



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la expresión de la Endoproteasa B en diferentes cultivares de cebada mexicanos y su regeneración *in vitro*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biól. Claudio Augusto Castañón Suárez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Felipe Cruz García
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jorge Nieto Sotelo
Instituto de Biología, UNAM.
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Esta tesis de maestría se realizó en el Laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García.

A la UNAM y a UNAM Posgrado, por permitirme seguir siendo alumno de la máxima casa de estudios de este país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Felipe Cruz García por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto en el que aprendí mucho.

A los miembros del comité tutor: Dra. Tzvetanka D. Dinkova, Dr. Jorge Nieto Sotelo y Dr. Felipe Cruz García, por sus observaciones y sugerencias a mi trabajo durante los tutoriales.

A los miembros del jurado: Dr. Javier Plasencia de la Parra, Dr. Eleazar Martínez Barajas, Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dra. Judith Márquez Guzmán y Dr. Agustín López Munguía, por sus aportaciones durante la revisión de esta tesis que ayudaron a enriquecerla mucho.

A la M. en C. Yuridia Cruz González Zamora por su asistencia técnica.

A la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores y a la Biól. Aracely Arandal Martínez por permitirme el uso de sus instalaciones y por su apoyo durante las sesiones de biobalística.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por instruirme en la realización de las inmunolocalizaciones y por estar al pendiente de las mismas.

A la p. de M en C. Vera I. Martínez Barradas, por compartirme sus consejos para llevar a cabo exitosamente la inclusión de tejidos para hacer los cortes histológicos y por su ayuda en el procesamiento de imágenes.

A la M. en C. Nadia Castro Cárdenas, a la p. de M. en C. Sandra Ríos Carrasco y al M. en C. Aldebarán Camacho Velázquez por su ayuda en la realización de cortes histológicos, montaje y tinción de los mismos.

A mis compañeros del laboratorio 104: M. en C. Daniela Torres Rodríguez, M. en C. Edgar Nájera Torres, p. de M. en C. Luis Alberto Ramos Mora y Q.F.B. Renata Salcedo Sánchez por su gran ayuda, consejos y compañía durante toda mi estancia en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá: M. en E. I. Claudia Guadalupe Juana Suárez Aguilar, por siempre creer en mí, aun cuando ni siquiera yo creía en mí mismo, por su apoyo incondicional, por siempre buscar darnos lo mejor a mis hermanas y a mí, por ser una gran persona y por su nobleza. Gracias mamá, te dedico todas las páginas de esta tesis, te quiero mucho.

A mi papá: M. en C. P. Miguel Ángel Castañón Camacho †, que a pesar de que ya no pudo verme entrar al posgrado, le agradezco todo su apoyo durante 22 años de mi vida.

A mis hermanas: M. en Antrop. Mijaely Antonieta Castañón Suárez y M. en Admón. Yoana Angélica Castañón Suárez, por su apoyo infinito desde que tengo memoria y por estar allí siempre que las necesité. Las admiro mucho por sus logros, saben que yo también las apoyaré incondicionalmente. Las quiero mucho.

A mis mejores amigas: Diana A. Lomelín, Lisandra Llanos, Dany Rendón, Mayra Cruz, Hanen Schabib, Natzalia Díaz, Erika Bautista y Cristina Mendoza, porque de verdad encontré amigas verdaderas en todas ustedes, gracias por su apoyo incondicional, por preocuparse por mí y por todos los grandes momentos que pasamos juntos y espero seguir pasando al lado de todas ustedes. Las quiero mucho, forman parte importante de mi vida, saben que también estaré allí para ustedes.

A mis amigos de la facultad: Ariel, Caro, Citla, Gaby, Ilse, Joel, Liz, Ramón, Sandra y Valeria, siempre me la paso bien con todos ustedes, año tras año, nunca cambien.

Y a todos los que directa o indirectamente me han ayudado a ser la persona que soy ahora.

Gracias.

Atte. Claudio.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
BA	Bencil adenina
BSA	Albúmina de suero bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Endoproteasa A
EPB	Endoproteasa B
EPB1	Endoproteasa B1
EPB2	Endoproteasa B2
GA	Ácido giberélico
GARE	Elemento de respuesta a ácido giberélico
GFP	Proteína verde fluorescente
gus	Gen de la β -glucuronidasa
INIFAP	Instituto Nacional de las Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Buffer de fosfatos salino
RNA	Ácido ribonucleico
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TAE	Amortiguador de Tris, acetato y EDTA.

ÍNDICE

1	RESUMEN	9
2	INTRODUCCIÓN	10
3	ANTECEDENTES	11
3.1	Generalidades de la cebada	11
3.1.1	El cultivo de cebada en México	14
3.2	Elaboración de cerveza	17
3.2.1	El malteo y sus procesos enzimáticos	17
3.2.2	Macerado y fermentación	20
3.2.3	Problemas comunes durante la fabricación de la cerveza	22
3.3	Proteínas de almacenamiento de la semilla	23
3.3.1	Las hordeínas	24
3.4	Proteasas de cisteína	24
3.4.1	La Endoproteasa B	25
3.5	Mejoramiento de la cebada	27
3.6	Métodos de transformación de cebada	28
3.6.1	Transformación mediante biobalística	29
4	HIPÓTESIS	31
5	OBJETIVO GENERAL	31
6	OBJETIVOS PARTICULARES	31
7	METODOLOGÍA	32
7.1	Determinación de la expresión espacio-temporal de la EPB	32
7.1.1	Extracción de proteína total de semillas de cebada	33
7.1.2	Inmunodetección de EPB en diferentes tejidos etapas de desarrollo de las semillas	36
7.1.3	Inmunolocalización de EPB en tejidos de semilla de cebada	37
7.2	Extracción de DNA genómico de cebada	38
7.3	Clonación y análisis de EPB2 de diferentes cultivares de cebada	40
7.4	Clonación del promotor de EPB2 en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® ..	46
7.5	Clonación en el vector binario de expresión <i>pBGWFS7</i>	49
7.6	Generación de la construcción para la sobreexpresión de la EPB2	52
7.7	Cultivo de tejidos vegetales de los callos de cebada	54

7.8	Preparación de las micropartículas de tungsteno	55
7.9	Transformación de callos por biobalística	56
7.10	Regeneración de callos de cebada, elongación y aclimatación de plantas regeneradas a condiciones <i>ex vitro</i>	57
8	RESULTADOS	58
8.1	La EPB se expresa específicamente en semillas entre las 40 y 72 h post imbibición.	58
8.2	Anatomía y metabolismo de la semilla de cebada tras la imbibición.....	62
8.3	Localización espacial de EPB en semillas de cebada.....	63
8.4	Clonación de la región promotora de EPB2	68
8.5	La región promotora de <i>EPB2</i> es suficiente para dirigir la expresión de EPB2 en embriones y callos de cebada <i>in vitro</i>	71
8.6	Clonación de la región codificante de EPB2	74
8.7	Variaciones genéticas del promotor de EPB2 en diferentes cultivares de cebada	75
8.8	Variaciones en la región codificante.....	81
8.9	Regeneración de plantas de cebada a partir de callo	84
9	DISCUSIÓN	88
9.1	La expresión de la Endoproteasa B está finamente regulada	88
9.2	Expresión diferencial de EPB en distintos cultivares	89
9.3	Regeneración <i>in vitro</i> de plantas fotosintéticas a partir de callo derivado de embriones inmaduros	92
10	CONCLUSIONES	95
11	PERSPECTIVAS	95
12	BIBLIOGRAFÍA	96
13	ANEXOS.....	106
13.1	Anexo I: Extracción y purificación de plásmido (Maxi-Prep).....	106
13.2	Anexo II: Prueba histoquímica para detectar la actividad del gen reportero <i>gus</i> en tejido vegetal transformado.	107
13.3	Anexo III: Medio de inducción de callo de cebada a partir de embriones inmaduros (Wan y Lemaux, 1994).....	108
13.4	Anexo IV: Medio de regeneración de callo de cebada (Marthe <i>et al.</i> , 2015).....	109
13.5	Anexo V: Alineamiento de promotores de EPB1 y EPB2 con los diferentes elementos de respuesta a GA.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Anatomía de la cariósida de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>).....	13
Fig. 2. Distintas etapas del proceso de elaboración de cerveza.....	22
Fig. 3: Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de EPB1 y EPB2.....	32
Fig. 4. Detección de EPB en diferentes etapas de macerado del cultivar Esmeralda.....	33
Fig. 5. Desarrollo de las semillas a los 7 días post-antesis y a los 21 días post-antesis.....	34
Fig. 6: Desarrollo de las plántulas de cebada a diferentes tiempos de imbibición de las semillas.....	35
Fig. 7. Gen reportado de <i>EPB2</i> del cultivar Himalaya.....	41
Fig. 8. Mapa y puntos de referencia del vector de clonación pGEM®-T Easy.....	44
Fig. 9. Representación gráfica del vector de Clonación pENTR/D-TOPO.....	47
Fig. 10. Construcción <i>pENTR/D-TOPO::PEPB2</i>	48
Fig. 11. Representación gráfica del vector de destino pBGWFS7.....	50
Fig. 12. Representación gráfica de la construcción <i>pBGWFS7::PEPB2</i>	51
Fig. 13. Representación gráfica de la construcción <i>pBGWFS7::EPB2</i>	54
Fig. 14. Presencia de la EPB en diferentes tejidos de cebada	58
Fig. 15. Inmunodetección de EPB en semillas a diferentes tiempos de imbibición.....	59
Fig. 16. Patrón de expresión temporal de EPB en diferentes cultivares a diferentes tiempos de imbibición.....	60
Fig. 17. Comparación de la expresión de EPB en granos de diferentes cultivares a las 72 h de imbibición.....	61
Fig. 18. Tinción con safranina-verde rápido de un corte histológico longitudinal de un grano de cebada (cv. Esmeralda) a las 24 h de imbibición.....	63
Fig. 19. Controles negativos de la inmunolocalización.....	64
Fig. 20. Localización espacial de EPB en células de aleurona a diferentes tiempos de imbibición.....	65
Fig. 21. Expresión de la EPB en la capa de aleurona a las 48 h de imbibición y su secreción hacia el endospermo.....	66
Fig. 22. Localización espacial de EPB en células del escutelo a diferentes tiempos de imbibición.....	67
Fig. 23. Control negativo de la inmunolocalización en escutelo.....	67
Fig. 24: Amplificación de la región promotora de EPB2 a partir de DNA genómico de diferentes cultivares de cebada.....	68
Fig. 25. PCR realizada a partir de plásmidos purificados de dos colonias transformantes con la construcción <i>pENTR/D-TOPO::PEPB2</i> , usando oligonucleótidos FPEPB2 y REPB2 y M13F y M13R.....	69
Fig. 26. Digestión de la construcción pENTR/D-TOPO::PEPB2 con la enzima MluI.....	69
Fig. 27. PCR realizadas a partir de plásmidos purificados de dos colonias transformantes con la construcción <i>pBGWFS7::PEPB2</i> , usando oligonucleótidos FPEPB2 y REPB2 (A), y barF y barR.....	70
Fig. 28: Digestión del vector de salida <i>pBGWFS7::PEPB2</i> con las enzimas AatII y SacI.....	71
Fig. 29. Expresión de la β -glucuronidasa bajo el promotor de <i>EPB2</i> en células de embrión bombardeado <i>pEPB2::gus</i> tras 48 hrs de imbibición.....	72
Fig. 30. Expresión de la proteína GFP en callo derivado de embrión de cebada.....	73
Fig. 31. Expresión de <i>gus</i> en callo derivado de embrión de cebada después de su transformación.....	73

Fig. 32: Amplificación de EPB2 a partir de DNA genómico de diferentes cultivares de cebada.....	74
Fig. 33: Amplificación de EPB2 a partir de plásmidos de colonias transformantes para cada cultivar.....	74
Fig. 34: Digestión de los plásmidos <i>pGEM:: EPB2</i> con la enzima EcoRI.....	75
Fig. 35: Alineamiento de secuencias de la región promotora de EPB2 en diferentes cultivares de cebada.....	77
Fig. 36: Sitio de unión del factor del Elemento de Respuesta a GA.....	79
Fig. 37: Diferencias de los elementos de respuesta a GA en los promotores de EPB1 y EPB2....	81
Fig. 38: Alineamiento de secuencias de la región codificante de <i>EPB2</i> de los cultivares.....	82
Fig. 39: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de EPB2 de todos los cultivares evaluados.....	83
Fig. 40: Plantas regeneradas no fotosintéticas (no transformadas) de la línea celular S3 y el cultivar Armida creciendo en condiciones de luz.....	85
Fig. 41: Proceso de regeneración de plantas fotosintéticas (no transformadas) a partir de callo derivado de embrión inmaduro (Cv. Esperanza).....	85
Fig. 42: Aclimatización de plantas fotosintéticas obtenidas de la regeneración de callo y crecimiento de la planta hasta la fase adulta en condiciones de invernadero.....	86
Fig. 43: Callo transformado no regenerativo en medio selectivo (BASTA 3mg/L) que perdió su capacidad de regenerativa, en condiciones de luz.....	87
Fig. 44: Callos potencialmente transformados con capacidad regenerativa en condiciones de luz creciendo en medio sin BASTA.....	87

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Gráfica 1: Macerado por decocción.....	21
Tabla 1: Mezcla de reactivos utilizada en la técnica de PCR.....	41
Tabla 2: Condiciones de la amplificación por PCR.....	42
Tabla 3: Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción EcoRI.....	45
Tabla 4: Condiciones de la amplificación por PCR del promotor de EPB2.....	46
Tabla 5: reacción de clonación pENTR/D-TOPO.....	47
Tabla 6: Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción MluI.....	49
Tabla 7: Reacción de clonación pENTR/D-TOPO.....	50
Tabla 8: Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando las enzimas de restricción AatII y SacI.....	52
Tabla 9: Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción NcoI.....	53
Gráfica 2: Abundancia relativa de EPB en los diferentes cultivares de cebada a las 72 h de imbibición con respecto al cultivar Armida.....	62
Tabla 10: Lista de motivos asociados a factores de transcripción encontrados en los promotores de EPB2 de los diferentes cultivares analizados.....	78
Tabla 11: Lista de motivos asociados a elementos de respuesta a GA encontrados en los promotores de EPB1 (Himalaya) y EPB2 (diferentes cultivares).....	80
Tabla 12: Diferencias en la secuencia de aminoácidos de EPB2 de los diferentes cultivares.....	84

1 RESUMEN

Estudios previos demuestran que una proteasa de cisteína de alrededor de 30 kDa, denominada Endoproteasa B (EPB), es la principal responsable de la degradación de las proteínas de almacenamiento del endospermo de cebada, llamadas hordeínas. Debido a la gran importancia de la EPB en el proceso de proteólisis y su impacto en la industria cervecera, se propone que la EPB sea un marcador molecular de la calidad de la malta.

En este trabajo se estudió la expresión espacio-temporal de la EPB en diferentes cultivares de cebada (Armida, Esperanza, Adabella, Alina, Esmeralda y Metcalfe) utilizados por cerveceras mexicanas. Se observó que la EPB se encuentra ausente en diferentes etapas del desarrollo de la semilla y en la semilla madura, expresándose únicamente durante desarrollo temprano de la plántula una vez ocurrida la germinación, específicamente entre las 24 y 72 h de imbibición de las semillas. Mediante inmunolocalizaciones se detectó que las células de aleurona son el principal tejido donde se sintetiza la EPB y que de éstas se secreta hacia el endospermo a partir de las 48 h de imbibición. Este patrón de expresión específico demuestra que es una proteasa importante en la degradación de las hordeínas durante el desarrollo de las plántulas. Se encontraron diferencias en la expresión de la EPB en los diferentes cultivares analizados, siendo los cultivares Adabella e Himalaya los que la expresan en menor proporción.

Se realizó la clonación y secuenciación de la región promotora y codificante de *EPB2* de seis cultivares de cebada. Se verificó la funcionalidad del promotor de *EPB2* del cultivar Armida mediante su fusión a los genes reporteros *GFP* y *gus*. Del análisis de la secuencia promotora de *EPB2*, se observó que los cultivares Adabella e Himalaya presentan polimorfismos, los cuales no están presentes en el resto de los cultivares, los cuales podrían estar correlacionados con una expresión menor de *EPB2*.

Adicionalmente al estudio de EPB y debido a que no hay reportes sobre la regeneración *in vitro* ni la transformación de cultivares mexicanos de cebada, se estableció un protocolo para la regeneración *in vitro* de cebada de un cultivar mexicano. Se obtuvo exitosamente la regeneración de plantas completas y fértiles del cultivar Esperanza a partir de callo derivado de embriones inmaduros. Sin embargo, no se logró la regeneración de plantas transgénicas con capacidad de sobreexpresar EPB2 debido a que el agente de selección BASTA® inhibió la regeneración del callo transformado.

2 INTRODUCCIÓN

Durante la germinación de las semillas de cereales, ocurre la degradación y removilización de las sustancias de reserva del endospermo. Este es un proceso sumamente complejo que está regulado por hormonas vegetales como el ácido giberélico (GA) y el ácido abscísico (ABA), en el cual interfieren diversos tipos de enzimas que transforman las sustancias de reserva a nutrientes fácilmente asimilables para la plántula en crecimiento. En la industria cervecera también se llevan a cabo estos procesos durante el proceso del malteo, en el cual semillas de cebada y de otros cereales germinan en condiciones controladas con el fin de generar nutrientes para que sean aprovechados por levaduras para llevar a cabo la fermentación de la cerveza.

La producción de cerveza y su calidad final dependen en gran medida de las actividades hidrolíticas que ocurren en las semillas durante el malteo. Una de las actividades enzimáticas esenciales la llevan a cabo las proteasas, ya que en cebada como en otros cereales, el endospermo almacena proteínas de reserva, que en el caso de cebada se les denomina hordeínas. Durante la producción de cerveza, la hidrólisis de hordeínas por proteasas es de suma importancia, ya que se liberan aminoácidos esenciales para la fermentación por levaduras. Sin embargo, dependiendo del cultivar de cebada que se utilice, la degradación de las hordeínas puede ser parcial, ocasionando que se formen agregados proteicos que afectan el filtrado de la cerveza y su fermentación.

En la cebada se han detectado actividades proteolíticas atribuidas a proteasas de serina, metaloproteasas y proteasas de cisteína (Jones, 2005). Dentro de las proteasas de cisteína se encuentran las endoproteasas de cisteína A (EPA) y B (EPB), esta última con dos isoformas: EPB1 y EPB2, que son secretadas por la capa de aleurona en respuesta a la presencia de GA. Se ha reportado que EPB1 y EPB2 son las responsables del 90 % de la actividad proteolítica sobre las hordeínas durante la germinación. Estas endoproteasas pertenecen a una familia que consiste de dos genes muy similares: *EPB1* y *EPB2*, los cuales se localizan

en el cromosoma tres de cebada (Koeler y Ho, 1988; Koeler y Ho, 1990; Marttila *et al.*, 1995).

Basado en estos antecedentes se sugiere que, en caso de existir una expresión diferencial de la EPB en diferentes cultivares de cebada empleados en la industria cervecera, se podría usar como un marcador molecular que indique la calidad de la malta. Si bien se conoce la secuencia de *EPB* del cultivar reportado “Himalaya”, no hay estudios hechos con cultivares mexicanos de cebada, por lo que resulta interesante analizarlos y determinar si existen polimorfismos entre estos cultivares que pudieran provocar que EPB presente características diferentes.

Por otro lado, la sobreexpresión de endoproteasas en semillas de cebada durante las primeras etapas de germinación podría contribuir a mejorar o aumentar la degradación de hordeínas en plantas transgénicas de cebada. Una posible forma de conseguir esto sería mediante la expresión o sobreexpresión de proteasas con capacidad de degradar hordeínas mediante un promotor específico de aleurona, o bien, aumentando la dosis génica de EPB controlada bajo su mismo promotor.

3 ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de la cebada

La cebada (*Hordeum vulgare*) es una especie de plantas monocotiledóneas, perteneciente a la familia Poaceae (también conocida como familia de las gramíneas), se considera el cuarto cereal más importante a nivel mundial, sólo por debajo del trigo (*Triticum aestivum*), el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays*) (Mrizová *et al.*, 2013). El cultivo de la cebada es uno de los más antiguos y ha tenido un papel importante en el desarrollo humano. Gracias a la gran diversidad genética de la cebada, se han podido seleccionar cultivares con distintas características como la tolerancia al frío, sequía, suelos salinos o alcalinos, entre otras. De esta forma, ahora es posible cultivar cebada en varios ambientes que van desde el Círculo Polar Ártico, hasta cultivos con irrigación artificial en áreas desérticas de África (Mrizová *et al.*, 2013).

La cebada se ha considerado una especie modelo dentro de la tribu Triticeae de la familia Poaceae debido a las recientes mejoras en la eficiencia de la transformación, la reducción del tiempo en la generación de líneas transgénicas estables, la disponibilidad de recursos extensivos de germoplasma de cebada y que la complejidad de su genoma es relativamente baja. La cebada es una planta herbácea anual, con flores hermafroditas, de fecundación autógama y diploide, con un número cromosómico $2n= 14$ (Mrízová *et al.*, 2013).

Según la morfología y el número de hileras o carreras que tienen las espigas, la cebada se puede clasificar en dos tipos: de dos o de seis hileras. En la forma de dos hileras (también llamada tradicionalmente por su sinónimo *Hordeum distichon*, ahora en desuso), la espiga se divide en dos triadas, separadas por un raquis, en donde sólo la espiguilla media es fértil, por lo que la espiga completa sólo tiene dos hileras de espiguillas con capacidad de producir semillas. En la forma de seis hileras (que tradicionalmente se le llamaba por su sinónimo *Hordeum hexastichon*, ahora obsoleto), las tres espiguillas de cada triada son fértiles, y por lo tanto, las espigas tienen seis hileras o carreras que producen semillas (Soreng, 2003). La aparición de esta forma de seis hileras fue producto de la domesticación, ya que las formas silvestres de cebada sólo tienen espigas de dos hileras (Zohary y Hopf, 2000). También se pueden distinguir dos formas de cebada según la época del año en la que son sembradas; algunas se siembran en el otoño (cebadas de invierno), mientras que otras se siembran durante la primavera (cebadas de primavera) (Briggs *et al.*, 2004).

Los granos o “semillas” de cebada, en términos botánicos se les denomina cariósides, que en realidad son frutos secos indehiscentes formados por un solo carpelo, el cual está fusionado a la cubierta seminal formando una sola unidad, y las “cáscaras” o cubiertas que recubren a la cariósida son en realidad brácteas, un tipo de hojas modificadas que sirven de protección. Las cariósides están compuestas a grandes rasgos por una cubierta, un embrión y un tejido de reserva denominado endospermo (Fig. 1). El endospermo almidonoso, cuya principal función es ser la reserva de nutrientes de la plántula en crecimiento, es un tejido

muerto que está compuesto de células con paredes delgadas y empaçadas con gránulos de almidón embebidos en una matriz proteica. El endospermo se encuentra rodeado por la capa aleurona, que consiste en una capa con tres estratos de células (o triestratificada), las cuales están vivas, pero no se multiplican durante la germinación, tienen paredes celulares gruesas y contienen reservas de lípidos, proteínas y carbohidratos al igual que organelos funcionales. En la base del grano se encuentra el embrión el cual se divide en escutelo y eje embrionario. El eje embrionario consta de un coleóptilo (cubierta que recubre los meristemos apicales) apuntando hacia el ápice del grano, y la coleorriza que encierra las raíces embrionarias. El eje embrionario es la parte del embrión que puede crecer y formar una plántula, el cual se encuentra empotrado al escutelo, que corresponde al cotiledón en los cereales (Briggs *et al.*, 2004).

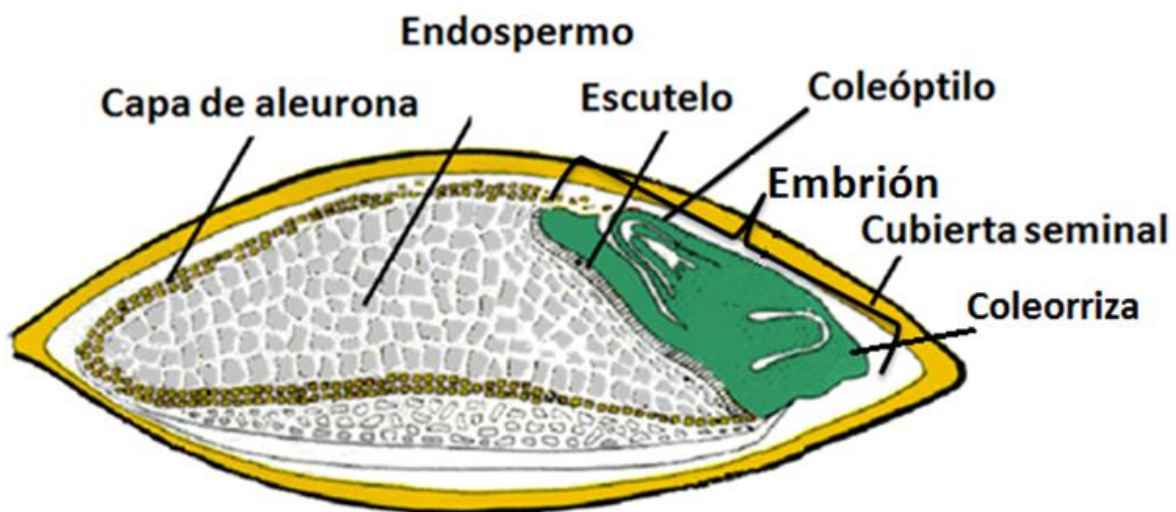


Fig. 1. Anatomía de la cariósida de cebada (*Hordeum vulgare*).

La cebada, además de ser una fuente de alimento para el hombre, se usa principalmente para la producción de malta para la elaboración de cerveza y como un ingrediente en la industria de elaboración de alimentos para animales (Mrizová *et al.*, 2013). Actualmente entre un 55 y 60 % de la producción de cebada se utiliza para la alimentación animal, entre un 30 y 40 % para la elaboración de malta, un 5 % como semilla de siembra y del 2 al 3 % para uso alimenticio (Ullrich, 2011).

Una de las principales características que diferencian a las cebadas malteras de las forrajeras es el contenido proteico. Los cultivares empleados para la elaboración de malta y cerveza contienen un menor contenido de proteínas en los granos, a la vez que tienen una mayor cantidad de almidón o carbohidratos fermentables. Por lo general, los cultivares de cebada maltera contienen entre un 9.5 y 12.5 % de proteína en los granos (Saldívar, 2009). Mientras que para fines de alimentación animal y panificación, se prefieren aquellos con un alto contenido proteico (Ullrich, 2011).

3.1.1 El cultivo de cebada en México

Las principales zonas productoras de cebada en México son los estados de Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Puebla y Michoacán. En estas regiones se produce aproximadamente el 90 % de la producción total. La cebada en México tradicionalmente se cultiva en el ciclo de primavera-verano en tierras de temporal del Altiplano central (estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y México). Cuando la cosecha es insuficiente para satisfacer la demanda de la industria, el cultivo se amplía a zonas de riego con altos rendimientos y que pueden producir en el ciclo otoño-invierno. La producción nacional de cebada no satisface las necesidades de la industria nacional, por lo que se ha tenido que importar grano de cebada y malta proveniente principalmente de Estados Unidos de América y Canadá (Arias-García, 2013).

En México, aproximadamente el 70 % de la cebada que se produce es utilizada por la industria maltera y el 30 % restante corresponde a cultivares que se utilizan fundamentalmente para la alimentación del ganado (Arias-García, 2013).

Los cultivares utilizados en la industria maltera son cultivados en una superficie superior a las 300 mil hectáreas. Estos cultivares fueron desarrollados por el Instituto Nacional de las Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Algunos de los cultivares empleados en la industria cervecera mexicana son los siguientes:

Cultivar Adabella: Es resultado de la selección de líneas segregantes de cebada, originadas de un cruzamiento simple realizado por el programa nacional de cebada maltera del INIFAP, en el Campo Experimental Valle de México. Se liberó para su cultivo comercial con el nombre de Adabella en 2004. Se desarrolló de acuerdo con la ley de producción, certificación, comercio de semillas vigente en México y está inscrita en el Registro Nacional de Variedades y Plantas (RNVP), con el registro del Título de Obtentor 0321 con vigencia del 20 de noviembre de 2006 al 30 de noviembre de 2021 (Zamora-Díaz *et al.*, 2008).

El cultivar Adabella presenta tolerancia a enfermedades comunes como roya lineal amarilla (*Puccinia striiformisf. sp. hordei*), roya de la hoja (*Puccinia hordei*), mancha reticular (*Helminthosporium teres*) y a escaldadura de la hoja (*Rynchosporium secalis*), consideradas las enfermedades más comunes del cultivo en la región del centro de México. Posee alto rendimiento potencial con excelente calidad industrial. Dedicada a la siembra en ambientes de producción temporal. El cultivar Adabella tiene hábito de crecimiento de primavera. Es de ciclo vegetativo intermedio, floración de 48 a 72 días y madurez fisiológica de 90 a 132 días, dependiendo del ambiente de producción y la fecha de siembra; porte alto que varía de 0.5 a 1 m en promedio, de acuerdo al manejo agronómico del cultivo (Zamora-Díaz *et al.*, 2008).

