes aparecen en la Figura III.39.

Los resultados muestran que BTI-CMe3.2 presenta una secuencia diferente a BTI-CMe1 y diferente a las secuencias de las variantes de BTI-CMe del cultivar Hatif de Grignon.

Por el contrario, BTI-CMe3.1 presenta los primeros 18 residuos NH₂-terminales idénticos a los correspondientes de BTI-CMe1. Este dato, junto al hecho de que ambas variantes solapen en los mapas bidimensionales, inducen a pensar que se trata de la misma proteína. Sin embargo, ambas variantes presentan diferente peso molecular en SDS-PAGE (Figura III.36) y diferente actividad anti-tripsina (ver Tabla III.20).

Por todo lo expuesto, podría postularse que BTI-CMe1 y BTI-CMe3.1 son proteínas codificadas por dos genes diferentes o bien son el resultado de un procesamiento diferencial de un mismo producto génico.

IV.5.3. LAS VARIANTES GENÉTICAS DE BTI-CMe MUESTRAN DIFERENTE ACTIVIDAD INHIBITORIA

La actividad inhibitoria frente a tripsina (de páncreas bovino) de las variantes BTI-CMe purificadas en el presente trabajo, se muestran en la Tabla III.20. Como puede observarse, se ha encontrado diferente actividad inhibitoria en las variantes purificadas que pueden agruparse en tres grupos, dependiendo de su capacidad inhibitoria anti-tripsina, en orden decreciente:

BTI-CMe3.1 / BTI-CMe3.2

BTI-CMe1 / BTI-CMe2.1

BTI-CMe2.2 / BTI-CMe2.3

Las diferencias observadas en la actividad inhibitoria de las variantes de BTI-CMe, contrastan con los resultados mostrados en la Tabla III.19, donde diferentes variantes genéticas de inhibidores de α -amilasa que pertenecen a la misma familia que BTI-CMe,

muestran las mismas actividades. Trabajos previos (Sánchez-Monge et al., 1989; Gómez et al., 1991) sobre variantes de inhibidores diméricos y monoméricos de α -amilasas, aislados de trigo hexaploide, tampoco mostraron variaciones en sus especificidades o capacidad inhibitoria.

Inhibidores de tripsina aislados en otras especies vegetales tales como maíz (MTI) y mijo (*Eleusine coracana*, RTI), se han descrito como bifuncionales, es decir, además de presentar actividad anti-tripsina, inhiben α -amilasas de insectos (Chen et al., 1992; Shivaraj y Pattabiraman, 1981). Los inhibidores de tripsina de maíz, MTI, presentan una clara actividad inhibitoria frente a enzimas de insectos que son responsables de plagas de almacén tales como *Tenebrio molitor* y *Tribolium castaneum* (Chen et al., 1992).

En el caso de las variantes genéticas de BTI-CMe aisladas en el presente trabajo, se ha comprobado su actividad inhibitoria frente a preparaciones crudas de α -amilasas de diferentes insectos tales como *Sitophilus oryzae*, *Tenebrio molitor* y *Tribolium castaneum*. No se ha detectado ninguna actividad frente a las tres preparaciones de α -amilasas de las variantes de BTI-CMe, excepto en el caso de BTI-CMe2.1, que presenta una baja actividad frente a α -amilasa de *Tenebrio molitor* (García-Casado, Moralejo, Sánchez-Monge, Molina-Cano, Romagosa y Salcedo, datos sin publicar). Estos resultados indican que las variantes del inhibidor de tripsina de cebada, presentan especificidades diferentes a las de componentes homólogos de maíz (BTI-CMe y MTI muestran un 57% de identidad en sus secuencias).

Por tanto, puede concluirse que las variantes de BTI-CMe no son inhibidores bifuncionales, aunque deberían ensayarse frente a α -amilasas de otros orígenes para confirmar los resultados.

La caracterización de los clones cDNA de las variantes genéticas de BTI-CMe, podría ayudar a comprender las bases estructurales de las diferencias observadas en su capacidad inhibitoria así como su posible procesamiento C-terminal.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los genotipos españoles presentan, en general, una baja productividad y condiciones de cultivo poco desarrolladas. Asimismo, son genotipos tardíos, de talla elevada y, por tanto, con bajo índice de cosecha. Presentan pobre nivel de ahijamiento y peso de 1000 granos no muy elevado. Sin embargo, existen varias expresiones fenotípicas extremas, que los hacen susceptibles a incluirse en programas de mejora como donantes de caracteres que favorezcan la adaptabilidad ambiental.
2. Existen determinados genotipos españoles con una potencial calidad maltero-cervecera, ya que presentan elevados rendimientos del extracto, pese al elevado contenido en proteína total del grano.
3. No se ha encontrado ninguna relación entre los caracteres morfológicos del grano y la zona geográfica de donde provenga un determinado genotipo.
4. Existe una amplia diversidad de patrones electroforéticos de hordeínas, en el conjunto de accesiones analizadas. No obstante, se han encontrado patrones de hordeínas B y C, característicos de las cebadas dísticas españolas.
5. La variante alélica CMb-2, sólo ha sido detectada en las cebadas españolas de dos y seis carreras, en el cultivar francés Hatif de Grignon y derivados del mismo, en el cultivar Porthos y en accesiones de *Hordeum spontaneum* de origen marroquí. Puede considerarse, por tanto como una variante característica del Mediterraneo Occidental.
6. El origen de las cebadas españolas de dos carreras, posiblemente sea el resultado de una domesticación *in situ* a partir de un antecesor silvestre de *Hordeum spontaneum*, con la combinación genética CMb-2, CMe-1. Un 50% de los genotipos españoles posee esta combinación de proteínas, no detectada en ninguna otra accesión de cebada (excepto en un cultivar de Turquía, posiblemente debido a una mutación puntual). El resto de genotipos

presentes en las cebadas españolas, podrían haber llegado a la Península Ibérica tras sucesivas invasiones a lo largo de la historia.