Cultivar Alina: Es resultado de la selección de líneas segregantes de cebada, originadas de un cruzamiento doble realizado por el programa nacional de cebada maltera del INIFAP en el Campo Experimental Bajío. Se liberó para su cultivo comercial con el nombre de Alina en 2005. Esta fue desarrollada de acuerdo con la Ley de Producción y Certificación, Comercio de Semillas vigente en México y está inscrita en el registro nacional de variedades y plantas (RNVP), con el registro de título de obtentor 0297 con vigencia del 31 de mayo de 2006 al 31 de mayo de 2021 (Solano-Hernández *et al.*, 2009).

El cultivar Alina tiene hábito de crecimiento de primavera y su ciclo vegetativo es precoz; el espigamiento se presenta de los 58 a 68 días y madurez fisiológica ocurre entre los 106 y 123 días, dependiendo del ambiente y de la fecha de

siembra; es de porte intermedio, el cual varía de 0.80 a 1.20 m, según el manejo agronómico del cultivo. Es tolerante a roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis f. sp. hordei*), a la cenicilla (*Erysiphe graminis f. sp. hordei*) y moderadamente tolerante a roya de la hoja (*Puccinia hordei*) (Solano-Hernández *et al.*, 2009).

Cultivar Armida: Es producto del proceso de mejoramiento genético que se originó de un cruzamiento triple realizado por el programa nacional de cebada maltera del INIFAP en el Campo Experimental Bajío. Se liberó para su cultivo comercial con el nombre de Armida en 2005. El progreso de este cultivar fue de acuerdo con la ley de producción, certificación y comercio de su semilla vigentes en México y está inscrita en el Registro Nacional de Variedades y Plantas (RNVP), con el registro de título de obtentor 0296 con vigencia del 31 de mayo de 2006 al 31 de mayo de 2021 (Zamora-Díaz *et al.*, 2010).

El cultivar Armida tiene hábito de crecimiento de primavera y su ciclo vegetativo es precoz; el espigamiento ocurre de 58 a 71 días y su madurez fisiológica se presenta de 102 a 120 días, dependiendo del ambiente y de la fecha de siembra; es de porte intermedio, el cual varía de 0.74 a 1.20 m, según el manejo agronómico del cultivo. Presenta tolerancia a la roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis f. sp. hordei*) y a la cenicilla (*Erysiphe graminis*), moderadamente tolerante a la roya de la hoja (*Puccinia hordei*), que son las enfermedades más comunes de la cebada. Su ciclo vegetativo es más precoz que el del cultivar comercial Esperanza (Zamora-Díaz *et al.*, 2010).

Cultivar Esperanza: Este cultivar resulta de la selección de líneas de cebada originadas por cruzamientos realizados en el INIFAP Campo Experimental Bajío, Celaya Guanajuato y evaluadas en los Campos Experimentales Bajío y Valle de México, Chapingo, Estado de México. Posee genes de enanismo del cultivar Dwarf Good, originario de la India. Está adaptado a condiciones de clima y suelo del Bajío. Tiene tallos fuertes y espigas resistentes al desgrane. Tolerante a la cenicilla (*Erysiphe graminis*), a la roya de la hoja (*Puccinia hordei*) y a la roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis f. sp. hordei*). Recomendada para áreas de riego y regiones con condiciones semejantes a las del Bajío. Este cultivar tiene un hábito

de crecimiento de primavera. Fue liberado para su cultivo comercial en 1989 (Ramírez *et al.* 1997; Navarrete, 2016).

Cultivar Esmeralda: Este cultivar es el resultado de la selección de líneas segregantes de cebada originadas por el cruzamiento simple de las líneas M9653 X M9667, realizado por el Programa Nacional de Cebada del INIFAP, en el Campo Experimental Valle de México, en Chapingo, Estado de México. Se liberó para su cultivo comercial con el nombre de Esmeralda en 1993. La planta es de porte medio con 86 a 105 cm de altura. Es de ciclo intermedio, con 49 a 64 días a floración, dependiendo de la localidad y del ciclo de producción. Esmeralda es el primer cultivar de cebada desarrollado en México para condiciones de temporal con tolerancia a la roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis f. sp. hordei*), a la mancha reticular (*Helminthosporium teres*), a la escaldadura (*Rynchosporium secalis*) y también ha mostrado tolerancia a la roya de la hoja (*Puccinia hordei*) (Zamora-Díaz *et al.*, 1997).

La mayor parte de la malta que se importa a México es del cultivar canadiense de dos hileras **Metcalfe**, que es uno de los mejores para el malteo y la producción de cerveza a nivel mundial. Este cultivar fue desarrollado en 1986 a partir de la cruce de los cultivares Oxbow y Manley. Se caracteriza por ser resistente a patógenos y también tiene la ventaja de tener una baja concentración proteínica en las semillas, una cualidad muy apreciada por las cerveceras (Legge *et al.*, 2003; Kalinova-Jelezova, 2017).

3.2 Elaboración de cerveza

3.2.1 El malteo y sus procesos enzimáticos

La materia prima para la elaboración de la cerveza es la malta, que consiste de semillas de cebada (y también otros cereales como trigo, centeno, avena, sorgo o mijo) germinadas en condiciones controladas y que posteriormente son deshidratadas, a este proceso de germinación y deshidratación se le denomina malteo o malteado. El principal objetivo del malteo es deshacerse de la mayor parte del β -glucano (polímero compuesto de carbohidratos unidos mediante

enlaces β -glucosídicos) de las paredes celulares y parte de la fracción proteica insoluble, debido a que este polímero puede restringir el acceso de las enzimas a los gránulos de almidón. Al mismo tiempo, en la semilla se sintetizan enzimas que transforman el almidón en sólidos solubles. Las enzimas más importantes son α -amilasas, β -amilasas y α -glucosidasa (Briggs *et al.*, 2004).

El malteo consta de tres etapas:

- 1) Remojo
- 2) Germinación
- 3) Secado

1) Remojo: es una etapa indispensable para la germinación, especialmente para la activación de enzimas, la degradación, translocación y uso de las reservas almacenadas. Durante el remojo las semillas se hidratan y respiran, por esta razón se debe suministrar aireación. La germinación está influenciada por las concentraciones de O_2 y CO_2 (Copeland y McDonald, 2001; Kleinwächter *et al.*, 2012; Zarnkow *et al.*, 2007).

La hidratación adecuada de los granos es un factor muy importante en la producción de malta de buena calidad. Cuando la hidratación del endospermo no es la óptima, la modificación de los granos durante el malteo es difícil de lograr. El grado de imbibición depende la composición de la semilla, la permeabilidad al agua y su disponibilidad (Bryce *et al.* 2010; Copeland y MacDonald, 2001). En el malteo se remoja la cebada hasta que alcanza un contenido de agua que aumenta del 12 % hasta el 38-45 % en aproximadamente 48 h.

2) Germinación: En la industria del malteo, la germinación se refiere al periodo de crecimiento del embrión y la modificación del endospermo que ocurre después del periodo de remojo. Estos procesos ocurren entre las 24 y 48 horas de hidratación. Tras el inicio de la imbibición de la semilla, se restablece el metabolismo y la integridad estructural de las células, ocurre la síntesis de proteínas y el incremento de la actividad respiratoria (Nonogaki *et al.*, 2010). También muchas enzimas hidrolíticas (glucanasas, lipasas, amilasas y proteasas) aumentan en cantidad y

actividad, algunas de éstas catalizan la degradación y movilización de sustancias de almacenamiento del endospermo. En las primeras etapas de la germinación, las hidrolasas son liberadas del escutelo. Posteriormente, el embrión libera giberelinas (GA_1 y GA_3), las cuales difunden a lo largo del grano y estimulan la síntesis de enzimas en la aleurona y su liberación hacia el endospermo. Durante el proceso de germinación, el endospermo es modificado y degradado en diferentes etapas como son: la degradación de las paredes celulares por la liberación de β -glucanos; la degradación parcial de las proteínas del interior de la célula; y la ruptura de los gránulos de almidón. Una vez que las capas de aleurona sintetizan enzimas hidrolíticas, el endospermo se modifica de forma rápida, sobre todo en las zonas aledañas a esta zona (Fincher, 1989; Briggs *et al.*, 2004).

El crecimiento del embrión se mantiene inicialmente por sus propias reservas y posteriormente por moléculas solubles provenientes del endospermo como azúcares y aminoácidos, productos de degradación del endospermo. Durante el proceso de malteo, las semillas se hidratan hasta que ocurre la emergencia de las raíces y la plúmula, con una temperatura controlada de 16°C con aire frío humificado (Briggs *et al.*, 2004). En la malta procesada de forma adecuada, sólo una proporción pequeña de los granos contienen una pequeña cantidad de endospermo no degradado. En este momento a las semillas germinadas en condiciones controladas se les denomina malta verde (Fincher, 1989; Briggs *et al.*, 2004).

3) Secado: Una vez que la germinación y la modificación del endospermo están lo suficientemente avanzados, la malta verde se deseca, por lo general, en dos etapas para frenar las actividades enzimáticas y dar lugar a un producto estable que pueda ser almacenado para su uso posterior (Hughes y Baxter, 2003; Imure y Sato, 2013). La primera etapa se lleva a cabo con una corriente de aire y durante la segunda el producto se tuesta ligeramente en hornos para facilitar la ruptura de las cadenas almidonadas. Debido a las temperaturas que se emplean (de 22 a 110 °C), este proceso induce reacciones de Maillard que generan compuestos que

dan color y aroma a la cerveza (Willaert, 2006; Kleinwächter *et al.*, 2012). Cuando la deshidratación se efectúa con aire frío, la malta es de color pálido y rica en enzimas, mientras que cuanto más elevadas sean las temperaturas de deshidratación (especialmente en sus primeras etapas), más oscura será la malta y menor será su contenido de enzimas activas (Hough, 1990).

3.2.2 Macerado y fermentación

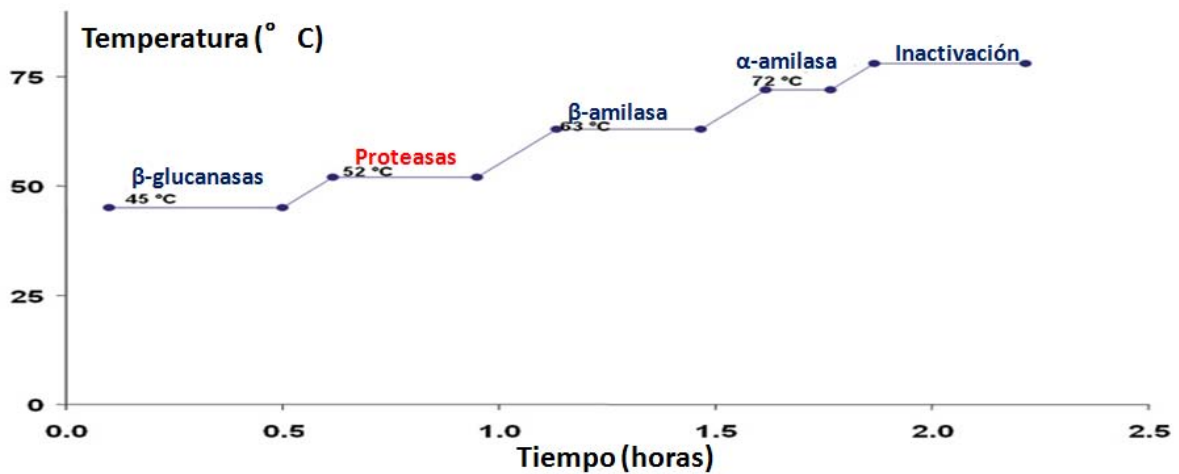
La malta seca muchas veces es premezclada con adjuntos particulares, que son preparaciones de cereales que modifican características de la malta y de la cerveza producida y después molida para crear el *grist*, el cual se mezcla con agua en condiciones de temperatura controlada, a este proceso se le denomina macerado o maceración. El macerado debe mantenerse a una temperatura específica, durante tiempos predeterminados, para permitir que las enzimas degraden el almidón y dextrinas a azúcares solubles, así como la ruptura parcial de proteínas y otras sustancias. El objetivo es obtener una mezcla que produzca un adecuado mosto dulce, es decir, un líquido rico en compuestos solubles de la malta y cualquier adjunto que se le haya añadido (Briggs *et al.*, 2004).

Existen diferentes tipos de macerado que se emplean según el tipo de cerveza deseada. Entre los cuales destacan:

- **Macerado por infusión:** Es el más simple. La malta seca y molida se mezcla con agua y se calienta a 65-70°C durante 60 a 90 min.
- **Macerado por infusión escalonada:** Similar al anterior. En este la mezcla se calienta a 50-55°C por 15 a 30 minutos, etapa que se conoce como *protein rest*, en la cual se propicia la degradación de las hordeínas por las proteasas en péptidos y aminoácidos libres que sirven de alimento para las levaduras y constituyen parte del cuerpo de la cerveza y su espuma. Posteriormente la mezcla se eleva a 65-70°C por una hora para degradar el almidón en carbohidratos más simples que serán fermentados.
- **Macerado por decocción:** Es el más complejo. Similar al anterior, pero presenta etapas de calentamiento adicionales (por lo menos tres). En este

proceso se tiene mejor control en la degradación de las proteínas y almidón del endospermo, además de permitir el desarrollo de aromas y sabores característicos. Durante estos cambios de temperaturas a distintos tiempos se favorecen diferentes reacciones enzimáticas (Nájera-Torres, 2017).

A través del macerado se pueden favorecer las actividades de ciertas hidrolasas y así lograr la degradación selectiva del endospermo. En la [Gráfica 1](#) se muestra un macerado de decocción y se indican las temperaturas óptimas para la actividad de las diferentes enzimas hidrolíticas presentes en la malta verde (Nájera-Torres, 2017).



Gráfica 1: Macerado por decocción. Se muestran las actividades favorecidas por diferentes hidrolasas a temperaturas específicas. Tomado de Nájera-Torres (2017).

Al final del macerado, el mosto dulce se separa de los sólidos no disueltos y los granos consumidos. El mosto obtenido es claro y translúcido. Posteriormente, se transporta a un contenedor para hervirse con lúpulo. El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta perenne de la familia Cannabaceae, cuyas bractéolas de las flores femeninas se añaden al mosto dulce para brindarle a la cerveza el característico sabor amargo, provocado por los α-ácidos que en la solución se isomerizan formando los iso-α-ácidos. En un macerado convencional, el lúpulo se hierve con el mosto dulce por 1.5 h a 2 h. Durante la ebullición, un gran número de cambios ocurren en el mosto dulce, como la precipitación de proteínas, obtención de un sabor amargo, aroma y la destrucción de microorganismos. El mosto se filtra para

obtener una solución clara, y se enfría para evitar el oscurecimiento y el cambio de sabor. Durante el enfriamiento, una segunda separación de sólidos ocurre en el mosto, para después inocularse con levadura (Briggs *et al.*, 2004).

Las reacciones bioquímicas que ocurren durante la fermentación son los efectos acumulados del crecimiento de las levaduras en el mosto dulce. Durante este proceso se degradan los azúcares y nutrientes del mosto, se produce etanol, dióxido de carbono y calor. Aproximadamente después de 150 horas una vez completada la fermentación, ésta se detiene manteniendo el mosto a una temperatura de 3°C y la cerveza se mantiene por un periodo de maduración, durante el cual el sabor de la cerveza se define. Después, la mayoría de las cervezas son filtradas o centrifugadas para remover levaduras residuales. Las cervezas completamente translúcidas son carbonatadas y se transfieren a sus contenedores definitivos como barriles, botellas y latas (Fig. 2) (Briggs *et al.*, 2004).

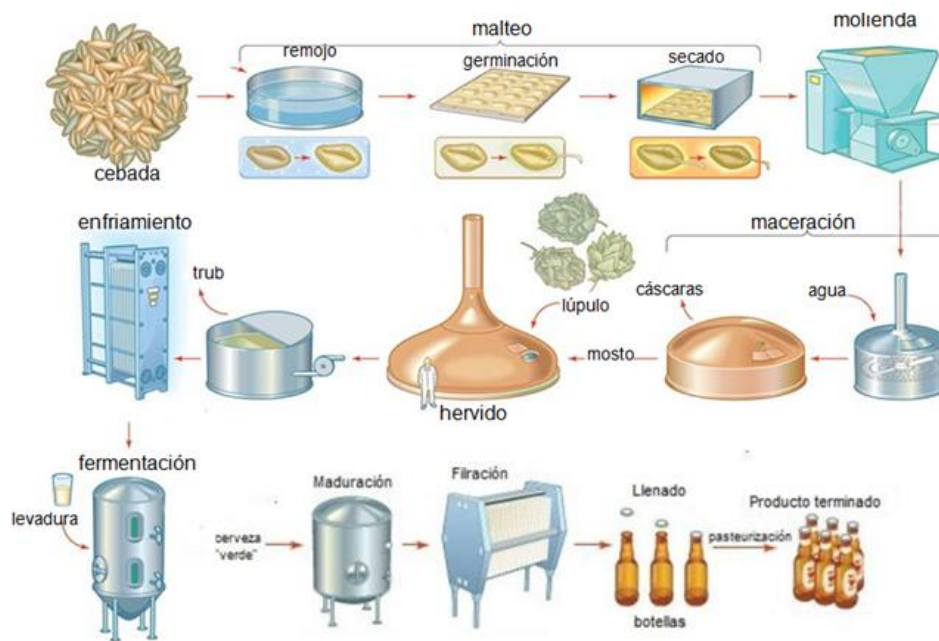


Fig. 2. Distintas etapas del proceso de elaboración de cerveza.

3.2.3 Problemas comunes durante la fabricación de la cerveza

Cuando la malta es adquirida por la cervecería, se necesita que sea de excelente calidad y de precio moderado para que el rendimiento sea bueno y la producción de cerveza se lleve a cabo eficientemente. Hay maltas con diferentes

propiedades que se usan para producir diferentes tipos de cerveza, y los maestros cerveceros deciden con qué malta o mezcla de maltas se hace una cerveza en particular. Sin embargo, no es fácil predecir de forma confiable el desempeño de una malta, en especial porque la calidad de la malta es distinta dependiendo de cada cultivar de cebada. Las maltas procesadas inadecuadamente, poco modificadas, o no homogéneas aumentan los costos de la producción de cerveza, ya que se necesita mayor inversión de tiempo y energía y se necesita utilizar estabilizadores extras para la cerveza o la adición de enzimas al macerado (Briggs *et al.*, 2004).

3.3 Proteínas de almacenamiento de la semilla

La calidad de la malta depende en gran parte del cultivar de cebada utilizada y de la composición de la semilla. Entre los factores más importantes se encuentran la cantidad y actividad de enzimas que degradan el almidón (α y β amilasas) y aquellas que degradan proteínas o β -glucanos. Algunas enzimas se sintetizan *de novo* durante la germinación y otras se encuentran previamente en el grano de forma inactiva. Existe una gran familia de proteínas de almacenamiento, llamadas prolaminas de las que se ha estudiado ampliamente su influencia en algunas características de la malta y la cerveza (Colgrave *et al.*, 2012). Estas proteínas de almacenamiento son una reserva de aminoácidos presente en la semilla de la cual se alimenta la plántula durante el desarrollo embrionario.

Las prolaminas, llamadas así por su alto contenido del aminoácido prolina, están presentes en la mayoría de las semillas de cereales, a excepción del arroz y la avena, en las que predominan las globulinas (Shewry *et al.*, 1995; Kumamaru *et al.*, 2007). Las prolaminas tienen nombres distintos dependiendo del cereal del que se trate. Por ejemplo, a las prolaminas de trigo se llaman gliadinas, las de centeno son las secalinas y a las de cebada se les conoce como hordeínas (Shewry y Tatham, 1990).

3.3.1 Las hordeínas

Las proteínas de reserva de los granos de cebada, mejor conocidas como hordeínas, constituyen aproximadamente el 50 % de la proteína total en las semillas, y son muy ricas en aminoácidos como la prolina y la glutamina. Se dividen en tres tipos según su composición de aminoácidos y masa molecular en: Hordeínas D, que son las de mayor masa molecular (aproximadamente 100 kDa) y poco abundantes; Hordeínas C, con una masa aproximada de 75 kDa, son pobres en azufre, no contienen residuos de cisteína y son incapaces de formar oligómeros; Hordeínas B y γ , que constituyen del 80 al 90 % de las proteínas de almacenamiento, son ricas en azufre y tienen la capacidad de formar puentes disulfuro intra e intercatenarios, por lo que pueden ser monoméricas o poliméricas. Tienen una masa de entre 30 a 50 kDa, siendo las de menor tamaño (Shewry *et al.*, 1995).

A pesar de que se ha intentado encontrar marcadores bioquímicos de la calidad de la malta basados en el contenido proteico, éste al parecer está más relacionado con las condiciones del tiempo de la siembra. Anteriormente se han propuesto a las hordeínas como marcadores bioquímicos para diferenciar la calidad de la malta de cebada de diferentes cultivares, de acuerdo a sus patrones de acumulación. Sin embargo, estos patrones no parecen tener una correlación directa con un buen rendimiento cervecero en los cultivares analizados (Kalinova-Jelezova, 2017). De modo que aún falta analizar otras moléculas que puedan servir como marcadores de una malta de alta calidad.

3.4 Proteasas de cisteína

Las proteasas de cisteína o cisteín-proteasas son comunes en las plantas y se expresan en varios de sus órganos como son las hojas, semillas, raíces, tallos y flores (Müntz *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2003). Las cisteín-proteasas están involucradas en la digestión y modificaciones post-traduccionales de proteínas de reserva (Capocchi *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2003) así como en la respuesta a estrés biótico (Stevens *et al.*, 1996) y la muerte celular programada (Beyene *et al.*, 2006). En algunas semillas como los cereales, las cisteín-proteasas están

involucradas en la digestión de proteínas de reserva durante la germinación, las cuales constituyen una fuente de energía y aminoácidos para la plántula en desarrollo.

3.4.1 La Endoproteasa B

Hasta ahora se conocen dos principales endoproteasas de cisteína encargadas de la degradación de las proteínas de almacenamiento del endospermo de la cebada durante la germinación, las cuales fueron llamadas Endoproteasa A (EPA) (Koehler y Ho, 1988) y Endoproteasa B (EPB) (Koehler y Ho, 1990). Ambas se secretan en el escutelo y la capa de aleurona hacia el endospermo durante la germinación como respuesta a la secreción de GA, mientras que su síntesis es inhibida en presencia de ABA (Koehler y Ho, 1990; Marttila *et al.*, 1995).

La EPB tiene una masa molecular de 30 kDa. La especificidad por sus sustratos se ha determinado de patrones de acoplamiento con proteínas pequeñas como hordotionina, livitida y colecistocinina (Pouille y Jones, 1988; Zhang y Jones, 1996). Aún se sabe poco sobre la especificidad de sustratos de la EPA, aunque se ha demostrado que tanto la EPB como EPA pueden degradar hordeínas (Phillips y Wallace, 1989; Koehler y Ho, 1990a; Koehler y Ho, 1990b).

La familia de la EPB consiste en dos genes muy similares: *EPB1* y *EPB2*, los cuales han sido localizados en el cromosoma tres de cebada. Un hecho muy interesante sobre estos dos genes es que ninguno contiene intrones, una característica muy inusual en genes de eucariontes. Un análisis comparativo de secuencias agrupa a la familia de la EPB como endopeptidasas parecidas a catepsinas-L, y está relacionada con dos proteinasas de cisteína de leguminosas como EP-C1 de *Phaseolus vulgaris* y SHEP de *Vigna mungo*, que también están involucradas en la degradación de proteínas de almacenamiento de las semillas (Mikkonen *et al.*, 1996).

En cebada, la endoproteasa de cisteína B (EPB) es la principal enzima responsable de la degradación de las proteínas de almacenamiento del

endospermo. A las 24 h de germinación, la EPB es sintetizada en el escutelo; sin embargo, posteriormente la capa de aleurona que rodea el endospermo se vuelve el principal tejido que expresa esta enzima. La EPB2 es secretada como una proenzima (pro-EPB2) al endospermo ácido de las semillas en germinación de cebada, en donde adquiere su forma madura activa. Sus principales sustratos son las hordeínas B y γ (ricas en prolina y glutamina), que son las principales proteínas de almacenamiento en el endospermo de la cebada (Jacobsen y Varner, 1967; Koehler y Ho, 1990a, 1990b; Mikkonen *et al.*, 1996).

Experimentos *in vitro* han comprobado que la EPB purificada a partir de malta verde es capaz de degradar hordeínas *in vitro*, incluso cuando se trata de cuerpos proteicos insolubles (Davy *et al.*, 2000). Las hordeínas que se degradan más rápidamente durante el proceso de malteo por la actividad de la EPB son las hordeínas D. Esto puede deberse a su localización en la matriz reticular en la periferia de las proteínas de reserva (Sørensen *et al.*, 1996), o bien a que las hordeínas D son un mejor sustrato. Por otro lado, las hordeínas ricas en azufre forman agregados que se hacen estables mediante enlaces inter e intramoleculares (Rechinger *et al.*, 1993). La capacidad de la EPB de degradar tanto hordeínas C monoméricas como agregados de hordeínas B sugiere que las interacciones proteína-proteína dentro de los cuerpos proteicos son lo suficientemente débiles como para permitir su degradación proteolítica (Davy *et al.*, 2000).

Mikkonen *et al.* (1996) determinaron la secuencia de los genes *EPB1* y *EPB2*, y observaron que la expresión de ambos es regulada por las fitohormonas GA y ABA, y que los promotores de cada gen, son suficientes para conferirles la capacidad de respuesta a dichas fitohormonas.

3.5 Mejoramiento de la cebada

La importancia de mejorar la cebada radica en la necesidad de minimizar los problemas agronómicos en los cultivos, maximizar el rendimiento, mantener o aumentar una producción de malta y cerveza de alta calidad y eficiente. Los métodos tradicionales de selección artificial han ayudado considerablemente a alcanzar estos propósitos y aún siguen siendo los principales métodos de mejoramiento de la cebada y otras especies de cereales. La gran variabilidad genética de la cebada ha permitido la generación de cultivares con características deseadas como la tolerancia al frío, salinidad, sequía y suelos alcalinos. Gracias a ello, ahora es posible cultivar cebada en diversos ambientes (Mrízová *et al.*, 2013). Sin embargo, el mejoramiento tradicional es un proceso muy prolongado, laborioso e impreciso, ya que se basa en la probabilidad de seleccionar combinaciones específicas de genes de una poza génica definida, por medio de cruas definidas a lo largo de varias generaciones, de las cuales se seleccionan los caracteres deseados (Danilova, 2007).

Una forma más rápida de generar plantas con características específicas es mediante la manipulación de los genomas vegetales, que se puede llevar a cabo mediante distintas técnicas biotecnológicas capaces de lograr la expresión estable de un gen introducido y la transmisión a su progenie. Los genes introducidos pueden conferir características como la resistencia a enfermedades y herbicidas, la tolerancia a estrés abiótico, mejorar el rendimiento y calidad de la producción, o inducir la producción de metabolitos secundarios (Mrízová *et al.*, 2013).

El progreso en las técnicas moleculares trae consigo nuevas estrategias para el mejoramiento de la cebada. Por ejemplo, se han producido plantas transgénicas de cebada que contienen un gen para una β -glucanasa termoestable (Jensen *et al.*, 1996; Mammonen *et al.*, 1998), también con el gen de una proteína que las protege del virus BYDV (virus de la cebada enana amarilla), y plantas con una proteína β -amilasa termorresistente, capaz de funcionar incluso durante los procesos de malteo (Kihara *et al.*, 2000).

El desarrollo de métodos eficientes para la transformación y regeneración de especies de interés agrícola es muy importante para usar estas plantas como modelo y poder llevar a cabo su mejoramiento. Sin embargo, la transformación de cereales y otras monocotiledóneas continúa siendo un reto debido a dificultades en la transferencia de DNA y la regeneración *in vitro* de las especies vegetales que se desean transformar. Si bien, es admirable el progreso en la eficiencia de transformación del cultivar modelo "Golden Promise" con el que se ha alcanzado progenie transformada muy estable, este cultivar tiene una pobre o nula importancia comercial. Aún quedan grandes desafíos en la transformación de los cultivares de cebada de importancia en la industria cervecera y otros géneros de cereales importantes de la tribu Triticeae como el centeno, que es altamente recalcitrante a la transformación y regeneración *in vitro* (Mrízová *et al.*, 2017).

3.6 Métodos de transformación de cebada

En las dicotiledóneas, el método de transformación más empleado es la transferencia de DNA mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Los cereales (plantas monocotiledóneas), en un principio no fueron considerados aptos para la transformación mediada por *Agrobacterium*, ya que no son hospederos naturales de esta bacteria (Danilova, 2007). Sin embargo, avances recientes han logrado la transformación de monocotiledóneas como el trigo y la cebada mediante este método (Tingay *et al.*, 1997), así como mediante métodos físicos como la absorción de ADN mediada por polietilenglicol, la electroporación, la microinyección y la biobalística (Mrízová *et al.*, 2017).