7. Se ha purificado la subunidad del inhibidor tetramérico de cebada BTAI-CMb-2. Esta subunidad presenta una única aunque significativa diferencia en los primeros 23 aminoácidos, con respecto a BTAI-CMb-1, aunque no se han detectado diferencias en su capacidad inhibitoria frente a α -amilasas de *Tenebrio molitor*.

8. La glicosilación de las subunidades BTAI-CMb1 y- CMb2 del inhibidor tetramérico, no afecta a la actividad inhibitoria de las mismas cuando se integran en el tetrámero. No se ha detectado ninguna forma glicosilada en las subunidades CMA-1 y CMd-1.

9. Se han aislado y caracterizado cinco variantes del inhibidor de tripsina BTI-CMe1. Estas variantes muestran diferente actividad antitripsina, pudiendo agruparse en tres niveles en función de dicha actividad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Álvarez-Peña, M. (1952) La clasificación varietal de las cebadas cultivadas. *An. Aula Dei* 2: 234-249.

Angelino, S.A.G.F., Viëtor, R.J., Voragen, A.G.J. (1991) Arabinoxylans from barley, malt and wort. *Proc. 23rd Eur. Brew. Congr., Lisboa.* pp. 22-25.

Aragoncillo, C., Rodríguez-Loperena, M.A., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1975) Nigrosine staining of wheat endosperm proteolipid patterns on starch gels. *Anal. Biochem.* 63: 603-606.

Aragoncillo, C., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G. (1981) Two groups of low molecular weight hydrophobic proteins from barley endosperm. *J. Exp. Bot.* 32: 1279-1286.

Arié, R. (1980) España musulmana: Evolución política. En: *Historia de España* (Ed. Tuñón de Lara). Labor, Barcelona, vol 3, pp. 13-45.

Austin, R.B., Ford, M.A., Morgan, C.L. (1989) Genetic improvement in the yield of winter wheat: a further evaluation. *J. Agric. Sci. Camb.* 112: 443-448.

Autran, J.C., Scriban, R. (1977) Recherche sur la pureté varietale d'un malt. *Eur. Brew. Conv. Proc. EBC., Congress, Amsterdam,* pp. 47-52.

Axcell, B., Murray, J. (1980) Diastatic power-its relationship to Clipper malt quality. *Proc. 16th Conv. Austr. N. Zealand Inst. Brew., Sydney,* pp. 71-80.

Bamforth, C.W. (1982) Barley β -glucans. Their role in malting and brewing. *Brewers Digest* 57: 22-27.

Barber, D., Sánchez-Monge, R., García-Olmedo, F., Salcedo, G., Mendez, E. (1986a) Evolutionary implications of sequential homologies among members of the tripsin/ α -amylase inhibitor family (CM-proteins) in wheat and barley. *Biochim. Biophys. Acta* 873: 147-151.

Barber, D., Sánchez-Monge, R., Mendez, E., Lázaro, A. García-Olmedo, F., Salcedo, G. (1986b) New α -amylase and tripsin inhibitors among the CM proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochim. Biophys. Acta* 869: 115-118.

Barber, D., Sánchez-Monge, R., Gómez, L., Carpizo, J., Armentia, A., Lopez-Otín, C., Juan, F., Salcedo, G. (1989) A barley flour inhibitor of insect α -amylase is a major allergen associated with baker's asthma disease. *FEBS Lett.* 248: 119-122.

Barker, G. (1985) *Prehistoric farming in Europe*, Cambridge University Press, Cambridge.

Bednarek, S.Y., Raikhel, N.V. (1992) Intracellular trafficking of secretory proteins. *Plant. Mol. Biol.* 20: 133-150.

Bell, G.D.H. (1937) The classification and identification of some two-row varieties of barley cultivated in Great Britain including a description of the use of grain and vegetative characters for this purpose. *Z. Züchtg.* XXII: 81-146.

Bell, G.D.H., Lupton, F.G.H. (1962) The breeding of barley varieties. En: *Barley and Malt* (Ed. Cook, A.H.) Academic Press. New York pp. 45-99.

Bekele, E. (1983) A differential rate of regional distribution of barley flavonoid patterns in Ethiopia, and a view on the center of origin of barley. *Hereditas* 98: 269-280.

Bergal, P., Friedberg, L. (1940) Essai d'identification des orges cultivées en France. *Ann Epiph. Phytogèt.* 6: 2-4.

- Bergal, P. (1949) Les lodicules et leur utilisation dans la systemàtique du genere *Hordeum*. Ann. Sci. Nat. Bot. 11: 189-289.
- Bernfeld, P. (1955) Amylases, α and β . Meth. Enzymol. 1: 149-158
- Bhatty, R.S., MacGregor, A.W., Rossnagel, B.G. (1991) Total and acid-soluble β -glucan content of hulles barley and its relationships to acid-extract viscosity. Cereal Chem. 68: 221-227.
- Blake, T.K., Ulrich, S.E., Nilan, R.A. (1982) Mapping of *Hor* 3 locus encoding "D" hordeins in barley. Theor. Appl. Genet. 63: 367-371.
- Boisen, S., Djurtoft, R. (1981) Trypsin inhibitor from rye endosperm: purification and properties. Cereal. Chem. 58: 194-198.
- Bothmer, R. Von, Jacobsen N., Jorgensen, R. (1981) Phylogeny and taxonomy in the genus *Hordeum* . En: Barley Genetics IV. Proc. 4th Barley Genetics Symposium. (Ed. M.J.C. Asher), Edinmburgh University Press. Edimburgo, pp. 13-21.
- Bouard, A. (1989) L'identification des varietes d'orge par observation des caracteres morphologiques et des electrophoregrames proteiques du grain. Louvain Brew. Lett. 2: 3-10.
- Brandt, A. (1979) Cloning of double stranded DNA coding for hordein plypetides. Carlsberg Res. Commun. 44: 255-267.
- Brandt, A., Ingversen, J., Cameron-mills, V., Schmitt, J.M., Rassmussen, S.K. (1981) Molecular aspects of storage protein synthesis in barley endosperms. En: Barley Genetics IV. Proc. 4th Int. Barley Genetics Symposium. Ed. M.J.C. Asher), Edimburgh University Press. Edimburgh.