La producción de plantas transgénicas requiere que las células de la planta progenitora sean adecuadas para la transferencia de genes, y que esas células sean capaces de regenerar plantas adultas y fértiles. Una de las principales dificultades para la regeneración *in vitro* de los cereales es que los explantes de hoja de estas especies no forman brotes fácilmente, a diferencia de los obtenidos en muchas especies de dicotiledóneas. Como alternativa se han empleado exitosamente embriones inmaduros (Tingay *et al.*, 1997), cultivos embriogénicos de polen (Kumlehn *et al.*, 2006), y óvulos aislados (Holme *et al.*, 2006). El cultivar

"Golden Promise" es el donador favorito de embriones inmaduros, ya que es más dócil en la transformación y regeneración que la mayoría de los cultivares (Hensel *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2004; Holme *et al.*, 2008).

La eficiencia de un protocolo de transformación depende de varios factores como: el establecimiento de una técnica de transferencia de genes reproducible y altamente eficiente; la elección de un explante específico que pueda regenerarse fácilmente; la presencia de un método de regeneración confiable para la especie empleada en la cual se desea introducir el nuevo gen; y la disponibilidad de un método efectivo de selección de las transformantes. Los principales problemas encontrados durante la transformación de cebada son la producción de callos incapaces de regenerar plantas y la producción de plantas albinas (no fotosintéticas) (Mrízová *et al.*, 2013).

Se sabe que la capacidad de regeneración de las plantas transformadas es dependiente del fenotipo, por lo que el establecimiento de una técnica de transformación y regeneración en un cultivar en particular probablemente no sea eficiente o no funcione en otro cultivar diferente (Cho *et al.*, 1998). Hasta la fecha no se han reportado protocolos de transformación para cultivares mexicanos de cebada, así que es necesario hacer estudios para evaluar la capacidad regenerativa y poder elegir un cultivar en específico para establecer un protocolo rutinario de transformación que posteriormente puedan aplicarse para hacer mejoras en la calidad de la malta y cerveza.

3.6.1 Transformación mediante biobalística

La biobalística, también llamada bombardeo de partículas o bombardeo de microproyectiles, es una técnica desarrollada a finales de los 80's, originalmente como una alternativa para la transformación de plantas monocotiledóneas, que se consideraban recalcitrantes a la infección por *Agrobacterium* (Klein *et al.*, 1987; Sanford *et al.*, 1987). Se mostró por primera vez en células de epidermis de cebolla que las partículas aceleradas de tungsteno son capaces de transferir ADN hacia el interior de las células y que podía ser integrado al genoma (Klein *et al.*,

1987). Sin embargo, sólo se consiguió una expresión transitoria debido a que el gen introducido sólo se expresaba en las células vegetativas que fueron golpeadas directamente por las micropartículas. De esta forma, las células y tejidos reproductivos o regenerativos fueron probados como posibles blancos para una transformación estable usando biobalística. En cebada se han utilizado diferentes blancos, como por ejemplo: células en suspensión (Kartha *et al.*, 1989; Mendel *et al.*, 1989), embriones inmaduros, endospermo (Knudsen y Muller, 1991), callo, anteras, embriones derivados de microsporas (Carlson *et al.*, 2001; Jahne *et al.*, 1994; Leckband y Lörz, 1998; Wan y Lemaux, 1994), células de meristemo apical (Zhang *et al.*, 1999) y hojas (Shirasu *et al.*, 1999). Aunque la transformación mediante biobalística se considera dependiente del genotipo y tejido, se ha logrado un mayor éxito cuando se usan embriones inmaduros como blanco. De esta forma, los embriones inmaduros de cebada son considerados como el tejido para transformación más confiable y eficiente al usar técnicas de biobalística (Cho *et al.*, 1998; Kartha *et al.*, 1989; Wan y Lemaux, 1994; McElroy *et al.*, 1997; Harwood *et al.*, 2000; Travella *et al.*, 2005; Ritala *et al.*, 2008).

El paso crítico en la transformación estable de la cebada es la regeneración de plantas transgénicas a partir de los tejidos blanco. Se ha encontrado que la complementación del medio de cultivo con osmolitos como el sorbitol o el manitol aumenta la cantidad de transformantes estables (Kikkert *et al.*, 2004). También la adición de reguladores de crecimiento al medio de regeneración, como 6-bencilaminopurina (BAP) o el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y sales de cobre, mejora significativamente la regeneración de plantas transgénicas (Cho *et al.*, 1998; Harwood *et al.*, 2000).

La mayor desventaja de la transformación mediante biobalística es la posible integración de múltiples copias del transgén que puede llevar al silenciamiento o a la expresión alterada del gen de interés o inestabilidad genética a lo largo de las generaciones (Travella *et al.*, 2005). Otra desventaja de la biobalística es el daño a los tejidos y células que pueden causar los microproyectiles. Sin embargo, la mayoría de los vegetales transgénicos de importancia económica disponibles de

forma comercial fueron desarrollados mediante biobalística (Mrízová *et al.*, 2013). Por otra parte, una desventaja de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es que puede introducir otras secuencias no necesarias para la transformación (DNA plasmídico bacteriano) que pueden producir efectos desconocidos en las plantas transformantes, lo cual ha sido objeto de discusión desde un punto de vista bioético, por lo que es preferible el empleo de técnicas de transformación físicas para generar plantas de importancia agronómica manipuladas genéticamente (Birch, 1997; Permyakova *et al.*, 2009).

4 HIPÓTESIS

La expresión de EPB durante la germinación de semillas es variable en diferentes cultivares de cebada debido a diferencias en elementos reguladores del promotor del gen, de modo que podría utilizarse como un marcador molecular en programas de mejoramiento genético.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la EPB en diferentes cultivares mexicanos de cebada presenta variaciones a nivel genético o de expresión durante la germinación y establecer las técnicas para la transformación genética de un cultivar mexicano.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el patrón de expresión espacio-temporal de la Endoproteasa B.
- Determinar si existen polimorfismos en las secuencias del promotor y la región codificante de *EPB2*, en diferentes cultivares mexicanos de cebada.
- Clonar y evaluar la funcionalidad del promotor de *EPB2*.
- Establecer el protocolo de transformación y regeneración *in vitro* de un cultivar mexicano con importancia en la industria cervecera.

7 METODOLOGÍA

7.1 Determinación de la expresión espacio-temporal de la EPB

Para conocer el patrón de expresión espacio-temporal de la Endoproteasa B, primero se analizaron extractos proteicos de semillas* en diferentes etapas de desarrollo mediante la técnica de Western Blot, y posteriormente se llevó a cabo la localización espacial mediante técnicas de inmunohistoquímica (Inmunolocalización). Para ambas pruebas se usó un anticuerpo específico Anti-EPB (realizado en conejo) previamente sintetizado basado en la secuencia de aminoácidos de EPB2 reportada para el cultivar Himalaya (Koeler y Ho, 1990b). Este anticuerpo reconoce tanto a EPB1 como EPB2, debido a que estas dos proteasas tienen más del 98 % de similitud. Este anticuerpo reconoce la secuencia epítipo de aminoácidos VPANSEEDLA (Fig. 3). Previamente se demostró la funcionalidad y especificidad del anticuerpo para el proyecto “Análisis de marcadores bioquímicos en variedades contrastantes de cebada que impactan la productividad” (Fig. 4) a cargo del Dr. Felipe Cruz García (Datos no publicados).

```
EPB1 MGLLSKLLVASMVAAVLAVAAVELCSAI PMEDKDLESEEALWDLYERWQ
EPB2 MGLLSKLLVASMVAAVLAVAAVELCSAI PMEDKDLESEEALWDLYERWQ
*****
EPB1 SAHRVRRHHA EKHRRF GTFKSN AHFI HSHNKR GDHPYRLHLNRF GDM DQA
EPB2 SAHRVRRHHA EKHRRF GTFKSN AHFI HSHNKR GDHPYRLHLNRF GDM DQA
*****
EPB1 EFRATFV GDLRRDTP AKPPSVPGFMYAALNVSDLPPSV DWRQKGAVTG VK
EPB2 EFRATFV GDLRRDTP SKPPSVPGFMYAALNVSDLPPSV DWRQKGAVTG VK
*****
EPB1 DQKKGSCWAFSTVVSVEGINAIRTGSLVSLSEQELIDCDTADNDGCQGG
EPB2 DQKKGSCWAFSTVVSVEGINAIRTGSLVSLSEQELIDCDTADNDGCQGG
*****
EPB1 LMDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGTCNVARAAQNSPVVVIDGHQD
EPB2 LMDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGTCNVARAAQNSPVVVIDGHQD
*****
EPB1 VPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFMFYSEGVFTGDCGTELDHGVA
EPB2 VPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFMFYSEGVFTGECGTELDHGVA
*****
EPB1 VVGYGVAEDGKAYWTVKNSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEAS
EPB2 VVGYGVAEDGKAYWTVKNSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEAS
*****
EPB1 YPVKTYN--KMPRRALGAWESQ
EPB2 YPVKTYSKPKTPRRALGARES L
*****
Epítipo anti-EPB
```

Fig. 3: Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de EPB1 y EPB2, se observa la gran similitud entre ambas proteasas, en rojo se resalta la secuencia epítipo que reconoce el anticuerpo Anti-EPB.

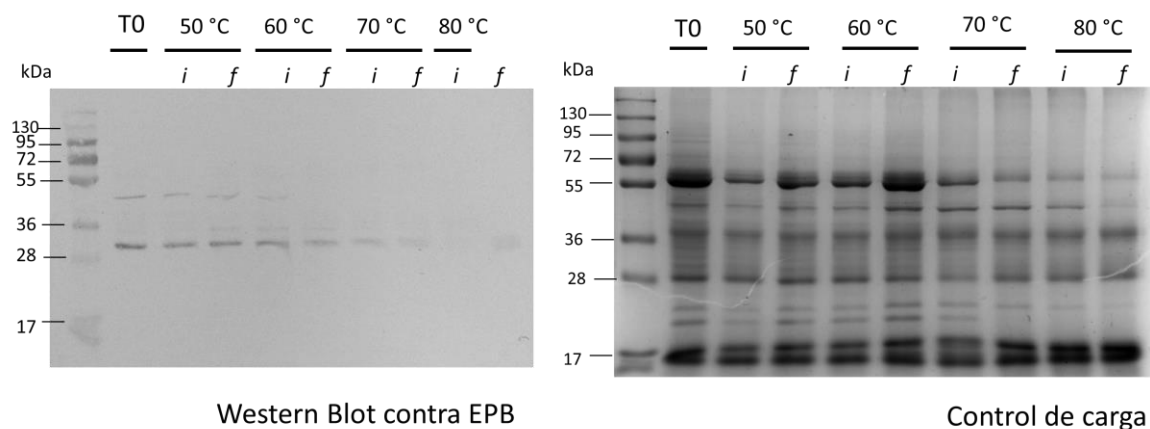


Fig. 4. Detección de EPB en diferentes etapas de macerado del cultivar Esmeralda (Cruz-García *et al.*, no publicado).

7.1.1 Extracción de proteína total de semillas de cebada

*Nota: Se usará el término “semillas” para referirse a las cariósides de cebada.

Se analizaron extractos de proteínas de diferentes tejidos de la planta (tallo, hoja y raíz), de semillas* en diferentes etapas de maduración (semillas* inmaduras de 7 y 21 días post-antesis), semillas* maduras sin germinar (secas), malta verde proporcionada por la empresa Impulsora Agrícola S. A. de C. V., cuyo tiempo de imbibición se desconoce, y semillas* con tiempos de imbibición conocidos (16, 24, 40, 48 y 72 h).

Para la preparación de extractos proteicos de tejidos de planta, se colectó un gramo de tejido (raíz, tallo y hoja) y se homogeneizó con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, hasta formar un polvo fino, el cual fue suspendido en 2 mL de buffer de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 7, 50 mM NaCl, 1 % Tritón X-100 y 5 mM 2-mercapto-etanol). La mezcla se transfirió a microtubos de 1.5 mL y se agitó con ayuda de un vórtex durante 5 min. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Se colectó el sobrenadante y se guardó en alícuotas de 200 μ L a -80°C hasta su posterior uso.

Para la elaboración de extractos proteicos de semillas* de cebada, se colectaron semillas* inmaduras en dos etapas diferentes (7 y 21 días post-antesis). Debido a

que la maduración de las semillas* ocurre de manera asincrónica en las espigas, las semillas inmaduras se midieron antes de utilizarse con el fin de analizar semillas en la misma etapa, de modo que el tamaño del fruto fue el criterio de madurez. Se seleccionaron semillas* localizadas en la parte media de la espiga, con una longitud de 5 mm y un grosor de 3 mm a los 7 días post-antesis, a las cuales se les denominó “semilla inmadura 1”. Por otra parte, se seleccionaron semillas a los 21 días post-antesis con 10 mm de longitud y 5 mm de grosor y se les denominó “semilla inmadura 2” (Fig. 5).

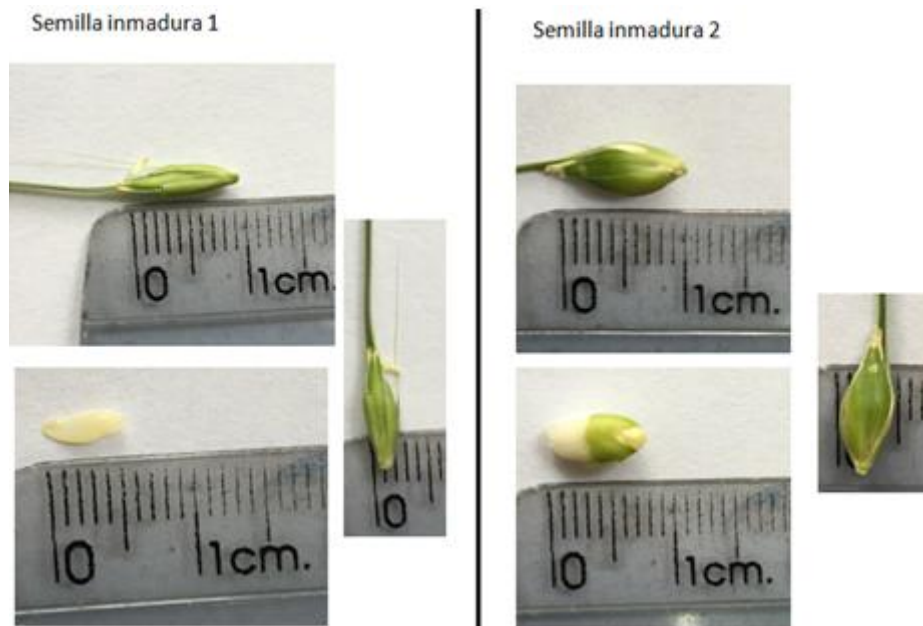


Fig. 5. Desarrollo de las semillas a los 7 días post-antesis (Semilla inmadura 1) y a los 21 días post-antesis (Semilla inmadura 2).

Para germinar las semillas* maduras se colocaron en toallas de papel húmedas cubiertas con plástico (Ega-Pack®) a una temperatura constante de 25°C en condiciones de luz, y se colectaron a 16, 24, 40, 48 y 72 h de imbibición para la extracción de proteínas (Fig. 6).



Fig. 6: Desarrollo de las plántulas de cebada a diferentes tiempos de imbibición de las semillas.

La extracción de proteínas de semillas* se realizó triturando 1 g de tejido congelado con nitrógeno líquido en un mortero, en caso de que presentaran radículas o la plántula emergiendo, éstas fueron retiradas previamente con un bisturí. El polvo obtenido se mezcló con 2 mL de buffer de extracción de proteína (5 mM 2-mercaptoetanol, 1 % Tritón X-100 en buffer de fosfatos salinos (PBS) 1x). Posteriormente, la mezcla se transfirió a tubos de 2 mL en donde fue agitada con ayuda de un vórtex y posteriormente se centrifugó durante 10 min. a 1400 rpm para eliminar los restos sólidos. El sobrenadante transparente se transfirió a tubos limpios y se conservó a -20°C hasta su posterior uso. La concentración de proteína en los extractos se cuantificó mediante la técnica Bradford, con una curva de calibración hecha con BSA (albúmina de suero bovino) a una concentración de $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$. En una placa ELISA Corning Costar® (96-well), se colocaron 150 μL de Bradford 1x en 9 pozos de la placa y la curva de calibración con BSA fue de 0 a 8 μg , y se cuantificaron en un espectrofotómetro Epoch-Biotek®. Mediante el programa Microsoft Excel se calculó la ecuación de la recta a partir de los resultados de espectrofotómetro y se calcularon las concentraciones para los diferentes extractos.

7.1.2 Inmunodetección de EPB en diferentes tejidos etapas de desarrollo de las semillas

Los extractos de proteína total se separaron mediante electroforesis en un gel de acrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), que consta de un gel apilador con una concentración de acrilamida al 4 % y un pH de 6.8 y de un gel separador con una concentración de acrilamida al 12 % y pH 8.8, de acuerdo a la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970; He, 2011). Se hicieron geles por duplicado, un gel para observar a las proteínas teñidas con azul de Coomassie y otro para transferir las proteínas a una membrana de PVDF (Immobilon®) con el fin de realizar la inmunodetección de proteínas en membrana mediante un ensayo de tipo Western Blot.

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, éstas se incubaron en una solución de bloqueo (5 % leche en polvo Svelty®, 0.1 % Tween-20® en PBS 1x) en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron en el anticuerpo primario (anti-EPB realizado en conejo, diluido 1:10000 en la misma solución de bloqueo descrita anteriormente), en agitación constante a 4°C durante una noche. Posteriormente las membranas se lavaron tres veces en una solución de 0.1 % Tween-20 en PBS 1x, seguido de un lavado con únicamente PBS 1x. Cada lavado duró 10 min en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron en el anticuerpo secundario (Anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1:10000 en solución de bloqueo). Las membranas se dejaron en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS 1x adicionado con 0.1 % Tween-20 y posteriormente un lavado en PBS 1x, en agitación a temperatura ambiente.

Para revelar las membranas, se incubaron durante 10 min en agitación a temperatura ambiente en un amortiguador con pH 9.5 (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) y posteriormente se incubaron en una solución de revelado elaborada con 10 mL de buffer pH 9.5, 100 µL de NBT (33 mg/mL en 70 % DMSO) y 100 µL de BCIP (17 mg/mL en 100 % DMSO). Una vez que

aparecieron bandas definidas de color morado en las membranas, se transfirieron a un contenedor con agua y EDTA 1 % para detener la reacción de revelado.

7.1.3 Inmunolocalización de EPB en tejidos de semilla de cebada

Para determinar la localización espacial de la EPB en los tejidos de la semilla de cebada, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica (inmunolocalización). Para ello, se colectaron semillas de cebada a diferentes tiempos de imbibición (0, 24 y 48 h) y fueron fijadas en una solución de 4 % formaldehído disuelto en PBS (1x), a 4°C durante una noche. A las semillas se les hizo una pequeña incisión con un bisturí para aumentar la infiltración de la solución fijadora. Después de la fijación, las semillas fueron enjuagadas cinco veces con buffer PBS, durante 5 min en cada lavado. Posteriormente, las semillas se deshidrataron en una serie gradual de menor a mayor concentración de etanol (30, 50, 70, 85, 96 y 100 %) durante 2 h en cada una de las concentraciones, pero cambiando la solución por una nueva cada hora. Pasando la deshidratación progresiva, las semillas permanecieron en etanol absoluto durante toda la noche. Al siguiente día, las semillas se transfirieron a Slide-Brite® (sustituto de xilol) de forma gradual, empezando con soluciones de etanol: Slide-Brite® en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3, durante 40 minutos en cada una a temperatura ambiente. Después se transfirieron a una solución de Slide-Brite® al 100 % durante 35 minutos a temperatura ambiente. Las semillas se incluyeron en una mezcla de Paraplast® y Slide-Brite® 1:1 durante una noche a 70°C y posteriormente en Paraplast® 100 % durante 3 días, en una estufa a 70°C. Finalmente, las semillas se montaron en cubos de Paraplast® y se realizaron cortes histológicos de 12 µm de grosor en un microtomo. Los primeros cortes se montaron con grenetina disuelta en el baño de flotación en cubreobjetos sin carga, con el fin de realizar tinciones de safranina-verde rápido, según el protocolo de López-Curto *et al.* (2005), con el fin de evaluar la integridad del corte histológico y verificar que las células y tejidos de interés (embrión y capa de aleurona) se observan claramente en la posición que fue hecho el corte. Una vez verificada la integridad y posición de los cortes, éstos se repitieron en el microtomo, y esta vez se montaron en portaobjetos especiales con

carga (Premiere® 9308) para retener los cortes sin necesidad de usar grenetina, la cual puede interferir con el proceso de inmunolocalización.

Los cortes montados en los portaobjetos cargados para la inmunolocalización se desparafinaron en una estufa a 70°C durante 1 h. Inmediatamente después de sacarlos de la estufa, se lavaron dos veces con Slide Brite® y se hidrataron progresivamente en concentraciones decrecientes de etanol (100 %, 96 %, 70 %, 50 % y 30 %) y al final se enjuagaron dos veces con PBS 1X, cada enjuague duró 5 min. Una vez hidratados los cortes, se delimitó el área del corte con un marcador hidrofóbico (Pan Pen®), marcando un círculo alrededor del corte, dentro de este círculo se agregaron aproximadamente 300 µL de solución de bloqueo (BSA 10 % en PBS 1X) y los cortes se incubaron por 1 h dentro de una cámara húmeda. Se realizaron tres enjuagues de 5 min cada uno con PBS 1X, y se agregó el anticuerpo primario (Anti-EPB realizado en conejo, a concentración 1:200 en solución de bloqueo de BSA 10 % en PBS), se dejó incubar una noche a 4°C dentro de una cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron tres enjuagues de 5 minutos cada uno con PBS 1X, y se agregó el anticuerpo secundario (IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa-568®) y los cortes se incubaron a 4°C en oscuridad durante 4 h en una cámara húmeda. Se realizaron tres enjuagues de 5 min cada uno con PBS 1X. Las preparaciones se montaron con un medio de montaje y conservación que contiene DAPI (DAPI Fluoromount-G, Electron Microscopy Sciences, Cat. #17984-24).

Las preparaciones se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su posterior observación en microscopía confocal.

7.2 Extracción de DNA genómico de cebada

Para llevar a cabo las técnicas de biología molecular, se extrajo DNA genómico de cebada de los cultivares Esperanza, Armida, Adabella, Alina, Esmeralda y Metcalfe, a partir de hojas de plantas adultas cultivadas en condiciones de invernadero. La técnica para la extracción de DNA es la siguiente:

1. Se calentaron C 5 mL de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl pH 6, 1.5 M NaCl, 2 % CTAB, 50 mM EDTA, 50 mM DTT) a 65° en tubo Falcon de 15 mL en baño maría.
2. Se trituró 1 g de hojas de cebada (2 hojas adultas aproximadamente) con nitrógeno líquido en un mortero.
3. Se agregó 10µL de β-mercaptoetanol al buffer previamente calentado y se agregó el tejido triturado.
4. Se mezcló y se incubó a 65°C por 30-40 minutos, agitando cada 5 min.
5. Se filtró la mezcla con ayuda de una gasa y un embudo y se transfirió a un tubo nuevo para retirar el debris.
6. Se agregó un volumen de PCI (Fenol, cloroformo, alcohol isoamílico; Sigma-Aldrich®) (aprox. 4 mL) y se mezcló suavemente.
7. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min.
8. Se tomó la fase superior y se colocó en un tubo nuevo.
9. El tubo se dejó reposar algunos minutos a 4°C.
10. Se agitó formando un remolino para hacer que las fibras de DNA se precipiten y se fueran al fondo. En caso de que no hubiera precipitación, el tubo se enfrió a -20°C por varias h y se centrifugó.
11. Se realizó una decantación con cuidado sin perder las fibras.
12. Se lavó el botón con 10 mM acetato de amonio diluido en etanol al 70 % se agitó.
13. Se centrifugó 5 min a 2000 rpm.
14. Se eliminó el alcohol y se dejó secar el precipitado.
15. Se agregó 1 mL de agua destilada esterilizada o TE y se suspendió manualmente.
16. Se agregó 10 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 20 min.
17. Se agregó 1 volumen de PCI, se agitó y se centrifugó. Se tomó 0.8 mL de la parte superior, se colocó en un tubo nuevo y se precipitó con acetato de sodio 3 M (80µL) y con 0.6 mL de isopropanol.
18. Se dejó enfriar a -20°C hasta que se precipitara el DNA. Se retiró el líquido y resuspendió con 0.5 mL de agua o TE.

19. Se hicieron alícuotas de 50 o 100 μ L que se mantuvieron a -20°C hasta su posterior uso o bien a -80°C en caso de ser almacenado por largos periodos de tiempo.

7.3 Clonación y análisis de EPB2 de diferentes cultivares de cebada

Para determinar si existen polimorfismos del gen *EPB2* en los diferentes cultivares de cebada utilizados en la industria cervecera mexicana, se clonaron las regiones promotoras y las regiones codificantes de *EPB2* de los siguientes cultivares: Armida, Esperanza, Adabella, Alina, Esmeralda y Metcalfe. Para llevar a cabo la clonación, se amplificó este gen a partir de DNA genómico mediante PCR. Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos a partir de la secuencia de *EPB2* reportada para el cultivar Himalaya (Koehler y Ho, 1990) (Fig. 7):

Forward PEPB2 5'(CACC)TCCACGGTATGTCGGTGCATTG'3

Reverse EPB2 5'TCACAGTGA CTCCCTGGCTCCAAG'3,

La amplificación se produjo desde el sitio -844, en donde se tiene reportada la región promotora, hasta el codón de paro de la región codificante. El resultado de la amplificación por PCR es un producto de aproximadamente 1966 pb. Cabe resaltar que el gen EPB2 no contiene intrones. El oligonucleótido *forward* contiene la secuencia CACC que fue adicionada para introducir el producto amplificado al vector de clonación Gateway pENTR™/D-TOPO®.



Fig. 7. Gen reportado de *EPB2* del cultivar Himalaya (Koehler y Ho, 1990). Se muestra la región promotora (negro), la caja TATA (verde), las regiones 5'UTR y 3'UTR (azul) y el marco de lectura abierto (rojo).

El DNA genómico de cebada de los cultivares Esperanza, Armida, Adabella, Alina, Esmeralda y Metcalfe extraídos previamente se usaron como templados para la PCR con los oligonucleótidos descritos anteriormente. La mezcla y condiciones de reacción se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Mezcla de reactivos utilizada en la técnica de PCR

Reactivo	Concentración final
Oligonucleótido <i>Forward</i>	0.5 µM
Oligonucleótido <i>Reverse</i>	0.5 µM
JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich) adicionada con 10 nM dNTP's y 15 mM MgCl ₂	1X
DNA molde	100 ng
Volumen final	10 µL

Tabla 2. Condiciones de la amplificación por PCR

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	10 s	40 ciclos
Alineamiento	58°C	1 min	
Elongación	72°C	2 min	
Elongación final	72°C	7 min	1

Los productos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz ultravioleta. Una vez verificado el tamaño de los productos amplificados, se purificaron a partir del gel usando el Kit *Agarose Gel Extraction* como se describe a continuación:

1. Se cortó el área del gel que contiene el producto de PCR y se colocó en un tubo de 1.5 mL.
2. Se añadieron 3 volúmenes de Extraction Buffer por cada 100 mg de gel y se incubaron a 60°C durante 10 minutos, mezclando ocasionalmente para disolver el gel.
3. Se colocó la columna sobre el tubo colector y se activó añadiendo 100 µL de Activation Buffer. Se centrifugó a 10000 g por 30 s.
4. Se añadió la mezcla del paso 2 en la columna activada, se centrifugó a 10000 g por 30 s y se eliminó el sobrenadante.
5. Se Centrifugó adicionalmente por 2 minutos para remover residuos.
6. Se transfirió la columna a un microtubo de 1.5 mL y se añadieron 30-50 µL de agua directamente en la matriz. Se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min para eluir. Se almacenó DNA a -20°C.

Estos productos purificados del gel fueron utilizados para introducirlos en el vector de clonación pGEM®-T Easy Vector (Fig. 8), mediante una reacción de ligación que se describe a continuación:

En tubos de 0.5 mL de capacidad, se agregaron 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 0.5 µL de pGEM®-T Easy Vector, 1.5 µL del producto de PCR purificado de gel y

0.5 μL de T4 DNA Ligase, resultando un volumen final de 5 μL . Se mezclaron las reacciones mediante pipeteo y se incubaron a 25°C durante una hora.