Briggs, K.G., Aytenfisu, A. (1980) Relationship between morphological characters above de flag leaf node and grain yield in spring wheats. *Crop Sci.* 20: 350-354.

Brookes, P. (1988) Malting: recent trends and future requirements. *Brew. and Distill. Int.* 19: 16-22.

Bunce, N.A.C., Forde, B.G., Kreis, M., Shewry, P.R.(1986) DNA restriction fragments length polymorphism at hordein loci: application to identifying and finger-printing barley cultivars. *Seed Sci. Technol.* 14: 419-429.

Buonocore, V., Petrucci, T., Silano, V. (1977) Wheat protein inhibitor of α -amylase. *Phytochemistry* 16: 811-820.

Cameron-Mills, V., von Wettstein, D. (1980) Endosperm morphology and protein body formation in developing wheat grain. *Carlsberg Res. Comm.* 45: 577-594.

Cameron-Mills, V., Brandt, A. (1988) A γ -hordein gene. *Plant Mol. Biol.* 11: 449-461.

Campos, F.D.A., Richardson (1983) The complete amino acid sequence of the bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi (Indian finger millet; *Eleusine coracana* Gaertn.) *FEBS Lett.* 152: 300-304.

Carrano, L., Nitti, G., Buoconori, V., Caporale, C., Poerio, E. (1989) An effective purification procedure of amylase and trypsin inhibitors from wheat flour: isolation of a new water-soluble protein. *Plant Sci.* 65: 25-31.

Chen, M.S., Feng, G., Zen, K.C., Richardson, M., Valdes-Rodríguez, S., Reeck., G.R., Kramer, K.J. (1992) α -Amylases from the three species of storage grain Coleoptera and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitors. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22: 261-268.

Clarke, J.M., Romagosa, I., De Pauw, R.W. (1991) Evaluation of morphological and physiological criteria for screening durum wheat genotypes for adaptation to dry growing conditions. *Crop Sci.* 31: 770-775.

Deponete, R., Parlamenti, R., Petrucci, T., Silano, V., Tomasi, M. (1976) Albumin α -amylase inhibitor families from wheat flour. *Cereal Chem.* 53: 805-820.

De la Morena, I., Ramos, J.M., García del Moral, L. (1986) Análisis del crecimiento y de la producción de grano en cultivos de cebada bajo las condiciones ambientales de la provincia de Granada. II Evolución y supervivencia de los tallos hijos. *An. Edaf. Agrob.* 2: 779-796.

Delibes, A., García-Olmedo, F. (1973) Biochemical evidence of gene transfer from the M' genome of *Aegilops ventricosa* to hexaploid wheat. *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* Columbia MO, pp. 161-166.

Dennel, R. (1983) *European Economic Prehistory.* An. Econ. Ac. Press, London.

Dixon, W.J., Brown, M.B., Engelman, L., Jennirch, R.I. (1990) *BMDP Statistical Software Manual.* University of California Press, Berkeley, vol 2: 817-827.

Doll, H., Brown, A.D.H. (1979) Hordein variation in wild (*Hordeum spontaneum*) and cultivated (*H. vulgare*) barley. *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 391-404.

Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.

Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO) (1991). *Basic Data Unit., Statistics Division.* FAO, 00100 Roma, vol. 45.

Faulks, A.J., Shewry, P.R., Miflin, B.J. (1981) The polymorphism and structural homology of storage polypeptides (hordein) coded by the *Hor 2* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochem. Genet.* 19: 841-858.

Fincher, G.B. (1975) Morphology and chemical composition of barley endosperm cell walls. *J. Inst. Brew* 81: 116-122.

Forde, B.G., Kreis, M., Bahramian, M.B., Matthews, J.A., Miflin, B.J., March, J.F. (1981) Molecular cloning and analysis of the cDNA sequences derived from poly A-RNA from barley endosperm: identification of B hordein related clones. *Nucleic Acids Res.* 9: 6689-6707.

Forde, J., Forde, B.G., Fry, R., Kreis, M., Shewry, P.R., Miflin, B.J. (1983) Identification of barley and wheat cDNA clones related to the high Mr polypeptides of wheat gluten. *FEBS Lett.* 162: 360-366.

Forde, B.G. (1985a) The molecular biology of the high molecular weight glutenin subunits of wheat. PhD. Thesis, CNAAB, U.K.

Forde, B.G., Kreis, M., Williamson, M.S., Fry, R.P., Pywell, J., Shewry, P.R., Bunce, N., Miflin, B.J. (1985b) Short tandem repeats shared by B- and C- hordein cDNA suggest a common evolutionary origin for two groups of cereal storage proteins. *EMBO J.* 4: 9-15.

Fowler, D.B. (1983) Influence of date of seeding on yield and other agronomic characters of winter wheat and rye grown in Saskatchewan. *Can. J. Plant Sci.* 63: 109-113.

Fra-Mon, P., Salcedo, G., Aragoncillo, C., García-Olmedo, G. (1984) Chromosomal assignment of genes controlling salt-soluble proteins (albumins and globulins) in wheat and related species. *Theor. Appl. Genet.* 69: 167-172.

García del Moral, L.F., Ramos, J.M., Recalde, L. (1984) Tillering dynamics of winter barley as influenced by cultivar and nitrogen fertilizer: a field study. *Crop Sci.* 24: 179-181.

García del Moral, L.F., Ramos, J.M. (1989) Fisiología de la producción del grano. En: La cebada, morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales (Ed. J.L. Molina-Cano) Mundi-Prensa, Madrid, pp. 137-177.

García-Olmedo F., Salcedo G., Sánchez-Monge R., Gómez L., Royo J., Carbonero P. (1987) Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amilases. En: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, (Ed. Miflin, B.J.) Oxford University Press, Oxford, Vol4, pp. 275-334.

Gautier, M.F., Alary, R., Joudrier, P. (1990) Cloning and characterization of a cDNA encoding the wheat (*Triticum durum* Desf.) CM16 protein. *Plant Mol. Biol.* 14: 313-322.

Gómez, L., Sánchez-Monge, R. García-Olmedo, F., Salcedo, G. (1989) Wheat tetrameric inhibitors of insect α -amylases: allopolyploid heterosis at the molecular level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3242-3246.

Gómez, L., Sánchez-Monge, R., Lopez-Otín, C., Salcedo, G. (1991) Wheat inhibitors of heterologous α -amylases. Characterization of major components from the monomeric class. *Plant Physiol.* 96: 768-774.

Hadjichristodoulou, A. (1992) A new domestication of the "wild" brittle rachis gene of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Genet. Res. Newslett.* 90: 46.

Haldford, N.G., Morris, N.A., Urwin, P., Williamson, M.S., Kasarda, D.D., Lew, W.J.L., Kreis, M., Shewry, P.R. (1988) Molecular cloning of the barley seed protein CMd: a variant member of the α -amylases/trypsin inhibitor family of cereals. *Biochim. Biophys. Acta.* 950: 435-440.

- Hammer, K., Lehmann, Ch. O., Perrino, P. (1985) Character variability and evolutionary trends in a barley hybrid swarm-a case study. *Biol. Zentralbl.* 104: 511-517.
- Hansen, J., Renfrew, J.M. (1978) Palaeolithic-neolithic seed remains at Franchthi cave, Greece. *Nature* 271: 349-352.
- Harlan, J.R., Zohary, D. (1966) Distribution of wild wheats and barley. *Science* 153: 1074-1080.
- Harlan, J.R. (1975) *Crops and Man*. Am. Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin, pp. 6-9.
- Harlan, J.R. (1979) *Crops and Man*. Am. Soc. Agron., Crop Sci. Am., Madison, Wisconsin.
- Harlan, J.R. (1992) *Crops and Man*. Am. Soc. Agron., Crop. Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin, p. 161.
- Hassan, S. (1989) Fabricación de malta y cerveza. Calidad cervecera de la cebada. En: *La cebada: morfología, fisiología, agronomía y usos industriales*. (Ed.J.L. Molina-Cano) Mundi-Presa. pp. 199-216.
- Haun, J.R. (1973) Visual quantification of wheat development. *Agron. J.* 65: 116-119
- Hay, R.K.M., Walker, A.J. (1989) *An introduction to the physiology of crop yield*. Longman Scientific Technical.
- Hejgaard, J., Bjorn, S.E., Nielsen, G. (1984) Localization to chromosomes of structural genes for the major protease inhibitors in barley grains. *Theor. Appl. Genet.* 68: 127-130.

- Helbaek, H. (1966) Commentary on the phylogenesis of *Triticum* and *Hordeum*. *Econ. Bot.* 20: 350-360.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F., Boulter, D. (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature.* 300: 160-163.
- Hockett, E.A., Nilan, R.A. (1985) Genetics. En: Barley (Ed. D.C. Rasmusson). *Am. Soc. Agr., Crop Sci. Soc. Am., SSSA Publishers, Madison, Wisconsin*, pp. 194-196.
- Home, S. (1992) Malting Quality. Summary of poster session VIII. En: Barley Genetics IV (Ed. L. Munck) Munksgaard International Publishers. pp. 979-986
- Hopp, H.E., Rasmussen, S.K., Brandt, A. (1983) Organization and transcription of B1 hordein genes in high lysine mutants of barley. *Carlsberg Res. Commun.* 48: 201-216.
- Huber, J.A. (1932) Einteilung der zweizeiligen gezüchteten sommergersten. *Pflanzenbau.* 8: 52-256.
- Jana, S., Pietrzak, L.N., Morris, M.I., Srivastava, J.P., Holwerda, B.C., Thai, K.M. (1987) Genetic diversity in wild barley (*Hordeum spontaneum*) populations of the fertile crescent. En: Barley Genetics V (Ed. S. Yasuda, T. Konishi) Sanyo Press Comp. Okayama (Japan) pp. 103-107.
- Jensen, J., Jorgensen, J.H., Jenson, H.P., Giese, H., Doll, H. (1980) Linkage of the hordein loci *Hor* 1 and *Hor* 2 with the powdery mildew resistance loci *MI-k* and *MI-a* on barley chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.* 58: 27-31.
- Johnson, B.L (1972) Protein electrophoretic profiles and the origin of the B genome of wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 1398-1402.

Johnson, R., Narvaez, J., An, G., Ryan, C.A. (1989) Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9871-9875.

Jouve, N., Bernardo, A., Sanz, J., Soler, C. (1990) Discriminación de variedades de cebada (*H. vulgare* L.) mediante electroforesis. I: Análisis de hordeínas por SDS-PAGE. Invest. Agraria: Prod. Veg. 5: 7-23.

Kashlan, N., Richardson, M. (1981) The complete amino-acid sequence of a major wheat protein inhibitor of α -amylases. Phytochemistry 20: 1781-1784.

Kirkman, M.A., Shewry, P.R., Mifflin, B.J. (1982) The effect of nitrogen nutrition on the lysine content and protein composition of the barley seed. J. Sci. Food Agric. 33: 115-127.