Con los productos de las reacciones de ligación se transformaron bacterias de *E. coli* quimiocompetentes (cepa One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Thermo Fisher Scientific®) mediante la técnica de choque térmico descrita a continuación:

1. Centrifugar brevemente los tubos que contienen las reacciones de ligación y colocarlos en hielo.
2. Dejar descongelar en hielo los tubos necesarios con las células One Shot (un tubo por cada transformación).
3. Agregar 2 μL de la reacción de ligación dentro de los tubos con las células competentes y mezclar suavemente (no pipetear). El resto de la reacción de ligación puede almacenarse a -20°C
4. Incubar los tubos por 30 min en hielo.
5. Incubar exactamente por 30 s a 42°C en un *Heat Block* o baño maría. No agitar.
6. Colocar los tubos nuevamente en hielo y añadir 250 μL de medio S.O.C. a cada tubo en condiciones de asepsia para evitar la contaminación del medio debido a que éste debe permanecer estéril.
7. Colocar los tubos en una incubadora con agitación. Incubar a 37°C por una hora a 225 rpm.
8. Pasado el tiempo, tomar 20-200 μL del cultivo y colocarlo en cajas Petri con medio LB selectivo y dispersar mediante perlas de cristal esterilizadas.
9. Colocar las cajas Petri boca abajo e incubar en una estufa a 37°C durante toda la noche.
10. Seleccionar colonias para analizarlas mediante PCR, extracción de plásmido o secuenciación.

Este vector contiene a los promotores bacterianos T7 y SP6 que dirigen la expresión del gen *LacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa, y dentro de la región codificante de ésta, se encuentra la región de inserción del fragmento a

clonar, de modo que la inactivación de esta enzima causada por la inserción de la secuencia clonada permite reconocer directamente a las colonias recombinantes en un medio selectivo indicador (medio LB suplementado con ampicilina 100 mg/mL y el sustrato X-gal 40 mg/mL), de modo que las colonias que no fueron transformadas presentaron un color azul oscuro, mientras que aquellas que tuvieron el inserto fueron de color blanco.

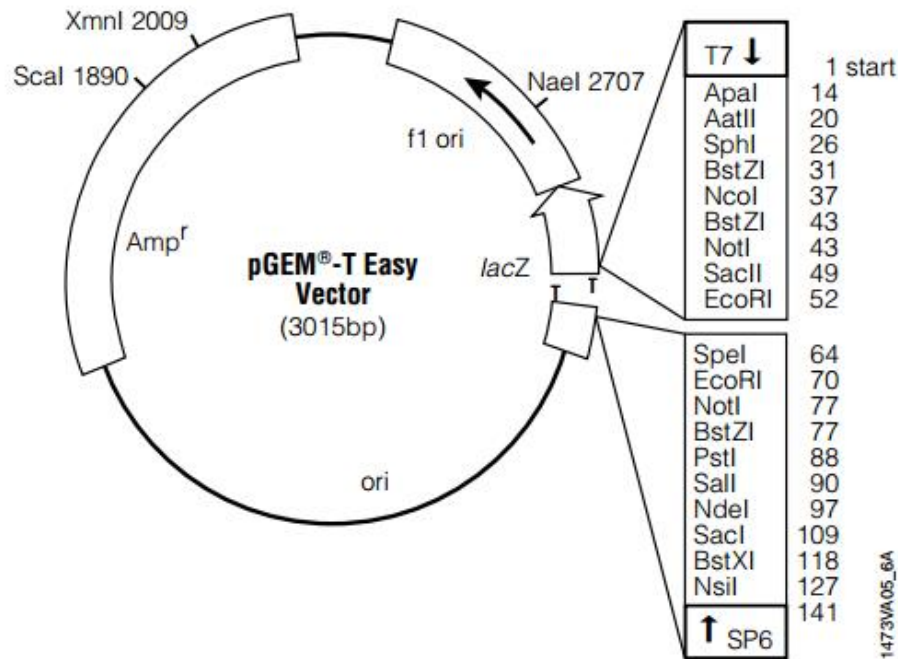


Fig. 8. Mapa y puntos de referencia del vector de clonación pGEM®-T Easy.

Una vez transformadas las cepas de *E. coli*, se analizaron por lo menos tres colonias blancas para verificar que contenían el inserto de interés. Esto se realizó mediante la extracción de plásmidos a partir de cultivos axénicos, su análisis por PCR y la digestión con la enzima de restricción EcoRI.

Para realizar los cultivos axénicos, en condiciones de asepsia se seleccionaron tres colonias de cada caja Petri y se tomó un poco de cada una con un palillo esterilizado (un palillo diferente para cada colonia), el cual fue depositado en un tubo de ensayo con tapa, con 3 mL de medio líquido selectivo (LB suplementado con ampicilina 100 mg/mL). Los tubos se incubaron en agitación a 37°C durante

toda la noche. Del cultivo se extrajo DNA plasmídico con ayuda del Kit *Gene All: A plasmid miniprep*.

Se utilizaron los plásmidos purificados como templado de PCR usando los oligonucleótidos *Forward PEPB2* y *Reverse EPB2*, en las condiciones descritas anteriormente (Tabla 1 y 2). Se descartaron los plásmidos de aquellas colonias que no amplificaron el producto esperado, y los plásmidos restantes se utilizaron nuevamente para llevar a cabo un análisis de restricción utilizando la enzima EcoRI, la cual tiene un sitio de corte en las regiones adyacentes a donde se insertó el producto de PCR. La mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción EcoRI se detalla en la [tabla 3](#).

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción EcoRI

Reactivo	Cantidad
NE Buffer ECoRI 10X	3 µL
EcoRI	0.5 µL
DNA plasmídico	5 µL
Agua	21.5 µL
TOTAL	30 µL

La reacción de digestión se incubó a 37°C durante 2 h y posteriormente se separó electroforéticamente en gel de agarosa al 1 % en TAE.

Una vez verificada la clonación de *EPB2* de los seis cultivares, se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, para su posterior análisis.

Se realizaron alineamientos de las secuencias obtenidas mediante el software Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu>) y se analizaron los promotores buscando motivos de unión a factores de transcripción de plantas mediante el software Softberry (www.softberry.com).

7.4 Clonación del promotor de EPB2 en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®

Para evaluar la funcionalidad de la región promotora del gen *EPB2* en cultivares mexicanos de cebada, se amplificó su promotor (del cultivar Esperanza) a partir de DNA genómico. Basándonos en la secuencia reportada de la región promotora de *EPB2* del cultivar Himalaya (Koehler y Ho, 1990), se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar dicha región:

Forward PEPB2: 5' CACCTCCACGGTATGTCTGGTGCATTG 3'

Reverse PEPB: 5' CGTGTAGTTCAGTACCACGATCGAG 3'

La mezcla de reactivos para la PCR es la misma que la descrita anteriormente en la Tabla 1, mientras que las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de la amplificación por PCR del promotor de EPB2

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min.	1
Desnaturalización	95°C	30 s.	35 ciclos
Alineamiento	58°C	1 min.	
Elongación	72°C	1 min.	
Elongación final	72°C	7 min.	1

El producto de la amplificación se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE adicionados con bromuro de etidio y visualizados en luz ultravioleta. Una vez verificado el tamaño del producto amplificado, se purificó a partir del gel usando el Kit *Agarose Gel Extraction*.

El producto de PCR purificado de gel, se insertó en el vector de clonación Gateway *pENTR™/D-TOPO* (Fig. 9). Con este sistema los insertos son clonados en la orientación correcta y con una alta eficiencia, esto se logra añadiendo cuatro bases (CACC) el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido *forward*.

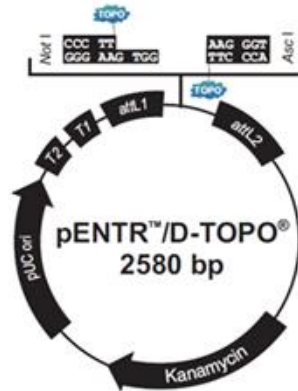


Fig. 9. Representación gráfica del vector de Clonación pENTR/D-TOPO

La mezcla de reactivos para llevar a cabo la reacción de clonación TOPO se describe en la tabla 5.

Tabla 5: reacción de clonación pENTR/D-TOPO

Reactivos	Cantidad
Producto de PCR purificado de gel	4 μ L
Solución salina	1 μ L
Vector TOPO®	1 μ L
Total	6 μ L

Dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente durante una noche. El producto de esta reacción (*pENTR/D-TOPO::PEPB2*, Fig. 10) se utilizó para transformar cepas quimiocompetentes de *E. coli* (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Thermo Fisher Scientific®) mediante la técnica de choque térmico, previamente descrita. Las células transformadas se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo sólido selectivo (LB suplementado con kanamicina 50 mg/mL).

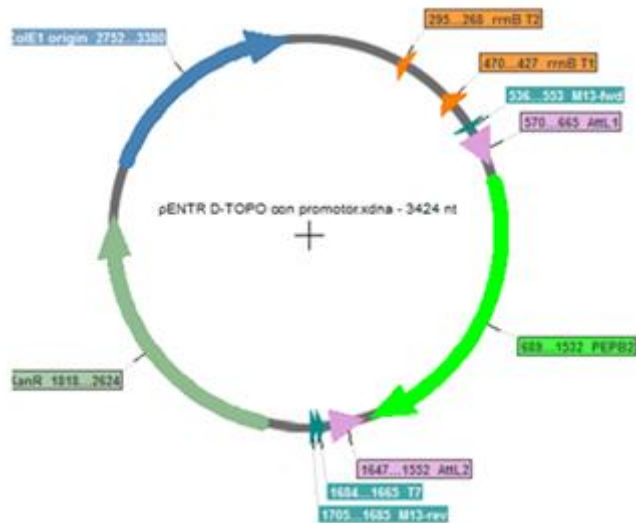


Fig. 10. Construcción *pENTR/D-TOPO::PEPB2*

Para verificar la introducción del inserto en las colonias que crecieron en el medio selectivo y descartar posibles falsos positivos, se seleccionaron cinco colonias que crecieron en las cajas Petri para iniciar cultivos axénicos en suspensión. Se seleccionaron cinco colonias de cada caja Petri y se tomó un poco de cada una con un palillo esterilizado (un palillo diferente para cada colonia), el cual fue depositado en un tubo de ensaye con tapa con 3 mL de medio líquido selectivo (LB suplementado con kanamicina 100 mg/mL). Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación constante. Posteriormente se aisló DNA plasmídico de las diferentes colonias con ayuda del kit Zyppy™ Plasmid Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se analizó el ADN plasmídico mediante los cortes con la enzima de restricción MluI y mediante PCR usando los oligonucleótidos diseñados para el promotor de *EPB2* y para *M13*, y se verificó el tamaño del producto. La PCR se llevó a cabo con la mezcla de reactivos y condiciones descritas anteriormente. La mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción MluI se detalla en la tabla 6. La reacción de digestión se incubó a 37°C durante 2 h y posteriormente se separó electroforéticamente en gel de agarosa al 1 % en TAE.

Tabla 6. Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción MluI

Reactivo	Cantidad
Buffer 3.1	3 μ L
MluI	1.5 μ L
DNA plasmídico	5.5 μ L
Agua	20 μ L
TOTAL	30 μ L

Con ayuda del software Serial Cloner (serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) se predijo el sitio de corte de esta enzima en el plásmido y se calculó el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión.

Una vez confirmado el tamaño del amplificado y del producto de la digestión por restricción, se secuenció y se confirmó la identidad del inserto.

7.5 Clonación en el vector binario de expresión *pBGWFS7*

Una vez obtenida la clona de entrada (*pENTR/D-TOPO::PEPB2*), se continuó con la reacción de recombinación (LR). En este caso, el vector binario de destino del Sistema Gateway® fue *pBGWFS7* (Fig. 11), cuya longitud es de 12,451 pb. Este vector destino es un vector de expresión que permite probar la actividad promotora de una secuencia introducida, haciendo que ésta dirija la expresión de los genes reporteros *EGFP* (por sus siglas en inglés Enhanced Green Fluorescent Protein) y *gus* (β -glucuronidasa) y posee los sitios *attR1* y *attR2*, los cuales recombinan a través de la reacción LR con los sitios *attL1* y *attL2* del vector de entrada *pENTR™/D-TOPO®*. De esta manera ocurre el intercambio de secuencias entre la secuencia promotora del vector de entrada y la secuencia del gen letal, *ccd*, del vector destino, de modo que sólo las colonias con el plásmido recombinante pueden sobrevivir y crecer.

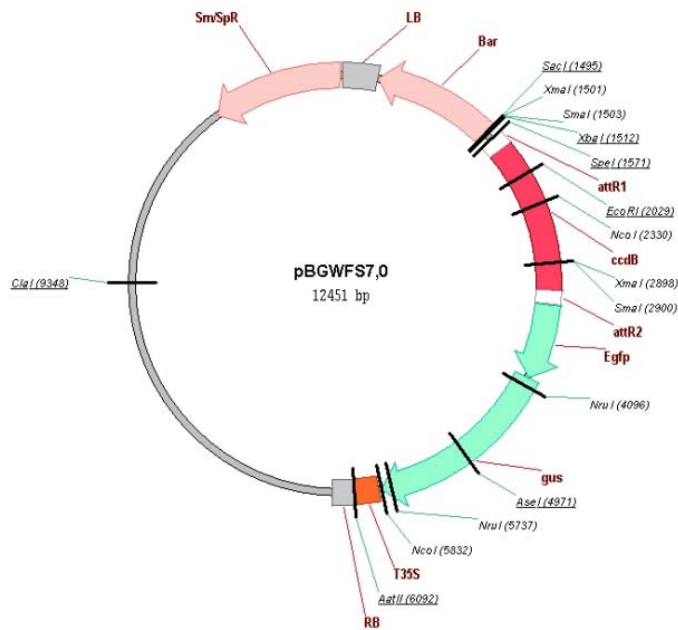


Fig. 11. Representación gráfica del vector de destino pBGWFS7.

La reacción de recombinación LR mediada por la Clonasa II se llevó a cabo conforme a las instrucciones del proveedor. La mezcla de reactivos para dicha reacción se detalla en la tabla 7.

Tabla 7: Reacción de clonación pENTR/D-TOPO

Reactivos	Cantidad
Vector de entrada (pENTR::PEPB2)	7 μ L
Vector de destino (pBGWFS7)	1.5 μ L
Clonasa II	0.5 μ L
Total	9 μ L

Dicha mezcla se incubó a 25°C durante 2 h. El producto de esta reacción (pBGWFS7::PEPB2, Fig. 12) se utilizó para transformar cepas quimiocompetentes de *E. coli* (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Thermo Fisher Scientific®) mediante la técnica de choque térmico, previamente descrita. Las células transformadas se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo sólido selectivo (LB suplementado con espectinomicina 50 mg/mL). El vector pBGWFS7, confiere resistencia bacteriana a espectinomicina, además, a la vez que posee a la secuencia del gen *bar* bajo el promotor constitutivo de la

Nopalina Sintasa (NOS), el cual le confiere resistencia al tejido vegetal transformado al herbicida BASTA®, cuyo ingrediente activo es glufosinato de amonio.

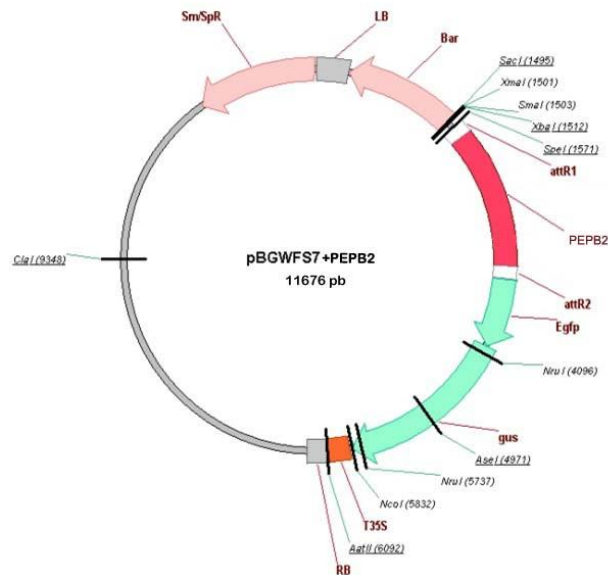


Fig. 12. Representación gráfica de la construcción *pBGWFS7::PEPB2*

Se seleccionaron tres colonias que crecieron en las cajas Petri para iniciar cultivos axénicos en suspensión para verificar la introducción del inserto y descartar posibles falsos positivos. Se tomó un poco de cada colonia con un palillo esterilizado (un palillo diferente para cada colonia), el cual fue depositado en un tubo de ensaye con tapa, con 3 mL de medio líquido selectivo (LB suplementado con espectinomicina 100 mg/mL). Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación constante. Posteriormente se aisló DNA plasmídico de las diferentes colonias con ayuda del kit Zyppy™ Plasmid Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se analizó el ADN plasmídico mediante la enzimas de restricción AatII y SacI y mediante PCR usando los oligos diseñados para el promotor de *EPB2*. La mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción MluI se detalla en la tabla 8. La reacción de digestión se incubó a 37°C durante

toda la noche y posteriormente se separó electroforéticamente en gel de agarosa al 1 % en TAE.

Tabla 8. Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando las enzimas de restricción AatII y SacI

Reactivos	Cantidad
Buffer CutSmart 10X	3 μ L
AatII	0.5 μ L
SacI	0.5 μ L
DNA plasmídico (pBGWFS7::PEPB2)	5 μ L
Agua	21 μ L
Total	30 μ L

Con ayuda del software Serial Cloner (serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) se predijo el sitio de corte de esta enzima en el plásmido y se calculó el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión. La PCR se llevó a cabo con la mezcla de reactivos y condiciones descritas anteriormente.

Una vez que se confirmó la presencia del inserto en el vector de destino en por lo menos una colonia transformante, ésta se seleccionó para elaborar un Maxi Prep (Ver Anexo), con el fin de purificar una gran cantidad de este plásmido para ser empleado en la transformación de tejidos vegetales, ya que para transformar mediante biobalística, se necesita que el plásmido tenga una concentración de 1000 ng/ μ L.

7.6 Generación de la construcción para la sobreexpresión de la EPB2

Una vez confirmada la funcionalidad del promotor de *EPB2*, se decidió hacer una construcción para sobreexpresar este gen bajo el control de su mismo promotor. Para ello se amplificó el gen de *EPB2*, desde la región promotora, ubicada aproximadamente en el sitio -844 pb, hasta el codón de término ubicado en la región codificante, utilizando DNA genómico de cebada del cultivar Armida como templado con los oligonucleótidos Forward PEPB2 y Reverse EPB2 previamente descritos, usando las condiciones de amplificación de la Tabla 1.

Una vez generado el producto de PCR, éste se purificó de gel (como ya se describió anteriormente) para después introducirlo en el vector de clonación

pENTRTM/D-TOPO (como se describió anteriormente), de esta forma se creó la construcción *pENTR::EPB2*, la cual fue utilizada para introducirla en *E. coli* mediante choque térmico para su clonación. A partir de las colonias transformantes se realizaron cultivos axénicos en suspensión a los cuales se les extrajo DNA plasmídico para verificar la inserción de la secuencia, la cual fue confirmada mediante ensayos de digestión con la enzima de restricción NcoI y mediante PCR.

La mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción NcoI se detalla en la tabla 9. La reacción de digestión se incubó a 37°C durante una noche y posteriormente se separó electroforéticamente en gel de agarosa al 1 % en TAE. Con ayuda del software Serial Cloner (serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) se predijo el sitio de corte de esta enzima en el plásmido y se calculó el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión. La PCR se llevó a cabo con la mezcla de reactivos y condiciones descritas anteriormente (Tabla 1 y 2).

Tabla 9. Mezcla de reactivos para la digestión de DNA plasmídico usando la enzima de restricción NcoI

Reactivo	Cantidad
Buffer CutSmart	3 µL
NcoI	0.5 µL
DNA plasmídico	5 µL
Agua	21.5µL
TOTAL	30 µL

Posteriormente, se secuenció el gen clonado en *E. coli* para verificar la secuencia del inserto. Después se introdujo el inserto en el vector de expresión pBGWFS7, mediante una reacción de recombinación LR usando la enzima LR clonase II (usando la metodología descrita anteriormente). De esta forma se hizo la construcción *pBGWFS7:EPB2* (Fig. 13), la cual confiere resistencia a espectinomicina, además, posee a la secuencia del gen *bar*, el cual confiere resistencia al herbicida Basta®. Con esta construcción se dirige la expresión del gen *EPB2* bajo su propio promotor y se espera aumentar la dosis génica para

lograr la sobreexpresión de la enzima EPB2. Se hizo un Maxiprep con este plásmido y se bombardearon embriones inmaduros y callos derivados de éstos con la construcción *pBGWFS7::EPB2*.

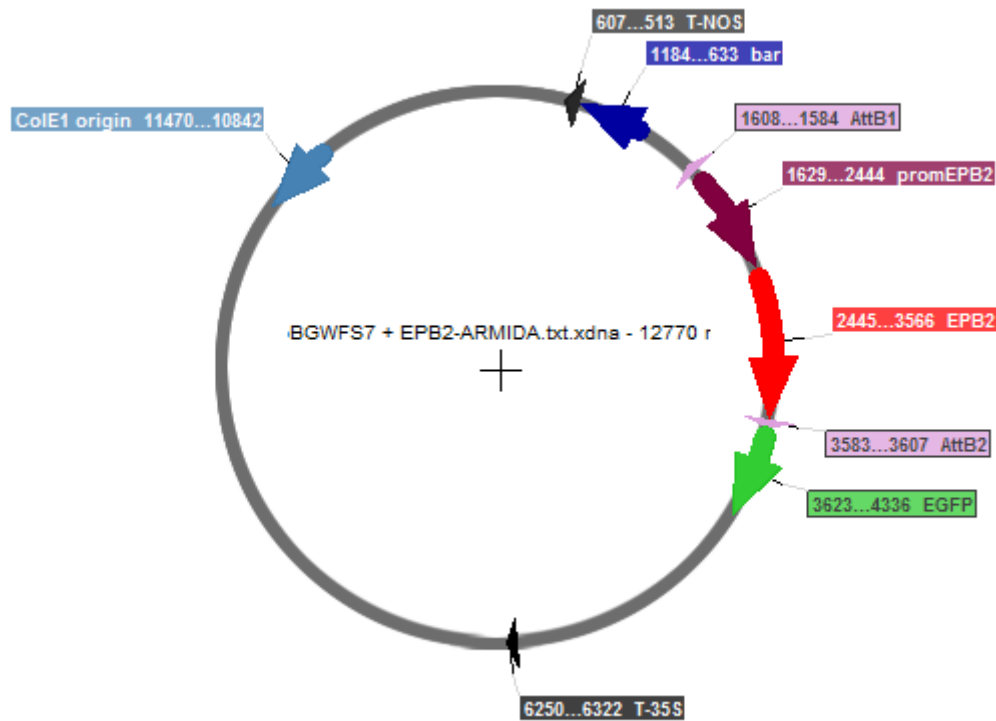


Fig. 13. Representación gráfica de la construcción *pBGWFS7::EPB2*

7.7 Cultivo de tejidos vegetales de los callos de cebada

Callos de cebada de la línea celular S3 fueron proporcionados por el Laboratorio 116 de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. Los callos fueron obtenidos de embriones maduros. Los cultivos fueron mantenidos en crecimiento durante 3-4 meses en medio N6P (Guerrero-Andrade, 1998) previo a la transformación genética.

Plantas de cebada los cultivares Armida y Esperanza fueron cultivadas a partir de semillas en condiciones de invernadero. Se extrajeron embriones inmaduros de las cariósides en desarrollo entre los 7 a 13 días post-antesis. Debido al

crecimiento asincrónico de las cariósides en una misma espiga, fue posible encontrar embriones con diferentes etapas de desarrollo, de modo que sólo se seleccionaron los que estaban dentro del rango de 1.5 a 3 mm de longitud. Para la obtención de los embriones, las cariósides fueron esterilizadas con etanol al 70 % durante 1 minuto, posteriormente con hipoclorito de sodio comercial (6 % cloro activo) al 20 % y Tween-20 0.01 % durante 5 minutos, y se les dieron cuatro lavados con agua destilada esterilizada. Las cariósides fueron disectadas con bisturí y pinzas estériles. Los embriones se cultivaron en un medio de inducción de callo que consistió de medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con maltosa (30g/L), tiamina-HCl (1mg/L), myo-Inositol (0.25g/L), caseína hidrolizada (1g/L), prolina (0.69 g/L) y Dicamba (2.5 mg/L) como regulador de crecimiento (ver Anexo III), según lo descrito por Wan y Lemaux (1994), y se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad.

Después de 4 días en el medio de inducción de callo se observó la germinación de los embriones y el crecimiento del coleóptilo, el cual fue removido con bisturí junto con el resto del eje embrionario para promover el crecimiento de callo embriogénico a partir del escutelo. Los callos permanecieron en oscuridad de dos a tres meses en el medio de inducción y fueron subcultivados cada 2 o 3 semanas antes de ser sometidos a la transformación por biobalística o a su posterior subcultivo en medio de regeneración.

7.8 Preparación de las micropartículas de tungsteno

1. Agitar la solución de micropartículas (30 mg/mL de micropartículas en 50 % glicerol) por 5 minutos en vórtex.
2. Preparar alícuotas de 50 µL en tubos de 1.5 mL dando vórtex continuo para maximizar la uniformidad de las balas.
3. Agregar 5 µL de DNA plasmídico (1000 ng/µL) en la pared del tubo, posteriormente 50 µL de CaCl₂ (2.5 M) sin que toque el DNA y finalmente 20 µL de espermidina (0.1 M) junto al CaCl₂ y arrastrar toda la mezcla hasta el fondo del tubo en donde se encuentran las micropartículas.

4. Homogeneizar mediante agitación suave. Fijar unión incubando 1 min en hielo.
5. Lavar las balas recubiertas con DNA antes de colocarlas sobre el *macrocarrier*. Para ello es necesario centrifugarlas a máxima velocidad durante 1 min y desechar el sobrenadante.
6. Añadir 140 μ L de etanol 70 %, agitar suavemente, centrifugar y desechar sobrenadante.
7. Añadir 140 μ L de etanol absoluto, agitar suavemente, centrifugar y desechar sobrenadante.
8. Resuspender en 48 μ L de etanol absoluto
9. Aplicar 10 μ L de balas recubiertas sobre el *macrocarrier* previamente montado en el *macrocarrier holder*. Esperar 5 minutos a que el etanol se evapore.

7.9 Transformación de callos por biobalística

La transformación se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 13 cm entre el filtro del dispositivo de bombardeo y el tejido blanco, con un vacío de 20-22 in Hg. Se tomaron los callos cuatro días después de su subcultivo y se colocaron, un día antes del bombardeo, en cajas Petri de 60 x 15 mm con 15 mL de medio gelificado con 2.8 g/L de Gel-gro. Se colocó una porción extendida de callo embriogénico de 1 cm de diámetro (una capa delgada de aproximadamente 3 mm de espesor) en el centro de la caja. Una vez bombardeados los callos, se sellaron las cajas y se mantuvo en incubación a 25°C en oscuridad. 15 días después del bombardeo se eligieron al azar algunos callos para observar la expresión de la proteína EGFP, mediante microscopía confocal y de fluorescencia, y se realizaron pruebas histoquímicas para detectar al gen reportero *gus* (ver Anexo). Los callos que no fueron sometidos a estas pruebas se subcultivaron nuevamente a medio de inducción de callo, esta vez suplementado con el herbicida BASTA a una concentración de 3 mg/L, durante dos meses subcultivándolos cada dos semanas, descartando el callo que mostrara oxidación. Por otra parte algunos otros callos no fueron sometidos al medio de selección y se

subcultivar directamente al medio de regeneración. Siguiendo esta misma metodología, se bombardearon semillas de cebada (cultivar Esmeralda) a las 24 h de imbibición para observar la expresión transitoria de *gus* dirigido por el promotor de EPB2 en tejidos de semilla.

7.10 Regeneración de callos de cebada, elongación y aclimatación de plantas regeneradas a condiciones *ex vitro*

Para la regeneración de plantas de cebada a partir de callos, los callos de diferentes cultivares fueron subcultivados a medio de regeneración descrito por Marthe *et al.* (2015) (ver Anexo) en condiciones de luz. Las plantas regeneradas de callo que surgieron entre las 2 y 3 semanas permanecieron en el medio de regeneración por aproximadamente 4 semanas y posteriormente fueron subcultivadas a un medio de elongación (MS suplementado con AIB 1 mg/L y BA 1mg/L) para inducir el enraizamiento durante dos meses. Pasado este tiempo, las plantas regeneradas se pasaron a macetas con sustrato compuesto por Peat Moss, tierra negra y vermiculita (1:1:1) y se mantuvo la humedad cubriéndolas con plástico durante una semana. Posteriormente, se les retiró el plástico y las plantas crecieron en condiciones de invernadero.

8 RESULTADOS

8.1 La EPB se expresa específicamente en semillas entre las 40 y 72 h post imbibición.

Los ensayos de detección de EPB mediante Western Blot indican que no se encuentra presente en tejidos de raíz, tallo, hoja, semillas* inmaduras, ni semillas* maduras (secas). Esta proteasa únicamente fue detectada en malta verde como se observa en la Fig. 14. Cabe resaltar que la malta verde evaluada fue proporcionada por la empresa Impulsora Agrícola S. A. de C. V., y se desconoce el tiempo exacto de imbibición de estas semillas*. Estos resultados demuestran que EPB no se detecta en los órganos vegetativos de la planta, y que su expresión se encuentra regulada finamente, ya que a pesar de ser una proteasa específica de las semillas de cebada, su expresión no se observa hasta que ocurre la germinación, lo cual reafirma su papel en la degradación de las reservas proteicas del endospermo.