Kirsi, M., Mikola, J. (1971) Occurrence of proteolytic inhibitors in various tissues of barley. Planta 96: 281-291.

Kirsi, M. (1973) Formation of proteinase inhibitors in developing barley grains. Physiol. Plant. 29: 141-144.

Kochlann, C.H., Wientholter, S. (1990) Harvest index, yield components and nitrogen content in triticale, wheat and rye. En: Proc. 2nd Int. Triticale Symp. Passo Fundo, pp.71-73.

Kreis, M., Shewry, P.R. (1992) The control of protein synthesis in developing barley seed. En: Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology (Ed. P.R. Shewry) The Alden Press Ltd, Oxford pp. 319-334.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lázaro, A., Barber, D., Salcedo, G., Mendez, E., García-Olmedo, F. (1985) Differential effects of high-lysine mutations on the accumulation of individual members of a group of proteins encoded by a disperse multigene family in the endosperm of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Eur. J. Biochem.* 149: 617-623.

Lázaro, A., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Paz-Ares, J., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1988) A dimeric inhibitor of insect α -amylase from barley. Cloning of the cDNA and identification of the protein. *Eur. J. Biochim.* 172: 129-134.

López-Fuster, P. (1985) Mejora de cebadas para resistencia al frío y a la sequía. En: II Jornadas Técnicas sobre Cereales de Invierno. ITGC, Pamplona.

Ludlow, M.M., Muchow, R.C. (1988) Critical evaluation of the possibilities for modifying crops for higher production per unit of precipitation. ICRISAT.

Lyons, A., Richardson, M., Tatham, A.S., Shewry, P.R. (1987) Characterization of homologous inhibitors of trypsin and α -amylase from seed of rye (*Secale cereale* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 915: 305-313.

MacCausland, J., Wrigley, C.W. (1977) Identification of australian barley cultivars by laboratory methods: gel electrophoresis and gel isoelectric focusing of the endosperm proteins. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 17: 1020-1027.

MacGregor, A.W. (1991a) The effect of barley structure and composition on malt quality. *Proc. 23rd Eur. Brew. Congr., Lisboa*, pp. 37-50.

MacGregor, A.W. (1991b) Current state of research into barley carbohydrates and enzymes. *Proc. 3rd Aviemore Conference on malting, brewing and distilling* (Ed. I. Campbell) Institute of Brewing, London, pp. 37-50.

MacGregor, A.W. (1992) Evaluation of barley malting quality. En: Barley Genetics VI. (Ed. L. Munck) Munksgaard International Publishers Ltd, Denmark, Vol I pp. 969-978.

Marchylo, B.A., LaBerge, D.E. (1980) Barley cultivar identification by electrophoretic analysis of hordein proteins. I. Extraction and separation of hordein proteins and environmental effects on the hordein electrophoregram. *Can. J. Plant Sci.* 60: 1343-1350.

Marchylo, B.A., LaBerge, D.E. (1981) Barley cultivar identification by electrophoretic analysis of hordein proteins. II. Catalogue of electrophoregram formulae for canadian-grown barley cultivars. *Can. J. Plant. Sci.* 61: 859-870.

Marchylo, B.A., (1987) Barley cultivar identification by SDS gradient PAGE analysis of hordein. *Can. J. Plant. Sci.* 67: 927-944.

Mahoney, W.C., Hermodson, B., Jones, D.D., Powers, B., Corfman R.S., Reeck, G.R. (1984) Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of tripsin and activates Hageman factor. *J. Biol. Chem.* 359: 8412-8516.

Mangas, J. (1980) Hispania romana: Organización económica y social. En: Historia de España (Ed. M. Tuñón de Lara), Labor, Barcelona, Vol I, p 254.

Maule, D.R. (1989) The essential requirements of barley for brewing and distilling malts. *Ferment* 2: 315-317.

Medina, J., Hueros, G., Carbonero, P. (1993) Cloning of cDNA, expression and chromosomal location of genes encoding the three types of subunits of the barley tetrameric inhibitor of insect α -amylases. *Plant. Mol. Biol.* (en prensa).

Mezler, J., Kleinhofs, A. (1987) Molecular genetics of barley endosperm proteins. *Barley Genet., Newslett.* 17: 13-25.

Mena, M., Sánchez-Monge, R., Gómez, L., Salcedo, G., Carbonero, P. (1992) A major barley allergen associated with baker's asthma is a glycosylated monomeric inhibitor of insect α -amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene. *Plant. Mol. Biol.* 20: 415-458.

Miflin, B.J., Shewry, P.R. (1977) Techniques for the separation of barley and maize proteins. Commission of the European Communities, 5687e Luxembourg.

Miflin, B.J., Burgess, S.R., Shewry, P.R. (1981) The development of protein bodies in the storage tissues of seeds. *J. Exp. Bot.* 32: 199-219.

Miflin, B.J., Field, J.M., Shewry, P.R. (1983) Cereal storage proteins and their effects on the technological properties. En: *Seed Proteins* (Ed. J. Daussant, J. Mosse and J. Vaughan), Academic Press, London pp. 255-319.

Millet, M.O. Montebault, A., Autran, J.C. (1991) Hordein composition differences in various anatomical regions of the kernel between two different barley types. *Sci. Aliments* 11: 155-161.

Mikola, J., Soulinna, E.M. (1969) Purification and properties of a trypsin inhibitor from barley. *Eur. J. Biochem.* 9: 555-560.

Molina-Cano, J.L. (1977a) Estudios sobre el germoplasma indígena de cebada dística de la provincia de Soria. Tesis doctoral. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica, Madrid.

Molina-Cano, J.L. (1977b) Numerical taxonomy as an aid to barley germplasm collection. *Barley Genet. Newslett* 7: 45-50.

Molina-Cano, J.L., Elena-Roselló, J.M. (1978) A further contribution to the classification of barley cultivars: use of numerical taxonomy and biochemical methods. *Seed Sci. Technol.* 6: 593-615.

Molina-Cano, J.L. y Conde, J. (1980) *Hordeum spontaneum* C. Koch emend Bacht. collected in southern Morocco. *Barley Genet. Newslett* 10: 44-47.

Molina-Cano, J.L., Gómez-Campo, C. Conde, J. (1982) *Hordeum spontaneum* C. Koch as a weed of barley fields in Morocco. *Z. Pflanzenzücht* 88: 161-167.

Molina-Cano, J.L., Madsen, B., Atherton M.J., Drost, B.W., Larsen, J., Schildbach, R., Simiand, J.P., Voglar, K. (1986) A statistical index for evaluation of malting and brewing quality in barley and its use in breeding. *Monats für Brauwis.* 39: 328-335.

Molina-Cano, J.L. (1987) The EBC Barley and Malt Committee Index for the evaluation of malting quality in barley and its use in breeding. *Plant Breed.* 98: 249-256

Molina-Cano, J.L., Fra-Mon, P., Salcedo, G., Aragoncillo, C., Roca de Togores, F., García-Olmedo, F. (1987) Morocco as a possible domestication center for barley: Biochemical and Agromorphological Evidence. *Theor. Appl. Genet.* 73: 531-536.

Molina-Cano, J.L. (1989) En: *La cebada. Morfología, genética, agronomía y usos industriales* (Ed. J.L. Molina-Cano), Mundi-Prensa, Madrid pp. 199-216.

Molina-Cano, J.L., Royo, C., Rubió, A., Ramo, T., Pérez-Vendrell, A. (1991) Environmental effects on mendelian quality genes in barley. En: *Barley Genetics VI.* (Ed. L. Munck) Munksgaard International Publishers Ltd. pp. 513-515.

Moll, M., Flayeux, R., Lipus, G., Marc A. (1981) Biochemistry of mashing. *MBAA Tech. Quart.* 18: 166-173.

Moonen , J.H.E., Graveland, A., Muts, G.C.J. (1987) The molecular structure of gel protein from barley ,its behaviour in wort filtration and analysis. J. Inst. Brew. 89: 292-298.

Murphy, P.J., Witcombe (1985) Variation in Himalayan barley and the concept of centres of diversity. En: Barley (Ed. D.C. Rasmusson) Am. Soc. Agr., Crop Sci. Am., SSSA, Publishers, Madison, Wisconsin, pp. 26-36.

Neergaard, T.B. von (1889). Sveriges Utsädesför. Tidskrift, Arberättelse for 1888. pp. 54-62

Netsveaev V. P., Sozinov, A.A. (1982) Linkage studies of genes *Gle1* and *HrdF* in barley chromosome 5. Barley Genet. Newslett. 12: 13-18.

Netsveaev, V.P., Sozinov, A.A. (1984) Location of a hordein G locus, *HrdG* on chromosome 5 of barley. Barley Genet. Newslett. 14: 4-6.

Nevo, E. (1986) Genetic resorces of wild cereals and crop improvement: Israel, a natural laboratory. Isr. J. Bot. 35: 255-278.

Nevo, E. (1992) Origin, Evolution, Population Genetics and Resources for Breeding of Wild Barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent. En: Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology (Ed. P.R. Shewry) The alden Press Ltd, Oxford pp.19-43.

Nicks, R.E., Ellis, P.R., Parlevliet, I.E. (1993) Resistance to parasites. En: Plant Breeding: Principles and Prospects. (Ed. M.D. Hayward, N.O. Bosemark, I. Romagosa) Chapman & Hall, London pp. 422-447.

Odani, S., Koide, T., Ono, T. (1983a) A possible evolutionary relationship between plant trypsin inhibitor, α -amilase inhibitor and mammalian pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal). J. Biochem. 93: 1701-1704.

- Odani, S., Koide, T., Ono, T., (1983b) The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* 258: 7998-8003.
- Osborne, T.B. (1924) *The Vegetable Proteins*. Logmans, Green and CO. London.
- Oram, R.D., Doll, H., Koieb, P. (1975) Genetics of two storage proteins variants in barley. *Hereditas* 80: 53-58.
- Pace, W., Parlamenti, R., Rab, A., Silano, V. (1978) Protein α -amylase inhibitors from wheat flour. *Cereal Chem.* 55: 244-254.
- Palmer, G.H. (1976) *Studies of science and technology of barley germination and growth*. Dsc Thesis. Heriot-Watt University, Edimburgh.
- Palmer, G.H., Bathgate, G.N. (1983) Malting and Brewing. En: *Recent Advances in Cereal Science and Technology* (Ed. Y. Pomeranz) Am. Assoc. Cereal Chem. St Paul, Minnesota, USA, pp. 237-234.
- Palmer, G.H. (1989) Cereals in malting and brewing. En: *Cereal Sci. Tech.* (Ed. G.H. Palmer) Aberdeen Univerty Press, U.K., pp. 61-242.
- Paz-Ares, J., Ponz, F., Aragoncillo, C., Hernandez-Lucas, C., Salcedo, G., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1983) "In vivo" and "In vitro" synthesis of CM-proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 157: 74-86.
- Poelhman, J.M. (1985) Adaptation and distribution. En: *Barley*. Am. Soc. Agr, Crop Sci. Soc. Am., SSSA, Publishers, Madison, Wisconsin, pp. 1-17.
- Rahman, S., Shewry, P.R., Mifflin, B.J. (1982) Differential protein accumulation during barley grain development. *J. Exp. Bot.* 33: 717-728.

Rasmussen, S.K., Johansson, A. (1992) Nucleotide sequence of a cDNA coding for the barley seed protein CMA: an inhibitor of insect α -amylase. *Plant. Mol. Biol.* 18: 423-427.