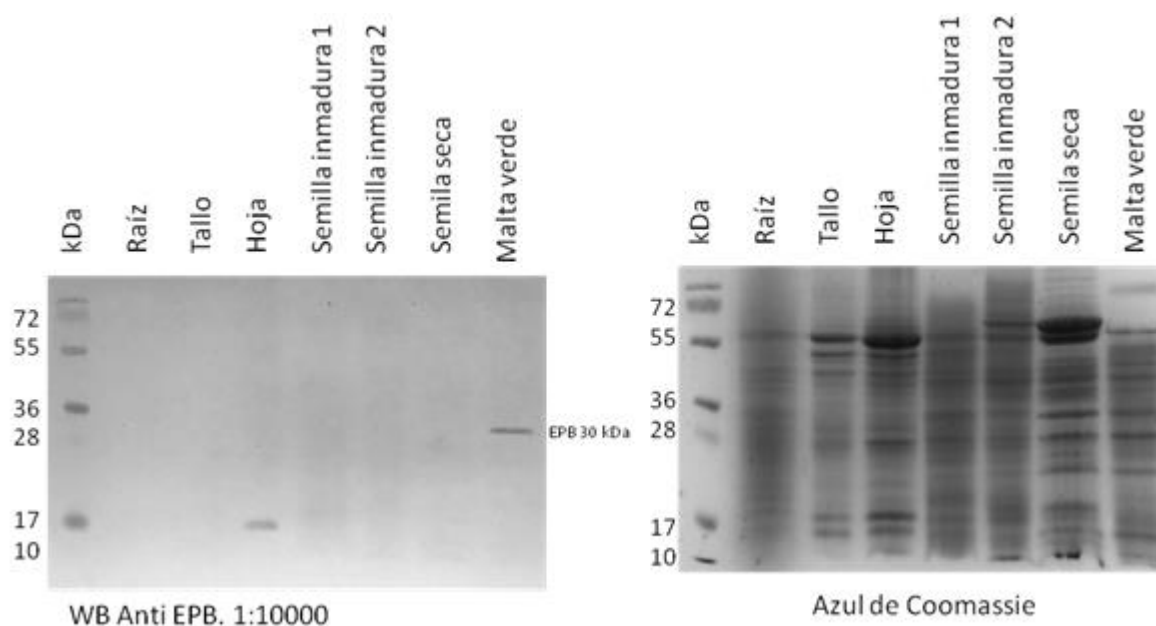


Fig. 14. Presencia de la EPB en diferentes tejidos de cebada (Cv. Esperanza). En la izquierda se muestra la inmunodetección de EPB, la cual sólo se expresa en extracto de malta verde. A la derecha se muestra un gel teñido con azul de Coomassie como control de carga (30 µg de proteína total por carril)

*El término "semillas" se usará para referirse a cariósides o granos de cebada.

Con el fin de conocer el patrón de expresión temporal de EPB, se realizó otro ensayo de Western Blot, utilizando extractos proteicos de semillas con diferentes tiempos de imbibición, en el cual fue posible observar que la EPB empieza a expresarse a partir de las 40 h de imbibición e incrementando su expresión hacia las 72 h (Fig. 15). Este mismo patrón de expresión fue observado en todos los cultivares analizados (Fig. 16), aunque en algunos cultivares como Armida, Esmeralda y Metcalfe se aprecia una ligera expresión de EPB en etapas más tempranas como a las 24 h de imbibición.

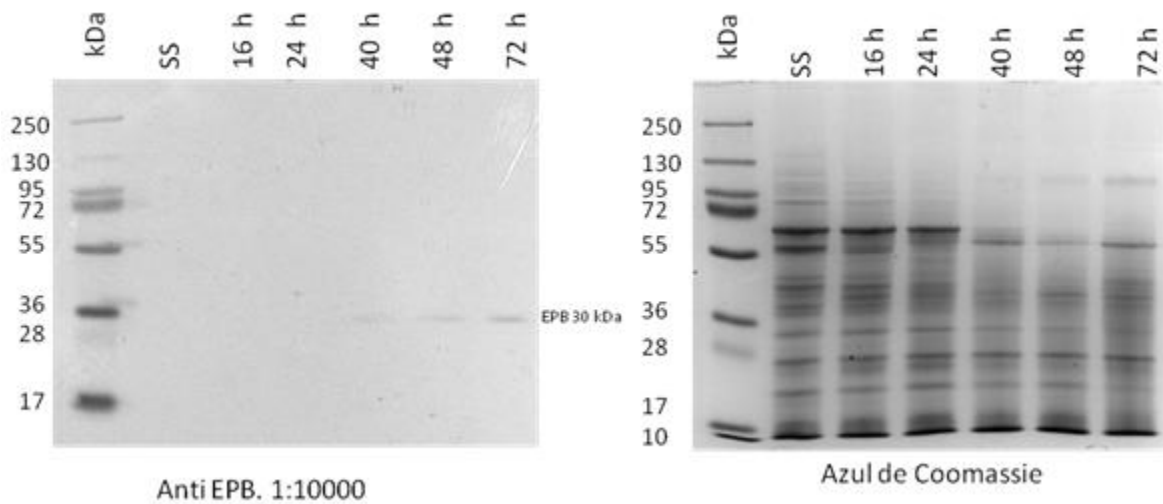


Fig. 15. Inmunodetección de EPB en semillas a diferentes tiempos de imbibición (cv. Esmeralda) y gel teñido con azul de Coomassie como control de carga. Se utilizan 30 μ g de proteína total por carril.

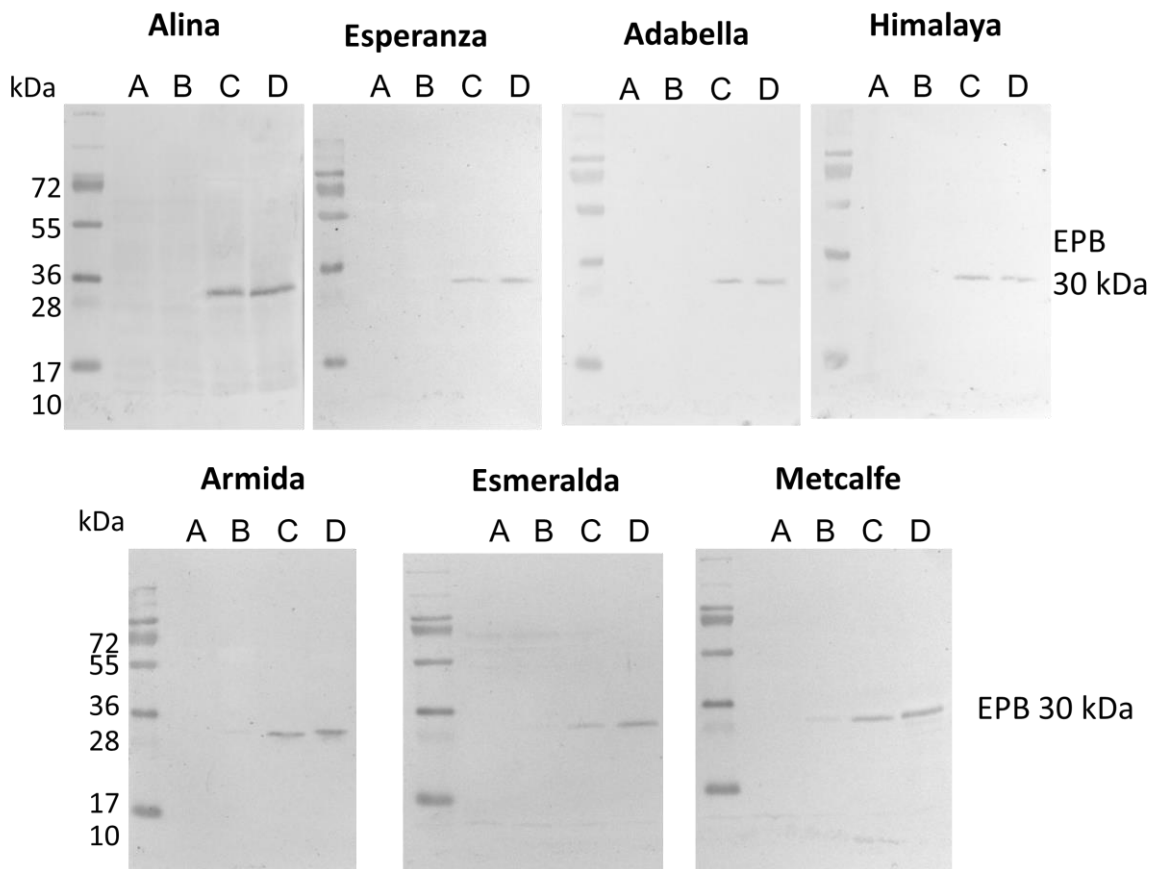


Fig. 16. Patrón de expresión temporal de EPB en diferentes cultivares a diferentes tiempos de imbibición: A= 0 h; B=24 h; C=48 h; D=72 h. Se observan bandas tenues a las 24 h en los extractos de Armida, Esmeralda y Metcalfe (abajo), mientras que en el resto se observan bandas definidas únicamente hasta las 48 h (arriba).

Para evaluar si la expresión de EPB varía en diferentes cultivares se realizó un ensayo de Western Blot usando extractos de semillas a las 72 h de imbibición, que es cuando se observó la mayor expresión de esta proteasa. En el caso de los cultivares Adabella e Himalaya, se detectó una menor cantidad de EPB, lo cual fue observado en varias repeticiones (Fig. 17). La expresión reducida en estos dos cultivares podría implicar que el mecanismo de regulación de expresión de EPB se encuentra afectado o presenta variaciones en comparación con el resto de los cultivares. Estos resultados también sugieren que los cultivares Adabella e Himalaya podrían ser menos aptos para su uso como malta en la industria cervecera o bien que tienen proteasas distintas para favorecer el uso de las proteínas almacenadas.

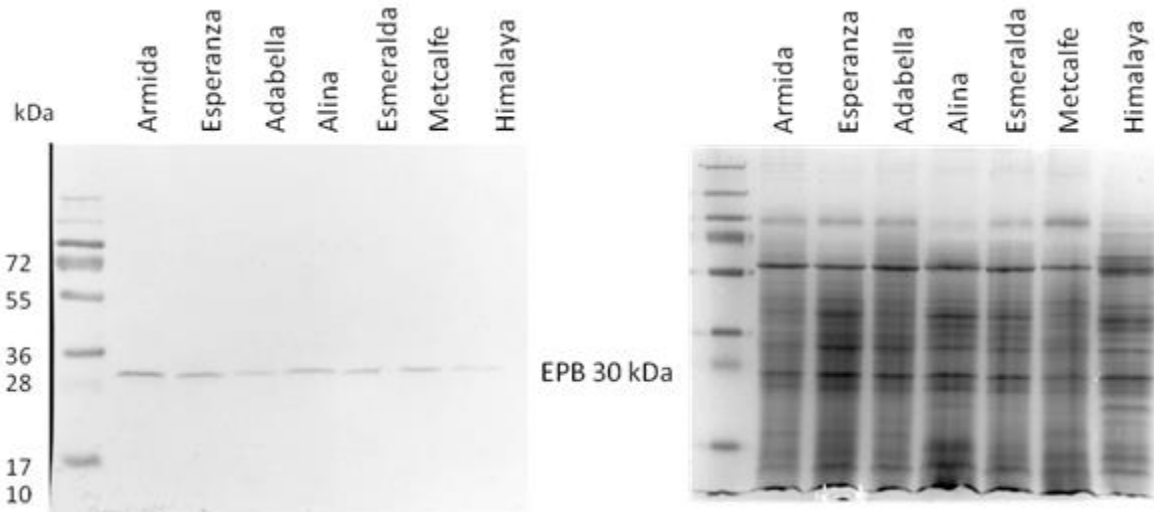
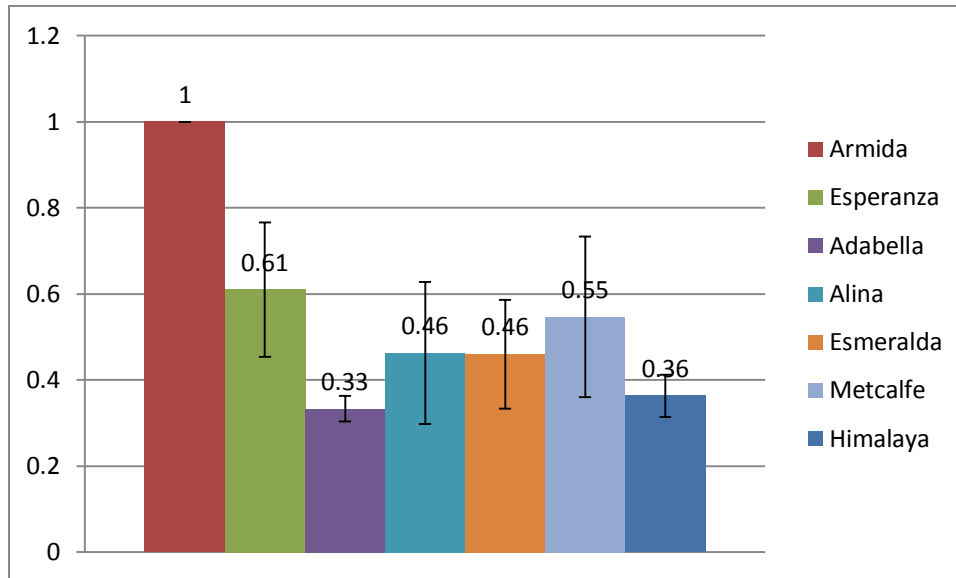


Fig. 17. Comparación de la expresión de EPB en granos de diferentes cultivares a las 72 h de imbibición. En esta inmunodetección (izquierda) se observa una menor expresión de EPB en los cultivares Adabella e Himalaya. En la derecha se muestra un gel teñido con azul de Coomassie como control de carga. Se cargaron 30 µg de proteína total por carril.

Las réplicas del análisis por Western Blot permitieron hacer una comparación mediante densitometría (*Gráfica 2*) de las bandas correspondientes a EPB. Se puede observar que el cultivar Armida fue el que presentó las bandas con mayor intensidad en todas las réplicas, por lo cual se tomó como referencia y se normalizó su valor como 1, para comparar las densidades del resto de los cultivares con respecto a éste. Se observó que las variedades Adabella e Himalaya presentan la menor intensidad, con valores relativos promedio de 0.33 y 0.36.



Gráfica 2. Abundancia relativa de EPB en los diferentes cultivares de cebada a las 72 h de imbibición con respecto al cultivar Armida. Las gráficas muestran el promedio de tres réplicas.

8.2 Anatomía y metabolismo de la semilla de cebada tras la imbibición.

Asimismo, para determinar el patrón de expresión espacial, se realizaron inmunolocalizaciones en los tejidos del embrión (escutelo) y de la capa de aleurona a diferentes tiempos de imbibición. Además, se hizo una tinción con safranina-verde rápido con el fin de evaluar la integridad del tejido (Fig. 18). La tinción con safranina nos permite observar núcleos y células en división (metabólicamente activas), mientras que el verde rápido evidencia el tejido parenquimatoso. Con esta técnica se pudo apreciar claramente la capa de aleurona que está formada por dos o tres capas de células metabólicamente activas, y que en tejidos embrionarios como el escutelo, el coleóptilo y la coleorriza hay una intensa actividad de división celular a las 24 h de imbibición.

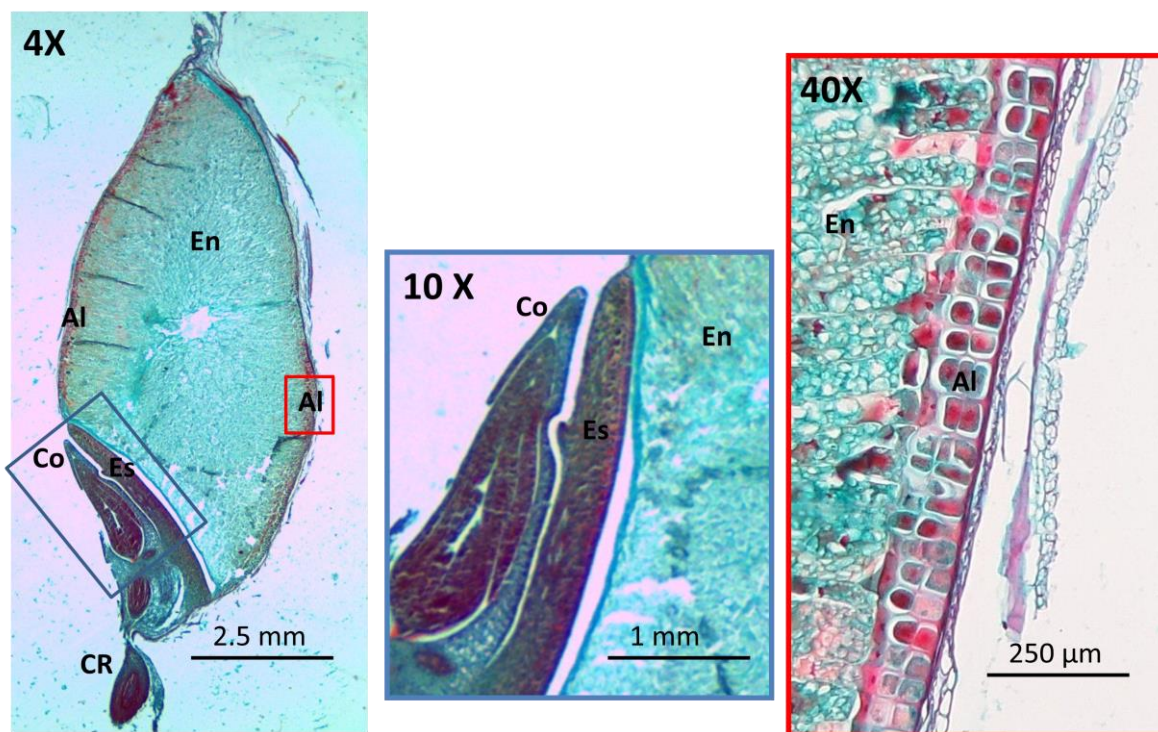


Fig. 18. Tinción con safranina-verde rápido de un corte histológico longitudinal de un grano de cebada (cv. Esmeralda) a las 24 h de imbibición. En = Endospermo; Al = Aleurona; Es = Escutelo; Co= Coleóptilo; CR = Coleoriza.

8.3 Localización espacial de EPB en semillas de cebada

El patrón de expresión de EPB a lo largo de la germinación también fue evaluado mediante inmunolocalización usando el anticuerpo Anti-EPB (diluido 1:200). Con el fin de verificar que el anticuerpo secundario (anti conejo conjugado al fluoróforo ALEXA 568) no interactuaba de manera inespecífica con los tejidos de los cortes histológicos, se hicieron varias réplicas de las inmunolocalizaciones, algunas sin usar el anticuerpo primario (anti EPB elaborado en conejo), estas inmunolocalizaciones servirían como control negativo, de modo que la fluorescencia observada en la longitud de 568 nm en estas pruebas, correspondiente a ALEXA 568, sería atribuida a interacciones inespecíficas.

En las imágenes de la [Figura 19](#) se observa que el anticuerpo secundario reacciona con los tejidos de la cubierta seminal, lo cual es más o menos constante en todos los tiempos de imbibición evaluados. No se observaron señales inespecíficas en el interior de las células de la capa de aleurona ni en el

endospermo. La tinción con DAPI se hizo para facilitar la visualización de los núcleos y distinguir las células de la aleurona del tejido muerto del endospermo.

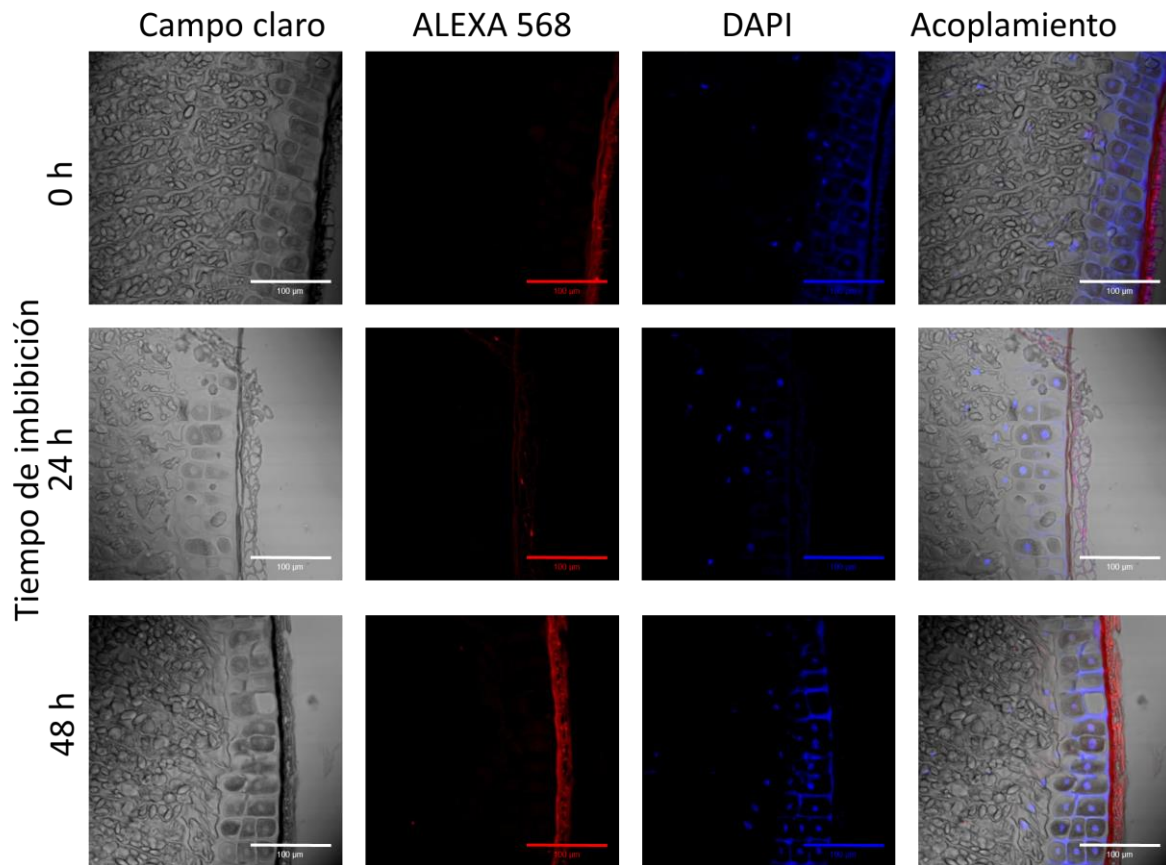


Fig. 19. Controles negativos de la inmunolocalización (sin anti-EPB). Se observa una interacción inespecífica (rojo) del anticuerpo secundario (ALEXA 568) con los tejidos de la cubierta seminal en todos los tiempos de imbibición de las semillas analizadas. No se observa interacción inespecífica alguna dentro de las células de la aleurona ni en el endospermo. En azul se observan los núcleos. Barra = 100 µm.

La expresión temporal de EPB es similar a la observada en los ensayos de Western Blot; sin embargo, esta técnica es más sensible y permitió observar la presencia de EPB en etapas más tempranas como a las 24 h de imbibición, algo que no se apreciaba de forma clara en las inmunodetecciones mostradas anteriormente, e incluso fue posible observar una señal débil de esta proteasa en semillas secas (0 h de imbibición), como se observa en la Fig. 20.

En esta imagen también se aprecia que la EPB se acumula abundantemente en la capa de aleurona a las 48 h de imbibición de las semillas y en ínfimas o nulas cantidades a las 0 y 24 h.

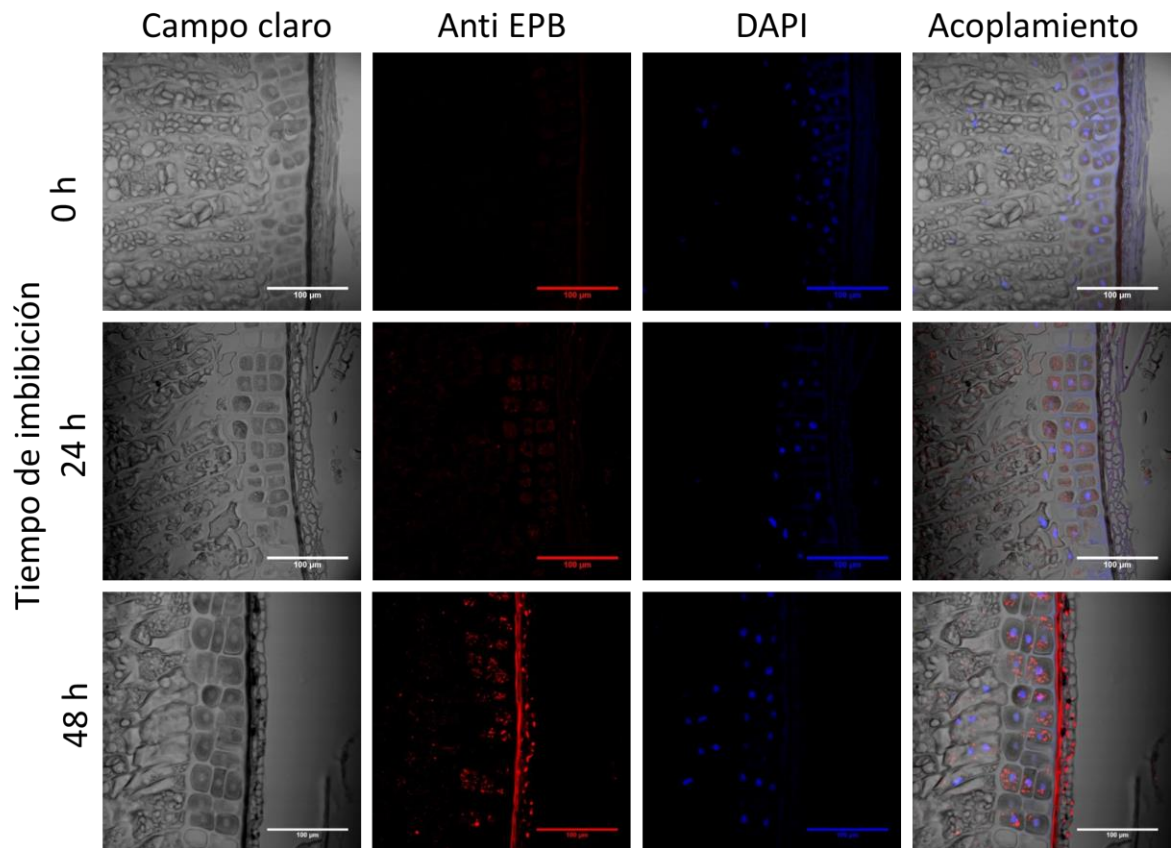


Fig. 20. Localización espacial de EPB en células de aleurona a diferentes tiempos de imbibición (Cv. Esmeralda). Barra = 100 µm.

En un análisis más detallado se observaron patrones que sugieren que la EPB se produce en el interior de las células de aleurona y que posteriormente se transporta o se secreta hacia el endospermo (Fig. 21).

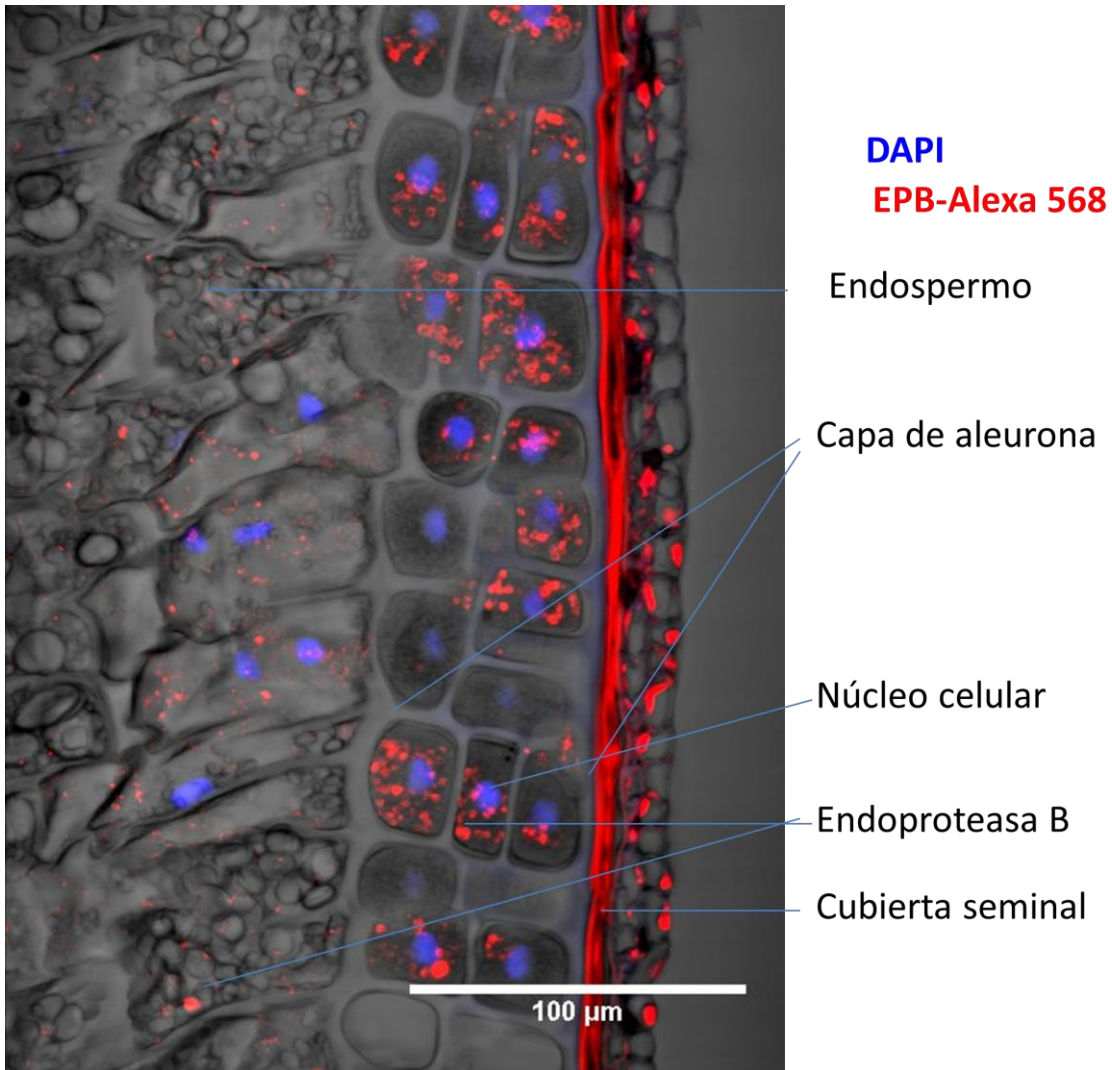


Fig. 21. Expresión de la EPB (rojo) en la capa de aleurona a las 48 h de imbibición y su secreción hacia el endospermo. En color azul se muestran los núcleos.