Rasmusson, D.C. (1985) En: *Barley* (Ed. D.C. Rasmusson) Am. Soc. Agr., Crop Sci. Soc. Am. SSSA, Publishers. Madison, Wisconsin.

Redman, D.G. (1975) Structural studies on wheat (*Triticum aestivum*) proteins lacking phenylalanine and histidine residues. *Biochem. J.* 149: 725-732.

Renfrew, C. (1989) *Archaeology and Language. The puzzle of Indo-European origins.* Penguin, London, pp. 145-177.

Richardson, M., (1991) Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. En: *Methods in Plant Biochemistry* (Ed. L.J. Rogers), Academic Press, London, Vol. 5, pp. 259-305.

Rodríguez-Loperena, M.A., Aragoncillo, C., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1975) Heterogeneity of wheat endosperm proteolipids (CM proteins). *Phytochemistry* 14: 1219-1223.

Rodríguez-Palenzuela, P., Royo, J., Gómez, L., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Molina-Cano, J.L., García-Olmedo, F., Carbonero, P. (1989) The gene for trypsin inhibitor CMe is regulated in trans by the *lys 3a* locus in the endosperm of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Mol. Gen. Genet.* 219: 474-479.

Romagosa, I., Araus, J.L. (1991) La mejora genética vegetal para zona con déficits hídricos Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid. LXXXV, pp. 349-366.

Romagosa, I., Fox, P.N. (1993) Genotype x Environment, interaction and adaptation. En: *Plant Breeding: Principles and Prospects* (Eds. Hayward M.D., Bosemark, N.O., Romagosa, I.). Chapman & Hall, London.

Romagosa, I., Fox, P.N., García del Moral, L.F., Ramos, J.M., García del Moral, B., Roca de Togores, F., Molina-Cano, J.L. (1993) Integration of statistical and physiological analyses of adaptation of near-isogenic barley lines. *Theor. Appl. Genet.* (en prensa).

Royo, J. (1991) El inhibidor de tripsina de cebada CMe: caracterización molecular y regulación de la expresión por el locus lys 3. Tesis Doctoral. ETSIA Agrónomos. Universidad Politécnica, Madrid.

Ryan, C.A. (1988) Proteinase inhibitor gene families: tissue specificity and regulation. En: *Plant Gene Research: Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes* (Eds. D.P.S., Verma, R.B., Goldberg) Springer-Verlag, Wien-New York, pp. 223-233.

Ryan, C.A. (1989) Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. *BioEssays* 10: 20-24.

Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Aragoncillo, C. (1982) The isolation and characterization of low molecular weight hydrophobic salt-soluble proteins from barley. *J. Exp. Bot.* 33: 1325-1331.

Salcedo, G., Fra-Mon, P., Molina-Cano, J.L., Aragoncillo, C., García-Olmedo, F. (1984) Genetics of CM-proteins (A-hordeins) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 68: 53-59.

Sánchez-Monge, R., Gómez, L., García-Olmedo, F., Salcedo, G. (1986) A tetrameric inhibitor of insect α -amylase from barley. *FEBS Lett.* 207: 105-109.

Sánchez-Monge, R., Gómez, L., García-Olmedo, F., Salcedo, G. (1989) New dimeric inhibitor of heterologous α -amylases encoded by a duplicated gene in the short arm of chromosome 3B of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur. J. Biochem.* 183: 137-40.

Sánchez-Monge, R., Gómez, L., Barber, D., Lopez-Otín, C., Armentia, A., Salcedo, G. (1992) Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Glycosylated subunits of the α -amylases-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity. *Biochem. J.* 281: 401-405.

Sayas-Abengoechea J.J., García-Moreno, L.A. (1980) El período de las invasiones. En: *Historia de España* (Ed. M. Tuñón de Lara), Labor, Barcelona, vol. 2, pp. 245-279.

Shainkyn, R., Birk, Y. (1970) α -amylase inhibitors from wheat: isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 222: 502-513.

Quinuan, S. (1981) The evolution of cultivated barley. En: *Barley Genetics IV* (Ed. M.J.C. Asher), Edimburg University Press. Edimburgo, pp. 22-25.

Shewry, P.R., Pratt, H.M., Finch, R.A., Mifflin, B.J. (1978a) Genetic analysis of hordein polypeptides from single seeds of barley. *Heredity* 40: 463-466.

Shewry, P.R., Pratt, H.M., Mifflin, B.J. (1978b) Varietal identification of single seeds of barley by analysis of hordein polypeptides. *J. Sci. Food Agric.* 29: 587-596.

Shewry, P.R., Pratt, H.M., Leggat, M.M., Mifflin, B.J. (1979) Protein metabolism in developing endosperms of high-lysine and normal barley. *Cereal Chem.* 56: 110-117.

Shewry, P.R., Field, J.M., Kirkman, M.A., Faulks, A.J., Mifflin, B.J. (1980) The extraction, solubility and characterization of two groups of barley storage polypeptides. *J. Exp. Bot.* 33: 390-407.

Shewry, P.R., Lew, E.J.L., Kasarda, D.D. (1981) Structural homology of storage proteins coded by the *Hor 1* locus of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 153: 246-253.

Shewry, P.R., Miflin, B.J. (1982) Genes for the storage proteins of barley. *Qualitas Plantarum. Plant Foods for Human Nutrition.* 31: 251-267.

Shewry, P.R., Franklin, J., Parmar, S. Smith, S.J., Miflin, B.J. (1983) The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein compositions of barley grain. *J. Cereal Science* 1: 21-31.

Shewry, P.R., Lafiandra, D., Salcedo, G., Aragoncillo, C., García-Olmedo, F., Lew, E.J.L., Dietler, M.D., Kasarda, D.D. (1984) N-terminal amino acid sequences of chloroform/methanol-soluble proteins and albumins from endosperm of wheat, barley and related species. *FEBS Lett.* 175: 359-363.

Shewry, P.R., Bunce, N.A.C., Kreis, M., Forde, B.J.(1985) Polymorphism at the *Hor 1* locus of barley (*Hordeum vulgare*, L). *Biochem. Genet.* 23: 389-402.

Shewry, P.R., Williamson, M.S., Kreis, M. (1987) Effects of mutant genes on the synthesis of storage components in developing barley endosperm. En: *Mutant Genes that affect Plant Development* (Ed. H., Thomas) Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 95-118.

Shewry, P.R., Tatham, A.S., Field, J.M., Forde, B.G., Clark, J., Gallois, P., Marris, C., Halford, N., Forde, J., Kreis, M. (1988) The structure of barley and wheat prolamins and their genes. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 183: 117-127.

Shewry, P.R., Parmar, S., Franklin, J., Burgess, S.R. (1990) Analysis of a rare recombination event within the multigenic *Hor 2* locus of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Genet. Res.* 55: 171-176.

Shivaraj, B., Pattabiraman, K. (1981) Natural plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual α -amylases/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* Gaertn.). *Biochem. J.* 193: 29-36.

Silano, V. (1987) α -Amylase inhibitors En: Enzymes and their role in cereal technology (Ed. J.E., Kruger, D., Lineback, C.E., Stauffer) AACC, St Paul, Minnesota, pp. 141-199.

Simmons, S.R., Rasmusson, D.C., Wiersma, J.V. (1982) Tillering in barley: genotype, row spacing and seeding rate effects. *Crop Sci.* 22: 801-805.

Slade, A.M., Hoj, P.B., Morrice, N.A., Fincher, G.B. (1989) Purification and characterization of three (1->4)- β -D-xylan endohydrolases from germinates barley. *Eur J. Biochem.* 185: 533-539.

Smith, D.B., Lister, P.R. (1983) Gel-forming proteins in barley grain and their relationships with malting quality. *J. Cereal Sci.* 1: 229-239.

Smith, D.B. (1990) Barley seed protein and its effect on malting and brewing quality. *Plant Varieties and Seed.* 3: 63-80.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.

Sorensen, M.B., Cameron-Mills, V., Brandt, A. (1989) Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in developing barley endosperm. *Mol. Gen. Genet.* 2: 233-239.

Thakahashi, R. (1955) The origin of barley. En: *Adv. Genet.* 7: 227-266.

Tuñón de Lara, M., Tarradell, M., Mangas, J. (1980) Primeras culturas e Hispania romana. En: *Historia de España*. (Ed. M., Tuñón de Lara) Labor, Barcelona. vol 1: 65-90.

Tukey, J.W. (1977) *Exploratory data analysis*. Reading Massachusetts: Addison-Wesley.

Uribe-Echeverría M.T., Molina-Cano, J.L. (1993) Identificación y clasificación de ciertas variedades de cebada cultivadas en España. II. Electroforesis de hordeínas en gel de poliacrilamida (en prensa).

Van den Berg, R., Muts, G.C.J., Drost, B.W., Graveland, A. (1981) Proteins from barley to wort. Proc. 18th Eur. Brew. Congr. Copenhagen, pp. 461-469.

Vavilov, N.I. (1926) Studies on the origin of cultivated plants. Institute Botanique Applique et d'Amelioration del Plantes, Leningrad.

Vavilov, N.I. (1951) The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants . Chronica Botanica 13: 1-364.

Villena, L.M. (1955) La identificación de cultivares en cebada. An. Aula Dei 4: 1-148.

Wainwright, T. (1990) Update on β -glucans. Brewers Guardian 119: 9-13.

Wen, L., Huang, J.K., Zen, B.H., Johnson, B.H., Muthukrishnan, S., Mackay, V., Manney T.R., Manney, M., Reeck, G.R. (1992) Nucleotide sequence of a cDNA clone that encodes the maize inhibitor of trypsin and activated Hageman factor. Plant Mol. Biol. 18: 813-814.

Wiebe, G.A. (1968) Introduction of barley into the New World. En: Barley: origin, botany, culture, winterhardiness, genetics, utilization, pests. USDA Agriculture Handbook N 338, Washington DC.

Woychick, J.H., Boundy, J.A., Dimler, R.J. (1961) Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. Arch. Biochem. Biophys. 94: 477-479.

Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. An. Biochem. 118: 197-203.

Wrigley, C.W. (1970) Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis: application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. *Biochem. Genet.* 4: 509-516.

Xu, T.W. (1982) Origin and evolution of cultivated barley in china. *Acta Genet. Sinica* 9: 440-446 (En: *Plant Breed. Abstr.* 53: 593-594, 1983)

Xu, T.W. (1987) Origin and Phylogeny of cultivated barley in China. En: *Barley Genetics V* (Ed. S. Yasuda, T. Konishi) Sanyo Press Comp. Okayama (Japan) pp. 91-95.

Yamashita, H., Hirono, T., Hayase, F., Kato, T. (1986) Precipitate forming reaction of β -(1->4)-D-Glucanase (II) Malt. *Agr. and Biol. Chem.* 50: 733-740.

Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F. (1974) A decimal code for the growth stage of cereals. *Eucarpia Bull.* 7: 42-52.

Zohary, D. (1964) Spontaneous brittle six-rowed barleys, their nature and origen. En: *Barley genetics.* (Ed. Broekhuizen, S., Dantuma, G., Lamberts, H., Lange, W.) Wageningen, vol.I pp. 27-31.

Zohary, D. (1983) Wild genetic resources of crops in Israel. *Israel J. Bot.* 21: 97-122.

Zohary, D., Hopf, M. (1988) *Domestication of plants in the old world.* Clarendon, Oxford.