Las observaciones realizadas en microscopía confocal permitieron observar que la EPB también se expresa en otros tejidos. Si bien la capa de aleurona produce cantidades importantes de esta proteasa después de las 48 h de imbibición, a partir de las 24 h de imbibición el escutelo también produce cantidades apreciables de esta enzima. Es importante destacar que la presencia de EPB en el escutelo presenta el nivel más alto a las 24 h de imbibición y que después disminuye considerablemente (Fig. 22).

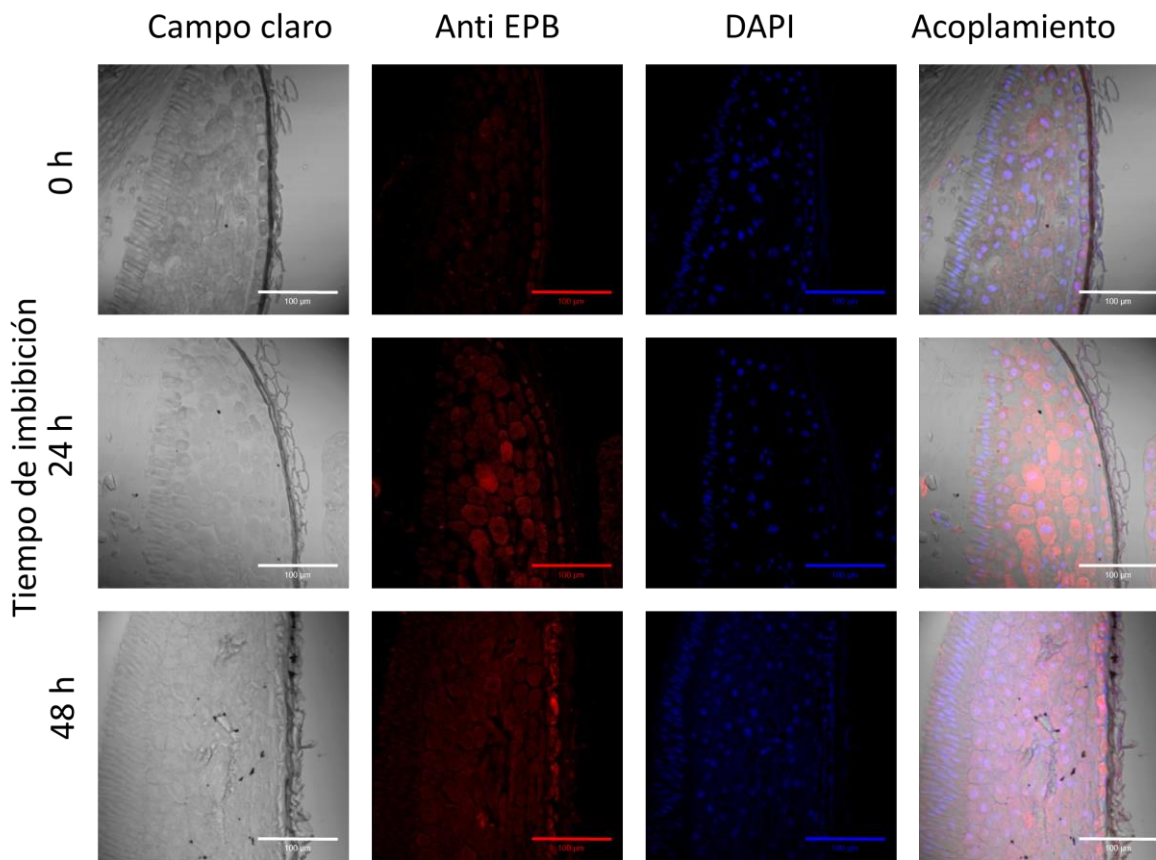


Fig. 22. Localización espacial de EPB en células del escutelo a diferentes tiempos de imbibición (Cv. Esmeralda). Se observa que a las 24 h el escutelo es el principal tejido productor de esta proteasa. La presencia de EPB se observa en rojo. En azul se aprecian los núcleos. Barra = 100 μ m

En este caso también se hizo un control negativo, y como puede observarse en la Fig. 23, el anticuerpo secundario no reacciona de forma inespecífica con este tejido.

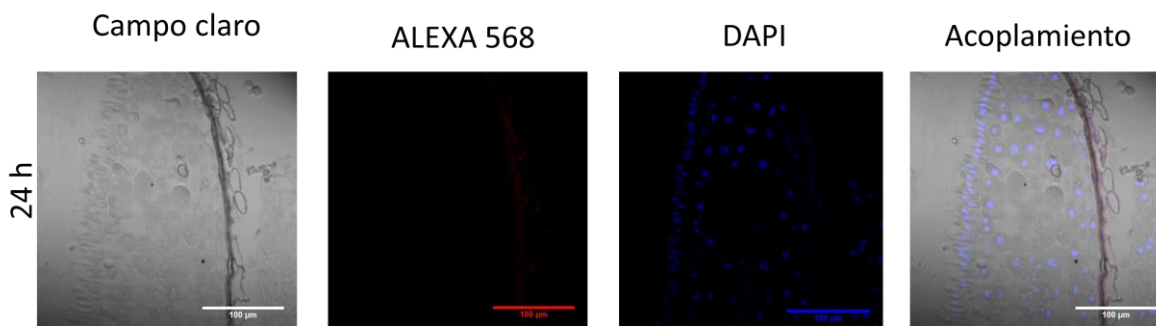


Fig. 23. Control negativo de la inmunolocalización (sin anti-EPB) en escutelo. No se observan interacciones inespecíficas dentro de las células. En azul se observan los núcleos. Barra = 100 μ m.

Estos resultados concuerdan con los observados por Koehler y Ho (1990) y Marttila *et al.* (1993), en los que describen que en el escutelo se encuentra una cantidad apreciable de transcritos de RNA correspondientes a EPB a las 24 h de imbibición; sin embargo, esta cantidad de transcritos es muy inferior a la que observaron después de las 48 h en la capa de aleurona, que es el principal tejido secretor de esta enzima.

8.4 Clonación de la región promotora de EPB2

Mediante una PCR y usando DNA genómico de cebada de diferentes cultivares y los oligonucleótidos *FPEPB2* y *RPEPB* se amplificó a la secuencia promotora del gen *EPB2*. Se obtuvo un producto de aproximadamente 844 pb (Fig. 24).

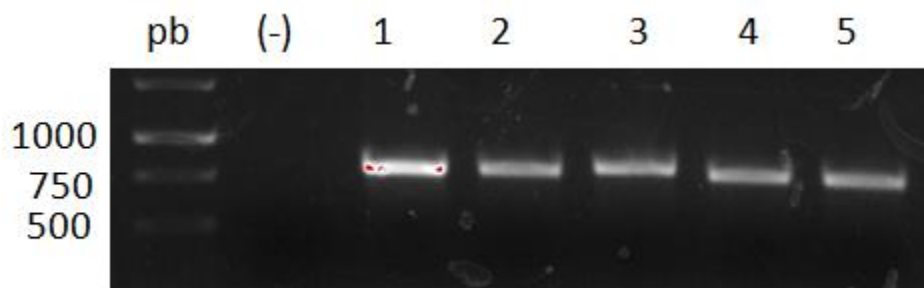


Fig. 24: Amplificación de la región promotora de EPB2 a partir de DNA genómico de diferentes cultivares de cebada: Armida (1); Esperanza (2); Adabella (3); Alina (4); Esmeralda (5); pb = marcador molecular (pares de bases); (-) = control negativo sin DNA.

Uno de los productos de la reacción de PCR (cultivar Armida) se purificó a partir de un gel de agarosa, y con él se efectuó la reacción de clonación en el vector *pENTR/D-TOPO* con el cual se transformaron células de *E. coli*.

A los plásmidos purificados de las colonias transformantes se les realizó una PCR con los oligos diseñados para el promotor de EPB2 y para el gen M13, un gen de aproximadamente 300 pb que está contenido dentro del vector *pENTR/D-TOPO* que sirve como control de transformación, ya que la inserción se lleva a cabo en secuencias dentro de este gen. Se analizó el plásmido de dos colonias

transformantes y se observó que el inserto fue clonado exitosamente en ambas (Fig. 25).

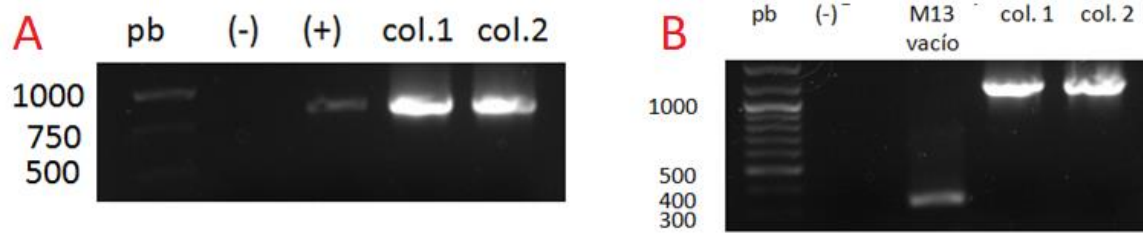


Fig. 25. PCR realizada a partir de plásmidos purificados de dos colonias transformantes con la construcción *pENTR/D-TOPO::PEPB2*, usando oligonucleótidos FPEPB2 y REPB2 (A) y M13F y M13R (B) . Se observa que ambas colonias contienen el inserto. (-) = control sin DNA; (+) = DNA genómico de cebada.

Con el software Serial Cloner, se efectuó una digestión *in silico* de la construcción *pENTR/D-TOPO::PEPB2*, empleando a la enzima *MluI*, la cual corta el plásmido en dos sitios diferentes. El vector *pENTR/D-TOPO* vacío tiene un tamaño de 2580 pb, mientras que la construcción *pENTR/D-TOPO::PEPB2*, posee un tamaño final de 3424 pb. Si el vector estuviera vacío resultarían dos fragmentos de 1648 y 932 pb, mientras que cuando contiene el inserto resultan fragmentos de 2492 y 932 pb. Una vez predichos los sitios de corte y el tamaño de los productos resultantes, se llevó a cabo la digestión de los plásmidos purificados anteriormente se volvió a confirmar la inserción del *PEPB2* en el vector de entrada (Fig. 26).

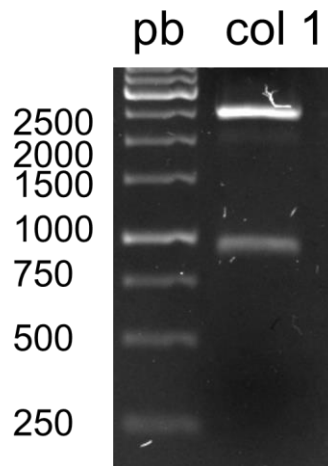


Fig. 26. Digestión de la construcción *pENTR/D-TOPO::PEPB2* con la enzima *MluI*. Se observan fragmentos resultantes de 2492 y 932 pb correspondientes al vector con la inserción.

Una vez generada la clona de entrada, *pENTR/D-TOPO:PEPB2*, se continuó con la reacción de recombinación (LR). A través de esta reacción, se logró transferir a la región promotora de *EPB2* de la construcción de entrada al vector destino, con la finalidad de generar una clona capaz de dirigir la expresión específica de los genes *GFP*, *GUS* y de *bar* en plantas transgénicas, para poder evaluar más adelante su funcionalidad como promotor. Una vez seleccionada la clona de expresión, mediante su crecimiento en distintos medios de selección, y la extracción del plásmido, se procedió a realizar una PCR con los oligos diseñados para *PEPB2* y para *bar* los cuales confirmaron la exitosa inserción del promotor en esta construcción (Fig. 27).

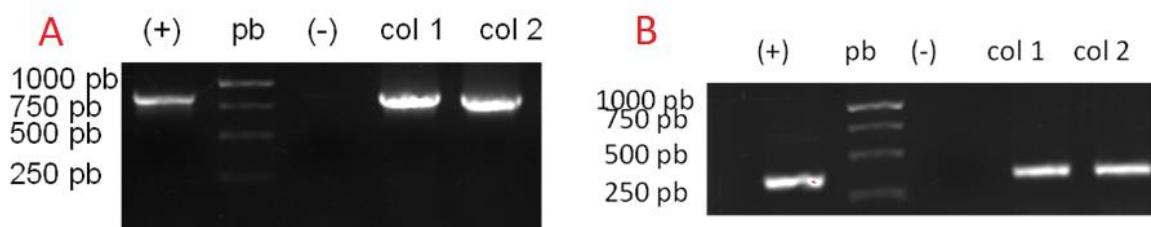


Fig. 27. PCR realizadas a partir de plásmidos purificados de dos colonias transformantes con la construcción *pBGWFS7::PEPB2*, usando oligonucleótidos FPEPB2 y REPB2 (A), y *barF* y *barR* (B). En (A) se observa que ambas colonias contienen el inserto de 844 pb correspondiente al promotor de *EPB2*. (+) = DNA genómico de cebada. En (B) se observa que ambas colonias contienen el gen *bar* de aprox. 400 pb; (+) = vector *pBGWFS7* vacío. pb= marcador molecular (pares de bases); (-) = control sin DNA.

De igual manera que con el vector de entrada, se hizo un análisis de restricción del plásmido con el inserto con ayuda del programa Serial Cloner para predecir el tamaño de los fragmentos obtenidos después de un ensayo de digestión. El plásmido *pBGWFS7* antes de la recombinación tiene un tamaño de 12451 pb, mientras que con el promotor de *EPB2*, su tamaño final disminuye a 11676 pb, debido a que pierde la secuencia letal CCD, la cual es intercambiada por la secuencia introducida. Se efectuó una doble digestión empleando las enzimas *AatII* y *SacI*. Se predijo que si el vector no tuviera la inserción resultarían fragmentos de 7854 y 4597 pb; mientras que cuando contiene el inserto resultan

fragmentos de 7854 y 3822 pb. Mediante este ensayo se reconfirmó la inserción del PEPB2 en el vector de salida (Fig. 28).

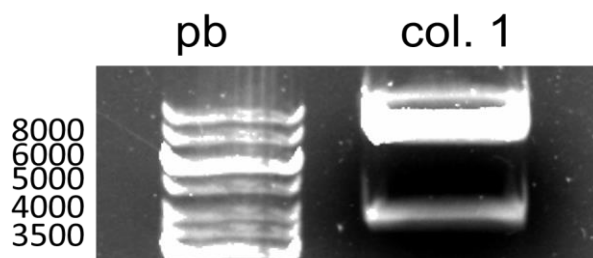


Fig. 28: Digestión del vector de salida *pBGWFS7::PEPB2* con las enzimas AatII y SacI. Se observan fragmentos de 7854 y 3822, correspondientes al vector con la inserción.

Además de estos ensayos se mandó a secuenciar el inserto clonado y se verificó una vez más su identidad. Los resultados de la secuenciación se detallan más adelante. De esta forma se obtuvo la construcción *pBGWFS7::PEPB2*, con la cual es posible evaluar la funcionalidad del promotor insertado en ella, ya que éste dirige la expresión de los genes reporteros *gus* y *GFP* en tejidos vegetales transformados con esta construcción.

8.5 La región promotora de *EPB2* es suficiente para dirigir la expresión de *EPB2* en embriones y callos de cebada *in vitro*.

Como se puede ver en la Fig. 29, una pequeña región del embrión bombardeado mediante biobalística con la construcción *pEPB2::gus* expresó el gen de la β -glucuronidasa bajo el promotor de *EPB2*, lo cual indica que la secuencia clonada contiene los elementos suficientes para dirigir la expresión específica del gen en estas células.

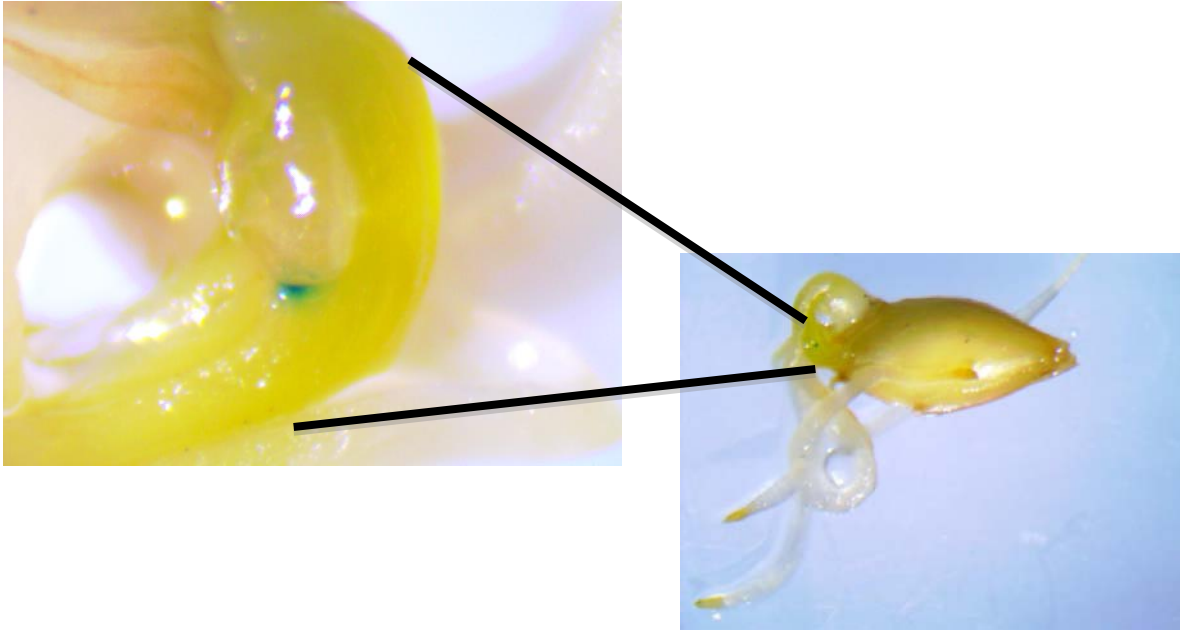


Fig. 29. Expresión de la β -glucuronidasa bajo el promotor de *EPB2* en células de embrión bombardeado *pEPB2::gus* tras 48 hrs de imbibición.

De manera similar, a las dos semanas del bombardeo, fue posible observar la expresión de genes reporteros como GFP (Fig. 30) y *gus* (Fig. 31) bajo el promotor de *EPB2* en los callos derivados de escutelo de cebada transformados mediante biobalística con la construcción *pEPB2::GFP-gus*.

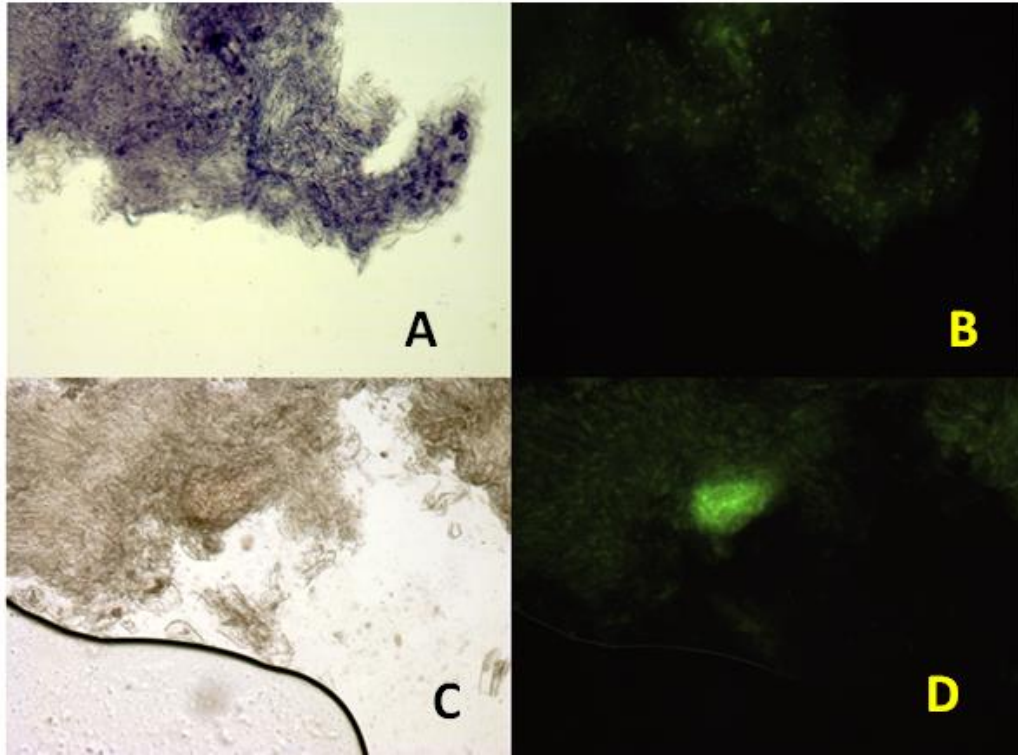


Fig. 30. Expresión de la proteína GFP en callo derivado de embrión de cebada. Arriba: Control negativo (callo bombardeado sin DNA) visto en campo claro (A) y fluorescencia (B). Abajo: Callo transformado con la construcción *pEPB2::GFP* visto en campo claro (C) y fluorescencia (D).

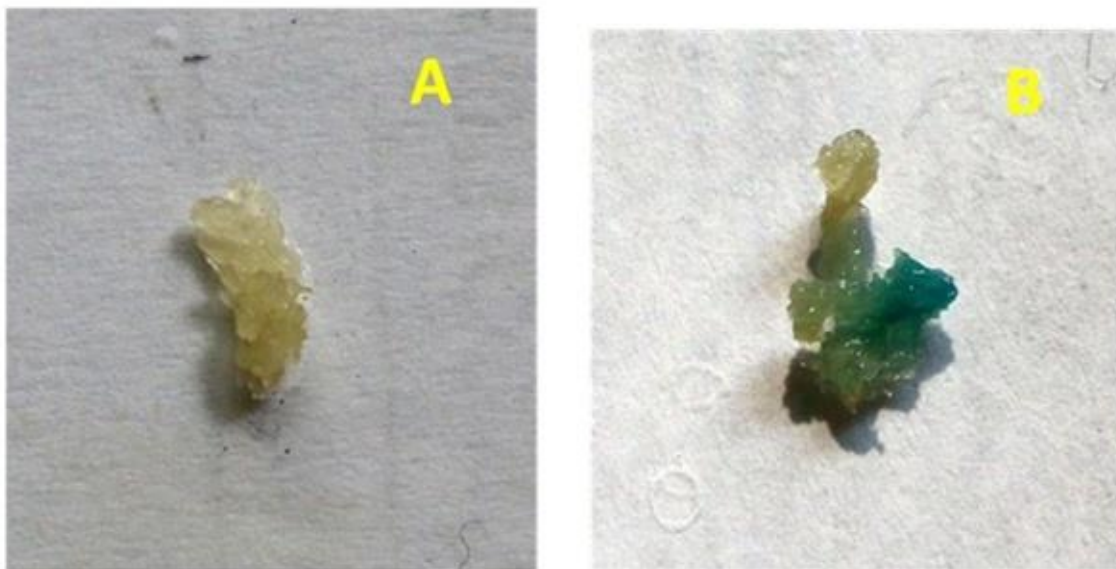


Fig. 31. Expresión de *gus* en callo derivado de embrión de cebada después de su transformación. Control negativo (A), bombardeado sin DNA, y callo transformado (B) bombardeado con la construcción *pEPB2::gus*.

8.6 Clonación de la región codificante de EPB2

Mediante una PCR y usando DNA genómico de cebada de diferentes cultivares como templado y los oligonucleótidos *FPEPB2* y *REPB* se amplificó tanto la región promotora del gen como la región codificante de *EPB2* hasta el codón de paro. Se obtuvo un producto de aproximadamente 1966 pb (Fig. 32).

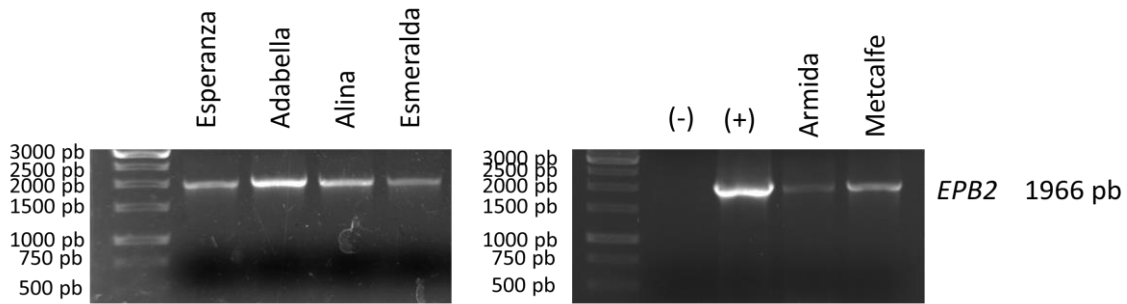


Fig. 32: Amplificación de EPB2 a partir de DNA genómico de diferentes cultivares de cebada. (-) = control negativo sin DNA; (+) = EPB2 clonada previamente en el plásmido pENTR/D-TOPO.

Los productos de la reacción de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa, y con ellos se efectuó la reacción de clonación en el vector de clonación pGEM® T-easy con el cual se transformaron células de *E. coli*. A los plásmidos purificados de las colonias transformantes seleccionadas se les realizó una PCR para verificar que contenían el inserto (Fig. 33).

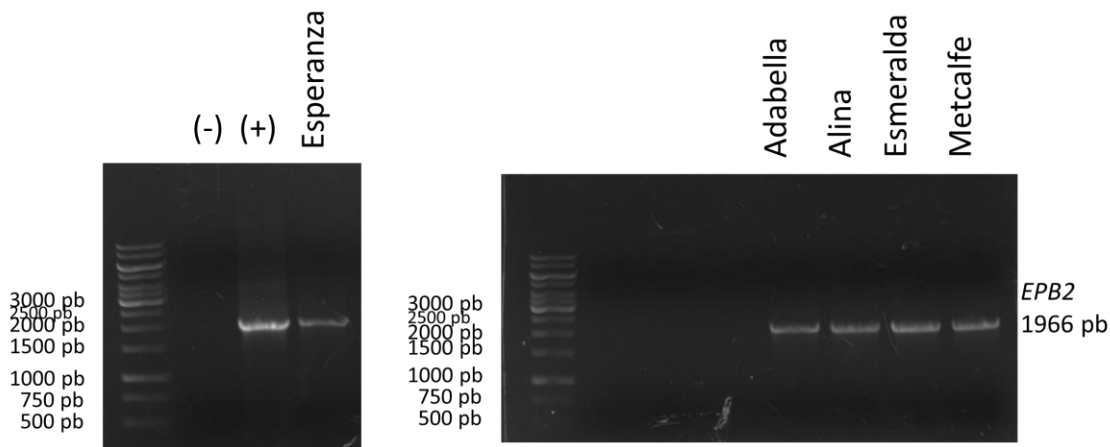


Fig. 33: Amplificación de EPB2 a partir de plásmidos de colonias transformantes para cada cultivar. (-) = control negativo sin DNA; (+) = EPB2 clonada previamente en el plásmido pENTR/D-TOPO.

Una vez verificada la inserción de las secuencias en el vector de clonación para cada uno de los cultivares, se verificó nuevamente mediante digestión, empleando la enzima de restricción EcoRI, la cual corta el plásmido en regiones adyacentes a la región de inserción, de modo que el resultado de la digestión corresponde a un fragmento de 3015 pb correspondiente al vector y un fragmento de aproximadamente 1966 pb correspondiente al fragmento clonado. Se observaron ambos fragmentos en todos los plásmidos evaluados (Fig. 34). Una vez verificada la clonación de EPB2 de cada cultivar en los plásmidos, éstos se mandaron a secuenciar.

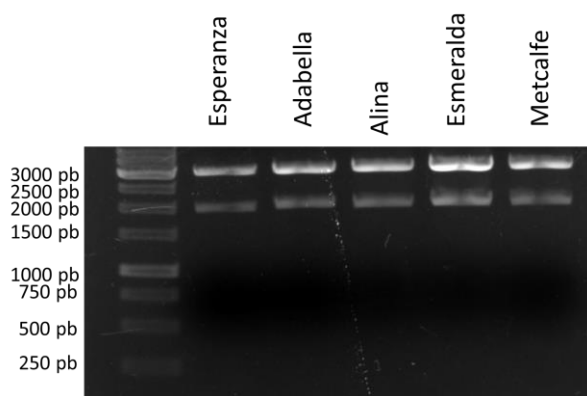


Fig. 34: Digestión de los plásmidos *pGEM::EPB2* con la enzima EcoRI. Se observan fragmentos de 3015 y 1966 pb, correspondientes al plásmido con la secuencia insertada en cada uno de los cultivares estudiados.

8.7 Variaciones genéticas del promotor de EPB2 en diferentes cultivares de cebada

Los resultados de la secuenciación y alineamiento de los promotores de *EPB2* de los diferentes cultivares analizados muestran que existen variaciones entre las cuales destacan (Fig. 35):

- Los promotores de *EPB2* de los cultivares Metcalfe, Armida y Esmeralda son idénticos.
- Los promotores de *EPB2* de los cultivares Esperanza y Alina sólo presentan un cambio puntual cada uno, con respecto a los tres cultivares antes mencionados.

- Los promotores de EPB2 de los cultivares Adabella e Himalaya difieren de los demás cultivares por presentar cuatro inserciones, lo que los hace tener un tamaño diferente al resto de los otros promotores.

De esta forma se encontraron tres versiones de promotores para este gen, siendo el más largo el reportado para el cultivar Himalaya con 844 pb, seguido de Adabella con 841 pb, mientras que los demás cultivares (Armida, Esmeralda, Metcalfe, Esperanza y Alina) poseen un promotor de 816 pb de longitud.

Si bien, los promotores son secuencias que no son traducidas en proteínas, de modo que cambios puntuales podrían no afectar de manera contundente la expresión del gen que dirigen, sin embargo, los promotores contienen secuencias de anclaje para diversos factores de transcripción (Fickett y Hatzigeorgiou, 1997; Yamamoto *et al.*, 2007), por lo que cambios drásticos en su longitud, sean ocasionados por inserciones o deleciones de secuencias, sí podrían aumentar, disminuir, silenciar o afectar la expresión del gen que dirigen, o incluso alterar su especificidad espacio-temporal. Por estas razones fue necesario hacer un análisis *in silico* de estas secuencias con el fin de predecir si los cambios observados podían producir alteraciones importantes en la expresión de este gen.

```

Esmeralda_prom TCCACGGTATGTGGTGCATTGATAAAATGTCAATGCACCAACTACAGTGTCTATTGACACTTGGGAGCAGCCACACCTTCTCTTGAGAGAGGGGAGTGTGAAA-GCGGGCAATACC6C
Armidia_prom TCCACGGTATGTGGTGCATTGATAAAATGTCAATGCACCAACTACAGTGTCTATTGACACTTGGGAGCAGCCACACCTTCTCTTGAGAGAGGGGAGTGTGAAA-GCGGGCAATACC6C
Alina_prom TCCACGGTATGTGGTGCATTGATAAAATGTCAATGCACCAACTACAGTGTCTATTGACACTTGGGAGCAGCCACACCTTCTCTTGAGAGAGGGGAGTGTGAAA-GCGGGCAATACC6C
Esperanza_prom TCCACGGTATGTGGTGCATTGATAAAATGTCAATGCACCAACTACAGTGTCTATTGACACTTGGGAGCAGCCACACCTTCTCTTGAGAGAGGGGAGTGTGAAA-GCGGGCAATACC6C
Metcalfe_prom TCCACGGTATGTGGTGCATTGATAAAATGTCAATGCACCAACTACAGTGTCTATTGACACTTGGGAGCAGCCACACCTTCTCTTGAGAGAGGGGAGTGTGAAA-GCGGGCAATACC6C
Adabella_prom TCCACGGTATGTGGTGCATTGATAAAATGTCAATGCACCAACTACAGTGTCTATTGACACTTGGGAGCAGCCACACCTTCTCTTGAGAGAGGGGAGTGTGAAA-GCGGGCAATACC6C
Himalaya_prom TCCACGGTATGTGGTGCATTGATAAAATGTCAATGCACCAACTACAGTGTCTATTGACACTTGGGAGCAGCCACACCTTCTCTTGAGAGAGGGGAGTGTGAAA-GCGGGCAATACC6C
*****

Esmeralda_prom CGCAGACTACCCCGCCGCGGCAACGGCTAGGCGGCCAGCCGGTGCAGTTACGATCGAGCACCCCGCCCCGCGACTGCCATTAATACCCGTTTCGATCTCTCGACCGGCTCAACGG
Armidia_prom CGCAGACTACCCCGCCGCGGCAACGGCTAGGCGGCCAGCCGGTGCAGTTACGATCGAGCACCCCGCCCCGCGACTGCCATTAATACCCGTTTCGATCTCTCGACCGGCTCAACGG
Alina_prom CGCAGACTACCCCGCCGCGGCAACGGCTAGGCGGCCAGCCGGTGCAGTTACGATCGAGCACCCCGCCCCGCGACTGCCATTAATACCCGTTTCGATCTCTCGACCGGCTCAACGG
Esperanza_prom CGCAGACTACCCCGCCGCGGCAACGGCTAGGCGGCCAGCCGGTGCAGTTACGATCGAGCACCCCGCCCCGCGACTGCCATTAATACCCGTTTCGATCTCTCGACCGGCTCAACGG
Metcalfe_prom CGCAGACTACCCCGCCGCGGCAACGGCTAGGCGGCCAGCCGGTGCAGTTACGATCGAGCACCCCGCCCCGCGACTGCCATTAATACCCGTTTCGATCTCTCGACCGGCTCAACGG
Adabella_prom CGCAGACTACCCCGCCGCGGCAACGGCTAGGCGGCCAGCCGGTGCAGTTACGATCGAGCACCCCGCCCCGCGACTGCCATTAATACCCGTTTCGATCTCTCGACCGGCTCAACGG
Himalaya_prom CGCAGACTACCCCGCCGCGGCAACGGCTAGGCGGCCAGCCGGTGCAGTTACGATCGAGCACCCCGCCCCGCGACTGCCATTAATACCCGTTTCGATCTCTCGACCGGCTCAACGG
*****

Esmeralda_prom CCATGTGTCGTCATC-----CGCCAGGCAC-----TACGCACGTACGTGATCGATCAAATACCCAGTAACTGCATCTACCCGATTCTACGCGGGCTGAGCATCCATACATAGAAC
Armidia_prom CCATGTGTCGTCATC-----CGCCAGGCAC-----TACGCACGTACGTGATCGATCAAATACCCAGTAACTGCATCTACCCGATTCTACGCGGGCTGAGCATCCATACATAGAAC
Alina_prom CCATGTGTCGTCATC-----CGCCAGGCAC-----TACGCACGTACGTGATCGATCAAATACCCAGTAACTGCATCTACCCGATTCTACGCGGGCTGAGCATCCATACATAGAAC
Esperanza_prom CCATGTGTCGTCATC-----CGCCAGGCAC-----TACGCACGTACGTGATCGATCAAATACCCAGTAACTGCATCTACCCGATTCTACGCGGGCTGAGCATCCATACATAGAAC
Metcalfe_prom CCATGTGTCGTCATC-----CGCCAGGCAC-----TACGCACGTACGTGATCGATCAAATACCCAGTAACTGCATCTACCCGATTCTACGCGGGCTGAGCATCCATACATAGAAC
Adabella_prom CCACGTCTGTCATCTCATCGCCAGGCAACAGCAGCTACGACAGTACGTGATCGATCAAATACCCAGTAACTGCATCTACCCGATTCTACGCGGGCTGAGCATCCATACATAGAAC
Himalaya_prom CCACGTCTGTCATCTCATCGCCAGGCAACAGCAGCTACGACAGTACGTGATCGATCAAATACCCAGTAACTGCATCTACCCGATTCTACGCGGGCTGAGCATCCATACATAGAAC
*****

Esmeralda_prom GGCACACCTACCGTCAAGAGACTATCACGGCGACCCGATCCAACGACGCTACAGTACGTAGGAATGAATCAGGCTGCACCTCGGCCACGAACCGGGGATGGTCACTGAATCTGCCCTTGA
Armidia_prom GGCACACCTACCGTCAAGAGACTATCACGGCGACCCGATCCAACGACGCTACAGTACGTAGGAATGAATCAGGCTGCACCTCGGCCACGAACCGGGGATGGTCACTGAATCTGCCCTTGA
Alina_prom GGCACACCTACCGTCAAGAGACTATCACGGCGACCCGATCCAACGACGCTACAGTACGTAGGAATGAATCAGGCTGCACCTCGGCCACGAACCGGGGATGGTCACTGAATCTGCCCTTGA
Esperanza_prom GGCACACCTACCGTCAAGAGACTATCACGGCGACCCGATCCAACGACGCTACAGTACGTAGGAATGAATCAGGCTGCACCTCGGCCACGAACCGGGGATGGTCACTGAATCTGCCCTTGA
Metcalfe_prom GGCACACCTACCGTCAAGAGACTATCACGGCGACCCGATCCAACGACGCTACAGTACGTAGGAATGAATCAGGCTGCACCTCGGCCACGAACCGGGGATGGTCACTGAATCTGCCCTTGA
Adabella_prom GGCACACCTACCGTCAAGAGACTATCACGGCGACCCGATCCAACGACGCTACAGTACGTAGGAATGAATCAGGCTGCACCTCGGCCACGAACCGGGGATGGTCACTGAATCTGCCCTTGA
Himalaya_prom GGCACACCTACCGTCAAGAGACTATCACGGCGATCCGATCCAACGACGCTACAGTACGTAGGAATGAATCAGGCTGCACCTCGGCCACGAACCGGGGATGGTCACTGAATCTGCCCTTGA
*****

Esmeralda_prom ATCTCTGTGCGCCCAATA---CCAGCGCCGACGCAACTCGGGAGCAAGCTGCAACCACTTCGAGCAGAACTTGCACACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTC
Armidia_prom ATCTCTGTGCGCCCAATA---CCAGCGCCGACGCAACTCGGGAGCAAGCTGCAACCACTTCGAGCAGAACTTGCACACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTC
Alina_prom ATCTCTGTGCGCCCAATA---CCAGCGCCGACGCAACTCGGGAGCAAGCTGCAACCACTTCGAGCAGAACTTGCACACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTC
Esperanza_prom ATCTCTGTGCGCCCAATA---CCAGCGCCGACGCAACTCGGGAGCAAGCTGCAACCACTTCGAGCAGAACTTGCACACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTC
Metcalfe_prom ATCTCTGTGCGCCCAATA---CCAGCGCCGACGCAACTCGGGAGCAAGCTGCAACCACTTCGAGCAGAACTTGCACACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTC
Adabella_prom ATCTCTGTGCGCCCAATAAGTACAGCGCCGACGCAACTTCGGGAGCAAGCTGCAACCACTTCGAGCAGAACTTGCACACC---CTCGGCTCAGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTC
Himalaya_prom ATCTCTGTGCGCCCAATAAGTACAGCGCCGACGCAACTTCGGGAGCAAGCTGCAACCACTTCGAGCAGAACTTGCACACCCTCGGCTCAGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTC
*****

Esmeralda_prom CTGCTGTTTTTCCGCGCCAAAGCAATCGATCTCTCTGCTTTACCAAGCTTCTCAAGTGTCTGCTGATCGAGCTGACAAAGCGACGATCCGACCTATAAAATACGCCCTTACCTTCTCTCC
Armidia_prom CTGCTGTTTTTCCGCGCCAAAGCAATCGATCTCTCTGCTTTACCAAGCTTCTCAAGTGTCTGCTGATCGAGCTGACAAAGCGACGATCCGACCTATAAAATACGCCCTTACCTTCTCTCC
Alina_prom CTGCTGTTTTTCCGCGCCAAAGCAATCGATCTCTCTGCTTTACCAAGCTTCTCAAGTGTCTGCTGATCGAGCTGACAAAGCGACGATCCGACCTATAAAATACGCCCTTACCTTCTCTCC
Esperanza_prom CTGCTGTTTTTCCGCGCCAAAGCAATCGATCTCTCTGCTTTACCAAGCTTCTCAAGTGTCTGCTGATCGAGCTGACAAAGCGACGATCCGACCTATAAAATACGCCCTTACCTTCTCTCC
Metcalfe_prom CTGCTGTTTTTCCGCGCCAAAGCAATCGATCTCTCTGCTTTACCAAGCTTCTCAAGTGTCTGCTGATCGAGCTGACAAAGCGACGATCCGACCTATAAAATACGCCCTTACCTTCTCTCC
Adabella_prom CTGCTGTTTTTCCGCGCCAAAGCAATCGATCTCTCTGCTTTACCAAGCTTCTCAAGTGTCTGCTGATCGAGCTGACAAAGCGACGATCCGACCTATAAAATACGCCCTTACCTTCTCTCC
Himalaya_prom CTGCTGTTTTTCCGCGCCAAAGCAATCGATCTCTCTGCTTTACCAAGCTTCTCAAGTGTCTGCTGATCGAGCTGACAAAGCGACGATCCGACCTATAAAATACGCCCTTACCTTCTCTCC
*****

Esmeralda_prom ACCCTCATCGATCTCACACTCCAAGCAAGCTAGCCACCAAGCAAGTACAGCTTGGTGTACAGCAGTGTGCGCAGTACCAAGGTACCTCGATACAACAACCTCGATCGTGGTACTGAACTACAG
Armidia_prom ACCCTCATCGATCTCACACTCCAAGCAAGCTAGCCACCAAGCAAGTACAGCTTGGTGTACAGCAGTGTGCGCAGTACCAAGGTACCTCGATACAACAACCTCGATCGTGGTACTGAACTACAG
Alina_prom ACCCTCATCGATCTCACACTCCAAGCAAGCTAGCCACCAAGCAAGTACAGCTTGGTGTACAGCAGTGTGCGCAGTACCAAGGTACCTCGATACAACAACCTCGATCGTGGTACTGAACTACAG
Esperanza_prom ACCCTCATCGATCTCACACTCCAAGCAAGCTAGCCACCAAGCAAGTACAGCTTGGTGTACAGCAGTGTGCGCAGTACCAAGGTACCTCGATACAACAACCTCGATCGTGGTACTGAACTACAG
Metcalfe_prom ACCCTCATCGATCTCACACTCCAAGCAAGCTAGCCACCAAGCAAGTACAGCTTGGTGTACAGCAGTGTGCGCAGTACCAAGGTACCTCGATACAACAACCTCGATCGTGGTACTGAACTACAG
Adabella_prom ACCCTCATCGATCTCACACTCCAAGCAAGCTAGCCACCAAGCAAGTACAGCTTGGTGTACAGCAGTGTGCGCAGTACCAAGGTACCTCGATACAACAACCTCGATCGTGGTACTGAACTACAG
Himalaya_prom ACCCTCATCGATCTCACACTCCAAGCAAGCTAGCCACCAAGCAAGTACAGCTTGGTGTACAGCAGTGTGCGCAGTACCAAGGTACCTCGATACAACAACCTCGATCGTGGTACTGAACTACAG
*****

```

Fig. 35. Alineamiento de secuencias de la región promotora de EPB2 en diferentes cultivares de cebada. En azul se denotan los nucleótidos conservado, en negro los cambios puntuales de la secuencia entre los diferentes cultivares y en rojo se resalta la caja TATA de estos promotores. Se observa que las secuencias del cultivar reportado Himalaya y el cultivar Adabella presentan inserciones que no se presentan en el resto de los cultivares.

De acuerdo a un análisis realizado por el software Softberry, en los promotores de EPB2 de todos los cultivares evaluados, se encontraron motivos asociados a reguladores de transcripción similares a los presentes en la regulación de la expresión de la beta-amilasa de arroz (RSP00148), motivos asociados a elementos relacionados con la respuesta a ABA (RSP00162, RSP00518, RSP00519, RSP00521, RSP00523, RSP00524), motivos asociados a elementos de respuesta a GA (RSP00180, RSP00513) y motivos asociados a factores de transcripción en semillas y tejidos como aleurona y endospermo (RSP00502, RSP00508).

Cabe resaltar que los cultivares Himalaya y Adabella carecen del motivo asociado al factor de transcripción **PSP00180** (Tabla 10), relacionado directamente con la transcripción en respuesta a GA.

Tabla 10: Lista de motivos asociados a factores de transcripción encontrados en los promotores de EPB2 de los diferentes cultivares analizados. Se observa que RSP00180 no está presente en los promotores de EPB2 de los cultivares Adabella e Himalaya. Los nombres de los motivos encontrados corresponden a su nombre de identificación en la base de datos de Softberry.

Factor de transcripción	Himalaya	Armida	Esperanza	Adabella	Alina	Esmeralda	Secuencia	Función reportada
RSP00015	✓	✓	✓	✓	✓	✓	TTTCCCGC	
RSP00016	✓	✓	✓	✓	✓	✓	caTGCAC	
RSP00096	✓	✓	✓	✓	✓	✓	GGTTT	Anaerobic response
RSP00148	✓	✓	✓	✓	✓	✓	CGACG	β-amylase element
RSP00151	✓	✓	✓	✓	✓	✓	CAANNNNATC	
RSP00161	✓	✓	✓	✓	✓	✓	WAAAG	
RSP00162	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ACACccGagctaaccacaac	ABA response, water stress
RSP00180	✗	✓	✓	✗	✓	✓	GTAACAGAATGCTGG	GA response element
RSP00438	✓	✓	✓	✓	✓	✓	GGCGGC	
RSP00463	✓	✓	✓	✓	✓	✓	atctcatggCCGACctgctttt	
RSP00464	✓	✓	✓	✓	✓	✓	acttgatggCCGACctctttt	
RSP00465	✓	✓	✓	✓	✓	✓	aatatactaCCGACcatgagttct	
RSP00466	✓	✓	✓	✓	✓	✓	actaCCGACatgagttccaaaagc	
RSP00469	✓	✓	✓	✓	✓	✓	GNGGTG	
RSP00470	✓	✓	✓	✓	✓	✓	GTGGNG	
RSP00477	✓	✓	✓	✓	✓	✓	TTTAA	
RSP00483	✓	✓	✓	✓	✓	✓	GCCGC	
RSP00501	✓	✓	✓	✓	✓	✓	CGAGCag	
RSP00508	✓	✓	✓	✓	✓	✓	gcaTTTTatca	Transcription in A. thaliana seeds
RSP00513	✓	✓	✓	✓	✓	✓	atgataaTAACAGAgctc	GA response element
RSP00518	✓	✓	✓	✓	✓	✓	tccctACACgcGtcacaattc	ABA response
RSP00519	✓	✓	✓	✓	✓	✓	caattcaggACACgtGccctctca	ABA response
RSP00521	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ACACccG	ABA response
RSP00523	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ACACgcG	ABA response

La secuencia asociada al factor de transcripción denominada RSP00180 dentro de la base de datos del Software Softberry corresponde a un elemento de respuesta a ácido giberélico (GARE por sus siglas en inglés), y constituye uno de los cuatro elementos de respuesta a GA reportados previamente en el promotor de *EPB1* (GARE-1, GARE-2, GARE-3 y GARE-4), los cuales son reconocidos por factores de transcripción de la familia MYB, específicamente por el factor GAmYb, involucrado en la señalización de respuesta a GA en los genes de α-amilasa y Endoproteasa B1 (Gubler *et al.*, 1995; Cercós *et al.*, 1999; Ambawat *et al.*, 2013).

La secuencia del GARE ausente en los cultivares Adabella e Himalaya es GTAACAGAATGCTGG, la cual se encuentra en la hebra complementaria como su reverso complementario CCAGCATTCTGTTAC. Esta secuencia corresponde al

GARE-4, reportado en el promotor de EPB1 por Cercós *et al.*, (1999) y que se había reportado como ausente dentro del promotor de EPB2 en el cultivar Himalaya. La ausencia de este motivo en los cultivares mencionados anteriormente está relacionada directamente con la presencia de una inserción en la secuencia de las regiones promotoras observadas anteriormente, como se puede observar en la Fig. 36.



Fig. 36. Sitio de unión del factor del Elemento de Respuesta a GA (amarillo). Arriba se observa la secuencia intacta en los cultivares Metcalfe, Esmeralda, Armida, Esperanza y Alina, mientras que abajo se observa la secuencia interrumpida por inserciones en los cultivares Himalaya y Adabella.

Mikkonen *et al.* (1996) demostraron que la actividad del promotor de *EPB1* es cinco veces mayor en presencia de GA, en comparación con el promotor de *EPB2* en las mismas condiciones mediante ensayos de expresión transitoria del gen reportero *gus* dirigido por los promotores de *EPB1* y *EPB2* en capas de aleurona. Cabe destacar que estos ensayos fueron realizados en células de aleurona del cultivar Himalaya, de modo que la menor expresión de EPB2 en comparación con la de EPB1 reportada en dicho trabajo podría deberse a la ausencia del motivo GARE-4 específica del cultivar Himalaya.

Con el fin de probar esta hipótesis se hizo un análisis del promotor de EPB1 del cultivar reportado Himalaya con el fin de determinar los motivos asociados a factores de transcripción de éste y compararlos con los encontrados en el promotor de *EPB2* de los cultivares diferentes a Himalaya. Se observó que, en efecto, el promotor de EPB1 reportado en el cultivar Himalaya contiene el motivo GARE-4, el cual está ausente en los promotores de EPB2 de los cultivares

Adabella e Himalaya, pero que está presente en los cultivares Armida, Esperanza, Alina, Esmeralda y Metcalfe.

En la [Tabla 11](#) se muestran los elementos reguladores que participan en la respuesta a GA reportados para el promotor de *EPB1*, y mediante alineamientos realizados con el software WorkBench (ver Anexo V), se determinó si estos elementos se encuentran presentes, ausentes o si presentan cambios o mutaciones en el promotor de *EPB2* de los cultivares estudiados.

Tabla 11. Lista de motivos asociados a elementos de respuesta a GA encontrados en los promotores de *EPB1* (Himalaya) y *EPB2* (diferentes cultivares).

Elemento regulador	Secuencia	Hebra	Presencia en diferentes promotores		
			Prom <i>EPB1</i> (himalaya)	Prom <i>EPB2</i> (Armida, Esperanza, Alina, Esmeralda, Metcalfe)	Prom <i>EPB2</i> (Adabella, Himalaya)
GARE-1	GTAAGTGCATCTAC	(+)	Presente	Presente	Presente
GARE-2	CCAGCAGAATCTGA	(+)	Presente	Presenta cambio en un nucleótido	Presenta cambio en un nucleótido
GARE-3	GTGTCAGATTCTGC	(-)	Presente	Presente	Presente
GARE-4	GTAACAGAATGCTGG	(-)	Presente	Presente	Ausente
Box 1	CATCCAT	(+)	Presente	Presente	Presente
Pyrimidine box	TTTTTCC	(+)	Presente	Presenta cambio en un nucleótido	Presenta cambio en un nucleótido

En la [Fig. 37](#) se representa de forma gráfica las diferencias de los elementos involucrados en la respuesta a GA del promotor de *EPB1* y las diferentes versiones del promotor de *EPB2* encontradas.

Promotor EPB1 (Himalaya)



Promotor EPB2 (Armida, Esperanza, Alina, Esmeralda, Metcalfe)



Promotor EPB2 (Himalaya y Adabella)



Fig. 37: Diferencias de los elementos de respuesta a GA en los promotores de EPB1 y EPB2.

8.8 Variaciones en la región codificante

A diferencia de la región promotora, la región codificante de *EPB2* no presentó cambios que implicaran un cambio en la longitud de la secuencia de nucleótidos (inserciones o deleciones). En todos los cultivares de cebada la región codificante de *EPB2* secuenciada presentó una longitud de 1122 bp analizados, la misma longitud que fue reportada previamente para el cultivar Himalaya. Los datos más relevantes obtenidos del alineamiento de estas secuencias son:

- Las secuencias de los cultivares Armida, Alina, Esmeralda y Metcalfe son idénticas.
- Las secuencias de los cultivares Adabella, Himalaya y Esperanza presentan cambios puntuales.

En la Fig. 39 se muestra un alineamiento de las secuencias de nucleótidos de todas las regiones codificantes analizadas.

Armida_ORF. ATGGGGTGTCTAGCAAGAAGCTTCTGGTGGCATCCATGGTGGCTGCGTGTGGCCGTGGCGCCGTGGAGCTCTGACGCGCCATCCCAGTGGAGGACAAGGACCTGGAATCGGAGGAG
 Metcalfe_ORF. ATGGGGTGTCTAGCAAGAAGCTTCTGGTGGCATCCATGGTGGCTGCGTGTGGCCGTGGCGCCGTGGAGCTCTGACGCGCCATCCCAGTGGAGGACAAGGACCTGGAATCGGAGGAG
 Esmeralda_ORF. ATGGGGTGTCTAGCAAGAAGCTTCTGGTGGCATCCATGGTGGCTGCGTGTGGCCGTGGCGCCGTGGAGCTCTGACGCGCCATCCCAGTGGAGGACAAGGACCTGGAATCGGAGGAG
 Alina_ORF. ATGGGGTGTCTAGCAAGAAGCTTCTGGTGGCATCCATGGTGGCTGCGTGTGGCCGTGGCGCCGTGGAGCTCTGACGCGCCATCCCAGTGGAGGACAAGGACCTGGAATCGGAGGAG
 Esperanza_ORF. ATGGGGTGTCTAGCAAGAAGCTTCTGGTGGCATCCATGGTGGCTGCGTGTGGCCGTGGCGCCGTGGAGCTCTGACGCGCCATCCCAGTGGAGGACAAGGACCTGGAATCGGAGGAG
 Himalaya_ORF. ATGGGGTGTCTAGCAAGAAGCTTCTGGTGGCATCCATGGTGGCTGCGTGTGGCCGTGGCGCCGTGGAGCTCTGACGCGCCATCCCAGTGGAGGACAAGGACCTGGAATCGGAGGAG
 Adabella_ORF. ATGGGGTGTCTAGCAAGAAGCTTCTGGTGGCATCCATGGTGGCTGCGTGTGGCCGTGGCGCCGTGGAGCTCTGACGCGCCATCCCAGTGGAGGACAAGGACCTGGAATCGGAGGAG

Armida_ORF. GCGCTATGGGACCTACGAGCGGTGGCACTGGCGCACCCGCGTGGCGGACACCGCCGAGAAAGCACCGCCCTTGGGACCTTCAAGTCCAACGCCCACTTCATCACTCCCAAC
 Metcalfe_ORF. GCGCTATGGGACCTACGAGCGGTGGCACTGGCGCACCCGCGTGGCGGACACCGCCGAGAAAGCACCGCCCTTGGGACCTTCAAGTCCAACGCCCACTTCATCACTCCCAAC
 Esmeralda_ORF. GCGCTATGGGACCTACGAGCGGTGGCACTGGCGCACCCGCGTGGCGGACACCGCCGAGAAAGCACCGCCCTTGGGACCTTCAAGTCCAACGCCCACTTCATCACTCCCAAC
 Alina_ORF. GCGCTATGGGACCTACGAGCGGTGGCACTGGCGCACCCGCGTGGCGGACACCGCCGAGAAAGCACCGCCCTTGGGACCTTCAAGTCCAACGCCCACTTCATCACTCCCAAC
 Esperanza_ORF. GCGCTATGGGACCTACGAGCGGTGGCACTGGCGCACCCGCGTGGCGGACACCGCCGAGAAAGCACCGCCCTTGGGACCTTCAAGTCCAACGCCCACTTCATCACTCCCAAC
 Himalaya_ORF. GCGCTATGGGACCTACGAGCGGTGGCACTGGCGCACCCGCGTGGCGGACACCGCCGAGAAAGCACCGCCCTTGGGACCTTCAAGTCCAACGCCCACTTCATCACTCCCAAC
 Adabella_ORF. GCGCTATGGGACCTACGAGCGGTGGCACTGGCGCACCCGCGTGGCGGACACCGCCGAGAAAGCACCGCCCTTGGGACCTTCAAGTCCAACGCCCACTTCATCACTCCCAAC

Armida_ORF. AAGCGCGGCGAGCACCCCTATCGCTCCACCTCAACCCTTGGCGGACATGGACAGGCGGAGTTCGGCGCACCTTCTGGCGGACCTTCCGCGGACACCCCGTCCAAGCGCGCTCC
 Metcalfe_ORF. AAGCGCGGCGAGCACCCCTATCGCTCCACCTCAACCCTTGGCGGACATGGACAGGCGGAGTTCGGCGCACCTTCTGGCGGACCTTCCGCGGACACCCCGTCCAAGCGCGCTCC
 Esmeralda_ORF. AAGCGCGGCGAGCACCCCTATCGCTCCACCTCAACCCTTGGCGGACATGGACAGGCGGAGTTCGGCGCACCTTCTGGCGGACCTTCCGCGGACACCCCGTCCAAGCGCGCTCC
 Alina_ORF. AAGCGCGGCGAGCACCCCTATCGCTCCACCTCAACCCTTGGCGGACATGGACAGGCGGAGTTCGGCGCACCTTCTGGCGGACCTTCCGCGGACACCCCGTCCAAGCGCGCTCC
 Esperanza_ORF. AAGCGCGGCGAGCACCCCTATCGCTCCACCTCAACCCTTGGCGGACATGGACAGGCGGAGTTCGGCGCACCTTCTGGCGGACCTTCCGCGGACACCCCGTCCAAGCGCGCTCC
 Himalaya_ORF. AAGCGCGGCGAGCACCCCTATCGCTCCACCTCAACCCTTGGCGGACATGGACAGGCGGAGTTCGGCGCACCTTCTGGCGGACCTTCCGCGGACACCCCGTCCAAGCGCGCTCC
 Adabella_ORF. AAGCGCGGCGAGCACCCCTATCGCTCCACCTCAACCCTTGGCGGACATGGACAGGCGGAGTTCGGCGCACCTTCTGGCGGACCTTCCGCGGACACCCCGTCCAAGCGCGCTCC

Armida_ORF. GTCCCCGGATTCATGTACGCGCCCTGAACGTGTCCGACCTGCGCCGTCTGGTGGACTGGCGGAGAAAGGCGCCGTGACGGGCTCAAGGACCAAGGCAAGTGGCGAGCTGTGGGCA
 Metcalfe_ORF. GTCCCCGGATTCATGTACGCGCCCTGAACGTGTCCGACCTGCGCCGTCTGGTGGACTGGCGGAGAAAGGCGCCGTGACGGGCTCAAGGACCAAGGCAAGTGGCGAGCTGTGGGCA
 Esmeralda_ORF. GTCCCCGGATTCATGTACGCGCCCTGAACGTGTCCGACCTGCGCCGTCTGGTGGACTGGCGGAGAAAGGCGCCGTGACGGGCTCAAGGACCAAGGCAAGTGGCGAGCTGTGGGCA
 Alina_ORF. GTCCCCGGATTCATGTACGCGCCCTGAACGTGTCCGACCTGCGCCGTCTGGTGGACTGGCGGAGAAAGGCGCCGTGACGGGCTCAAGGACCAAGGCAAGTGGCGAGCTGTGGGCA
 Esperanza_ORF. GTCCCCGGATTCATGTACGCGCCCTGAACGTGTCCGACCTGCGCCGTCTGGTGGACTGGCGGAGAAAGGCGCCGTGACGGGCTCAAGGACCAAGGCAAGTGGCGAGCTGTGGGCA
 Himalaya_ORF. GTCCCCGGATTCATGTACGCGCCCTGAACGTGTCCGACCTGCGCCGTCTGGTGGACTGGCGGAGAAAGGCGCCGTGACGGGCTCAAGGACCAAGGCAAGTGGCGAGCTGTGGGCA
 Adabella_ORF. GTCCCCGGATTCATGTACGCGCCCTGAACGTGTCCGACCTGCGCCGTCTGGTGGACTGGCGGAGAAAGGCGCCGTGACGGGCTCAAGGACCAAGGCAAGTGGCGAGCTGTGGGCA

Armida_ORF. TTCTCCACGGTGGTGTCCGTGGAAGGCATCAACGCCATCCGACGGGACBCTGTGTCTCTGGAGCAGGAGCTCATGACTGCGACACGGCGGACCAACGACGGTGGCAAGGCGGG
 Metcalfe_ORF. TTCTCCACGGTGGTGTCCGTGGAAGGCATCAACGCCATCCGACGGGACBCTGTGTCTCTGGAGCAGGAGCTCATGACTGCGACACGGCGGACCAACGACGGTGGCAAGGCGGG
 Esmeralda_ORF. TTCTCCACGGTGGTGTCCGTGGAAGGCATCAACGCCATCCGACGGGACBCTGTGTCTCTGGAGCAGGAGCTCATGACTGCGACACGGCGGACCAACGACGGTGGCAAGGCGGG
 Alina_ORF. TTCTCCACGGTGGTGTCCGTGGAAGGCATCAACGCCATCCGACGGGACBCTGTGTCTCTGGAGCAGGAGCTCATGACTGCGACACGGCGGACCAACGACGGTGGCAAGGCGGG
 Esperanza_ORF. TTCTCCACGGTGGTGTCCGTGGAAGGCATCAACGCCATCCGACGGGACBCTGTGTCTCTGGAGCAGGAGCTCATGACTGCGACACGGCGGACCAACGACGGTGGCAAGGCGGG
 Himalaya_ORF. TTCTCCACGGTGGTGTCCGTGGAAGGCATCAACGCCATCCGACGGGACBCTGTGTCTCTGGAGCAGGAGCTCATGACTGCGACACGGCGGACCAACGACGGTGGCAAGGCGGG
 Adabella_ORF. TTCTCCACGGTGGTGTCCGTGGAAGGCATCAACGCCATCCGACGGGACBCTGTGTCTCTGGAGCAGGAGCTCATGACTGCGACACGGCGGACCAACGACGGTGGCAAGGCGGG

Armida_ORF. CTCATGGACAACGCCCTCGAGTACATCAAGAACACCGCGGGCTAATCACCAGGCGGCTACCCGTACCAGCGCCGACGAGGACCTGCAACGTGCGGAGAGCGGCCAAGACTCGCCC
 Metcalfe_ORF. CTCATGGACAACGCCCTCGAGTACATCAAGAACACCGCGGGCTAATCACCAGGCGGCTACCCGTACCAGCGCCGACGAGGACCTGCAACGTGCGGAGAGCGGCCAAGACTCGCCC
 Esmeralda_ORF. CTCATGGACAACGCCCTCGAGTACATCAAGAACACCGCGGGCTAATCACCAGGCGGCTACCCGTACCAGCGCCGACGAGGACCTGCAACGTGCGGAGAGCGGCCAAGACTCGCCC
 Alina_ORF. CTCATGGACAACGCCCTCGAGTACATCAAGAACACCGCGGGCTAATCACCAGGCGGCTACCCGTACCAGCGCCGACGAGGACCTGCAACGTGCGGAGAGCGGCCAAGACTCGCCC
 Esperanza_ORF. CTCATGGACAACGCCCTCGAGTACATCAAGAACACCGCGGGCTAATCACCAGGCGGCTACCCGTACCAGCGCCGACGAGGACCTGCAACGTGCGGAGAGCGGCCAAGACTCGCCC
 Himalaya_ORF. CTCATGGACAACGCCCTCGAGTACATCAAGAACACCGCGGGCTAATCACCAGGCGGCTACCCGTACCAGCGCCGACGAGGACCTGCAACGTGCGGAGAGCGGCCAAGACTCGCCC
 Adabella_ORF. CTCATGGACAACGCCCTCGAGTACATCAAGAACACCGCGGGCTAATCACCAGGCGGCTACCCGTACCAGCGCCGACGAGGACCTGCAACGTGCGGAGAGCGGCCAAGACTCGCCC

Armida_ORF. GTGGTGGTGCATATCGAGGGCACCAGGACGTGCCGGCAACAGCGAGGAGGACTGGCAGGGCGGTGGCGAACAGCCCGTGTCCGTGGCCGTGAGGCGGAGCGGGAAGGCGTTCAATG
 Metcalfe_ORF. GTGGTGGTGCATATCGAGGGCACCAGGACGTGCCGGCAACAGCGAGGAGGACTGGCAGGGCGGTGGCGAACAGCCCGTGTCCGTGGCCGTGAGGCGGAGCGGGAAGGCGTTCAATG
 Esmeralda_ORF. GTGGTGGTGCATATCGAGGGCACCAGGACGTGCCGGCAACAGCGAGGAGGACTGGCAGGGCGGTGGCGAACAGCCCGTGTCCGTGGCCGTGAGGCGGAGCGGGAAGGCGTTCAATG
 Alina_ORF. GTGGTGGTGCATATCGAGGGCACCAGGACGTGCCGGCAACAGCGAGGAGGACTGGCAGGGCGGTGGCGAACAGCCCGTGTCCGTGGCCGTGAGGCGGAGCGGGAAGGCGTTCAATG
 Esperanza_ORF. GTGGTGGTGCATATCGAGGGCACCAGGACGTGCCGGCAACAGCGAGGAGGACTGGCAGGGCGGTGGCGAACAGCCCGTGTCCGTGGCCGTGAGGCGGAGCGGGAAGGCGTTCAATG
 Himalaya_ORF. GTGGTGGTGCATATCGAGGGCACCAGGACGTGCCGGCAACAGCGAGGAGGACTGGCAGGGCGGTGGCGAACAGCCCGTGTCCGTGGCCGTGAGGCGGAGCGGGAAGGCGTTCAATG
 Adabella_ORF. GTGGTGGTGCATATCGAGGGCACCAGGACGTGCCGGCAACAGCGAGGAGGACTGGCAGGGCGGTGGCGAACAGCCCGTGTCCGTGGCCGTGAGGCGGAGCGGGAAGGCGTTCAATG

Armida_ORF. TTCTACTCCGAGGGGGTGTCCACCGTGAATGTGSAACAGAGCTGGACACCGGCTGGCGTGGTGGTACGGGGTGTGAGGAGCGCAAGGCGTACTGGACGGTGAAGAACTCGTGG
 Metcalfe_ORF. TTCTACTCCGAGGGGGTGTCCACCGTGAATGTGSAACAGAGCTGGACACCGGCTGGCGTGGTGGTACGGGGTGTGAGGAGCGCAAGGCGTACTGGACGGTGAAGAACTCGTGG
 Esmeralda_ORF. TTCTACTCCGAGGGGGTGTCCACCGTGAATGTGSAACAGAGCTGGACACCGGCTGGCGTGGTGGTACGGGGTGTGAGGAGCGCAAGGCGTACTGGACGGTGAAGAACTCGTGG
 Alina_ORF. TTCTACTCCGAGGGGGTGTCCACCGTGAATGTGSAACAGAGCTGGACACCGGCTGGCGTGGTGGTACGGGGTGTGAGGAGCGCAAGGCGTACTGGACGGTGAAGAACTCGTGG
 Esperanza_ORF. TTCTACTCCGAGGGGGTGTCCACCGTGAATGTGSAACAGAGCTGGACACCGGCTGGCGTGGTGGTACGGGGTGTGAGGAGCGCAAGGCGTACTGGACGGTGAAGAACTCGTGG
 Himalaya_ORF. TTCTACTCCGAGGGGGTGTCCACCGTGAATGTGSAACAGAGCTGGACACCGGCTGGCGTGGTGGTACGGGGTGTGAGGAGCGCAAGGCGTACTGGACGGTGAAGAACTCGTGG
 Adabella_ORF. TTCTACTCCGAGGGGGTGTCCACCGTGAATGTGSAACAGAGCTGGACACCGGCTGGCGTGGTGGTACGGGGTGTGAGGAGCGCAAGGCGTACTGGACGGTGAAGAACTCGTGG

Armida_ORF. GGGCCGTCTGGGGGAGCAGGGCTACATCAGGGTGGAGAAGGATTCTGGTGCCTGGCGGGCTCTGGCGCATGCCATGGAGGCGTCTATCCCGTCAAGACTACAGCAAGCCAAAG
 Metcalfe_ORF. GGGCCGTCTGGGGGAGCAGGGCTACATCAGGGTGGAGAAGGATTCTGGTGCCTGGCGGGCTCTGGCGCATGCCATGGAGGCGTCTATCCCGTCAAGACTACAGCAAGCCAAAG
 Esmeralda_ORF. GGGCCGTCTGGGGGAGCAGGGCTACATCAGGGTGGAGAAGGATTCTGGTGCCTGGCGGGCTCTGGCGCATGCCATGGAGGCGTCTATCCCGTCAAGACTACAGCAAGCCAAAG
 Alina_ORF. GGGCCGTCTGGGGGAGCAGGGCTACATCAGGGTGGAGAAGGATTCTGGTGCCTGGCGGGCTCTGGCGCATGCCATGGAGGCGTCTATCCCGTCAAGACTACAGCAAGCCAAAG
 Esperanza_ORF. GGGCCGTCTGGGGGAGCAGGGCTACATCAGGGTGGAGAAGGATTCTGGTGCCTGGCGGGCTCTGGCGCATGCCATGGAGGCGTCTATCCCGTCAAGACTACAGCAAGCCAAAG
 Himalaya_ORF. GGGCCGTCTGGGGGAGCAGGGCTACATCAGGGTGGAGAAGGATTCTGGTGCCTGGCGGGCTCTGGCGCATGCCATGGAGGCGTCTATCCCGTCAAGACTACAGCAAGCCAAAG
 Adabella_ORF. GGGCCGTCTGGGGGAGCAGGGCTACATCAGGGTGGAGAAGGATTCTGGTGCCTGGCGGGCTCTGGCGCATGCCATGGAGGCGTCTATCCCGTCAAGACTACAGCAAGCCAAAG

Armida_ORF. CCCACGCCAGGCGGCCCTTGGAGCAGGGAGTCACTGTGA
 Metcalfe_ORF. CCCACGCCAGGCGGCCCTTGGAGCAGGGAGTCACTGTGA
 Esmeralda_ORF. CCCACGCCAGGCGGCCCTTGGAGCAGGGAGTCACTGTGA
 Alina_ORF. CCCACGCCAGGCGGCCCTTGGAGCAGGGAGTCACTGTGA
 Esperanza_ORF. CCCACGCCAGGCGGCCCTTGGAGCAGGGAGTCACTGTGA
 Himalaya_ORF. CCCACGCCAGGCGGCCCTTGGAGCAGGGAGTCACTGTGA
 Adabella_ORF. CCCACGCCAGGCGGCCCTTGGAGCAGGGAGTCACTGTGA

Fig. 38. Alineamiento de secuencias (nucleótidos) de la región codificante de *EPB2* de los cultivares. En azul se denotan los nucleótidos conservados y en negro los cambios puntuales de la secuencia entre los diferentes cultivares.

Para determinar si estos cambios puntuales implican cambios en la secuencia de aminoácidos que pudiesen resultar en la pérdida de la función de la enzima por mutaciones en el sitio activo, se tradujo la secuencia de nucleótidos a aminoácidos (Fig. 39). Se observó que la secuencia de aminoácidos es idéntica en los cultivares Armida, Alina, Esmeralda y Metcalfe, y presenta cambios puntuales en la secuencia de los cultivares Adabella, Esperanza e Himalaya. En la Tabla 12 se resumen los cambios puntuales encontrados.

Sequence alignment

Consensus key (see documentation for details)

- * - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

 Aminoácidos involucrados en el sitio activo

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

ARMIDA_EPB2_Translated_-_Lon      MGLLSKKLLVASMVAAVLVA AVELCSAIPMEDKDLSEEEALWDLYERWQSAHRVRRHAEKHRFFGTFKSNAHFISHHNKRGEHPYRLHLNRFQDMQDA
ESPERANZA_EPB2_Translated_-_      MGLLSKKLLVASMVAAVLVA AVELCSAIPMEDKDLSEEEALWDLYERWQSAHRVRRHAEKHRFFGTFKSNAHFISHHNKRGEHPYRLHLNRFQDMQDA
ESMERALDA_EPB2_Translated_-_      MGLLSKKLLVASMVAAVLVA AVELCSAIPMEDKDLSEEEALWDLYERWQSAHRVRRHAEKHRFFGTFKSNAHFISHHNKRGEHPYRLHLNRFQDMQDA
ALINA_EPB2_Translated_-_Long      MGLLSKKLLVASMVAAVLVA AVELCSAIPMEDKDLSEEEALWDLYERWQSAHRVRRHAEKHRFFGTFKSNAHFISHHNKRGEHPYRLHLNRFQDMQDA
METCALFE_EPB2_Translated_-_L      MGLLSKKLLVASMVAAVLVA AVELCSAIPMEDKDLSEEEALWDLYERWQSAHRVRRHAEKHRFFGTFKSNAHFISHHNKRGEHPYRLHLNRFQDMQDA
Himalaya-rep_Translated_-_Fr      MGLLSKKLLVASMVAAVLVA AVELCSAIPMEDKDLSEEEALWDLYERWQSAHRVRRHAEKHRFFGTFKSNAHFISHHNKRGEHPYRLHLNRFQDMQDA
ADABELLA_EPB2_Translated_-_L      MGLLSKKLLVASMVAAVLVA AVELCSAIPMEDKDLSEEEALWDLYERWQSAHRVRRHAEKHRFFGTFKSNAHFISHHNKRGEHPYRLHLNRFQDMQDA
*****:*****

```

```

ARMIDA_EPB2_Translated_-_Lon      EFRATFVGDRLRDTSPKPPSVPGFMYAALNVSDDLPPSVDWRQKGA V TGVK DQKCGS C HAFSTVVSVEGINAIRTGSLVLSLEQELIDCDTADNDGCGGG
ESPERANZA_EPB2_Translated_-_      EFRATFVGDRLRDTSPKPPSVPGFMYAALNVSDDLPPSVDWRQKGA V TGVK DQKCGS C HAFSTVVSVEGINAIRTGSLVLSLEQELIDCDTADNDGCGGG
ESMERALDA_EPB2_Translated_-_      EFRATFVGDRLRDTSPKPPSVPGFMYAALNVSDDLPPSVDWRQKGA V TGVK DQKCGS C HAFSTVVSVEGINAIRTGSLVLSLEQELIDCDTADNDGCGGG
ALINA_EPB2_Translated_-_Long      EFRATFVGDRLRDTSPKPPSVPGFMYAALNVSDDLPPSVDWRQKGA V TGVK DQKCGS C HAFSTVVSVEGINAIRTGSLVLSLEQELIDCDTADNDGCGGG
METCALFE_EPB2_Translated_-_L      EFRATFVGDRLRDTSPKPPSVPGFMYAALNVSDDLPPSVDWRQKGA V TGVK DQKCGS C HAFSTVVSVEGINAIRTGSLVLSLEQELIDCDTADNDGCGGG
Himalaya-rep_Translated_-_Fr      EFRATFVGDRLRDTSPKPPSVPGFMYAALNVSDDLPPSVDWRQKGA V TGVK DQKCGS C HAFSTVVSVEGINAIRTGSLVLSLEQELIDCDTADNDGCGGG
ADABELLA_EPB2_Translated_-_L      EFRATFVGDRLRDTSPKPPSVPGFMYAALNVSDDLPPSVDWRQKGA V TGVK DQKCGS C HAFSTVVSVEGINAIRTGSLVLSLEQELIDCDTADNDGCGGG
*****:*****

```

```

ARMIDA_EPB2_Translated_-_Lon      LINDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGT CNVARAAQNSPVVHIDGHQDVPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFHFYSEG V FTGECGTGLDHSVA
ESPERANZA_EPB2_Translated_-_      LINDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGT CNVARAAQNSPVVHIDGHQDVPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFHFYSEG V FTGECGTGLDHSVA
ESMERALDA_EPB2_Translated_-_      LINDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGT CNVARAAQNSPVVHIDGHQDVPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFHFYSEG V FTGECGTGLDHSVA
ALINA_EPB2_Translated_-_Long      LINDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGT CNVARAAQNSPVVHIDGHQDVPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFHFYSEG V FTGECGTGLDHSVA
METCALFE_EPB2_Translated_-_L      LINDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGT CNVARAAQNSPVVHIDGHQDVPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFHFYSEG V FTGECGTGLDHSVA
Himalaya-rep_Translated_-_Fr      LINDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGT CNVARAAQNSPVVHIDGHQDVPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFHFYSEG V FTGECGTGLDHSVA
ADABELLA_EPB2_Translated_-_L      LINDNAFEYIKNNGGLITEAAYPYRAARGT CNVARAAQNSPVVHIDGHQDVPANSEEDLARAVANQPVSVAVEASGKAFHFYSEG V FTGECGTGLDHSVA
*****:*****

```

```

ARMIDA_EPB2_Translated_-_Lon      VVGYGVS EDGKAYWTVINSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEASYPVKTYSKPKPTPRRALGARESL
ESPERANZA_EPB2_Translated_-_      VVGYGVS EDGKAYWTVINSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEASYPVKTYSKPKPTPRRALGARESL
ESMERALDA_EPB2_Translated_-_      VVGYGVS EDGKAYWTVINSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEASYPVKTYSKPKPTPRRALGARESL
ALINA_EPB2_Translated_-_Long      VVGYGVS EDGKAYWTVINSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEASYPVKTYSKPKPTPRRALGARESL
METCALFE_EPB2_Translated_-_L      VVGYGVS EDGKAYWTVINSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEASYPVKTYSKPKPTPRRALGARESL
Himalaya-rep_Translated_-_Fr      VVGYGVA EDGKAYWTVINSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEASYPVKTYSKPKPTPRRALGARESL
ADABELLA_EPB2_Translated_-_L      VVGYGVA EDGKAYWTVINSWGPSWGEQGYIRVEKDSGASGGLCGIAMEASYPVKTYSKPKPTPRRALGARESL
*****:*****

```

Fig. 39. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de EPB2 de todos los cultivares evaluados. En azul se denotan los aminoácidos conservados, en verde los aminoácidos que cambian a grupos muy similares, en azul oscuro los que cambian a aminoácidos con poca similitud y en negro los aminoácidos que cambian por otros que no guardan relación. En rojo se encierran los aminoácidos involucrados en el sitio activo, ninguno de ellos presenta alteraciones.

Tabla 12: Diferencias en la secuencia de aminoácidos de EPB2 de los diferentes cultivares. En amarillo se marca el consenso y en blanco los cambios puntuales. Las secuencias de los cultivares Armida, Esmeralda, Alina y Metcalfe son idénticas.

Posición	Consenso	Armida	Esperanza	Esmeralda	Alina	Metcalfe	Himalaya	Adabella
84	E	E	E	E	E	E	D	E
130	N	N	S	N	N	N	N	N
191	T	T	T	T	T	T	T	A
204	N	N	N	N	N	N	N	S
257	E	E	E	E	E	E	E	G
307	S	S	S	S	S	S	A	A
359	P	P	S	P	P	P	P	P
372	S	S	L	S	S	S	S	S

Los cambios observados no afectaron la ubicación de los aminoácidos involucrados en el sitio activo, que para esta enzima está constituido por una triada catalítica de aminoácidos Cys158, His297, y Asn318 de la enzima procesada (Bethune *et al.*, 2006), lo cual sugiere que la *EPB2* es funcional en todas las variedades analizadas.

8.9 Regeneración de plantas de cebada a partir de callo

Aunque los tres genotipos de cebada probados (S3, Esperanza y Armida) tuvieron la capacidad de regenerar plantas a partir de callo, las plantas regeneradas de la línea celular S3 y del cultivar Armida fueron albinas, y no mostraron signos de desarrollo de células fotosintéticas en ningún órgano de las plantas, a pesar de ser cultivadas en condiciones de luz (Fig. 40), de modo que estas plantas fueron incapaces de sobrevivir en condiciones *ex vitro*.

De los callos obtenidos del cultivar Esperanza, sólo el 10 % (n=50) de los cultivados en medio de regeneración regeneraron plantas completas, de las cuales un 8 % fueron albinas y sólo el 2 % restante fueron plantas normales (Fig. 41).

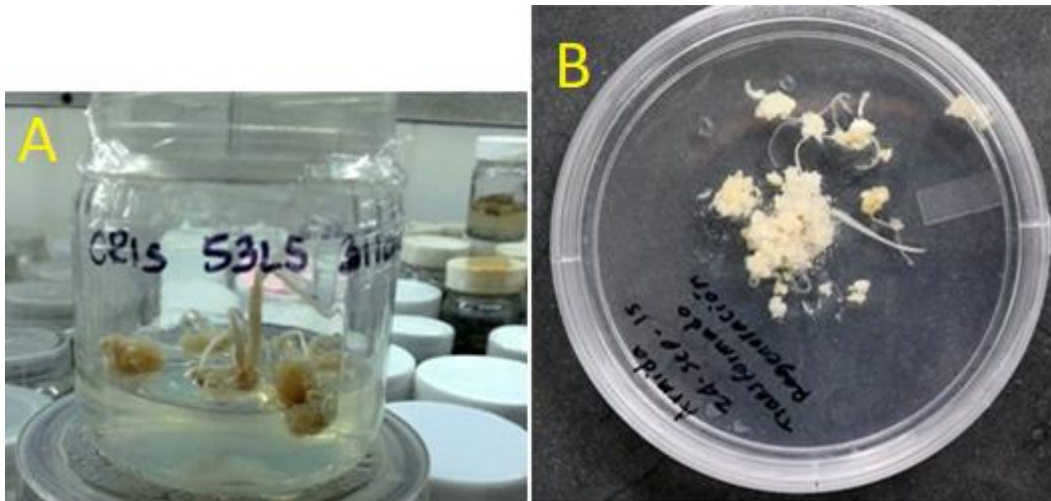


Fig. 40. Plantas regeneradas no fotosintéticas (no transformadas) de la línea celular S3 (A) y el cultivar Armida (B) creciendo en condiciones de luz.

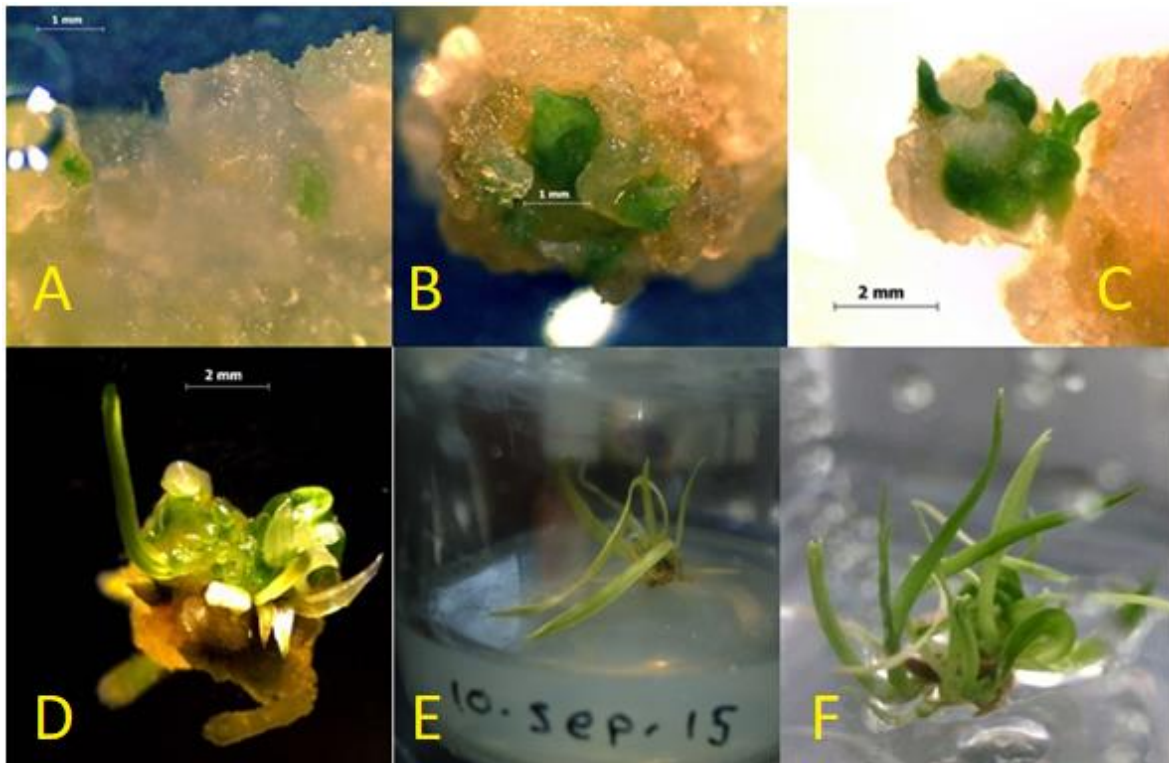


Fig. 41. Proceso de regeneración de plantas fotosintéticas (no transformadas) a partir de callo derivado de embrión inmaduro (Cv. Esperanza). Formación de brotes verdes en el callo (A); Diferenciación de hojas y tallos (B y C); Crecimiento y proliferación de plantas en el medio de regeneración (D); Crecimiento de las plantas en el medio de elongación (E y F).

Las plantas verdes fueron obtenidas gracias a la temprana identificación y proliferación de un solo callo con capacidad de regenerar plantas verdes. Una parte de este callo se conservó en medio de proliferación con el fin de usarlo posteriormente para regenerar plantas transgénicas, mientras que otra parte se colocó en medio de regeneración. Aproximadamente ocho plantas regeneradas fueron aclimatizadas a condiciones *ex vitro*, alcanzaron la madurez a los 4 meses y no presentaron malformaciones (Fig. 42).



Fig. 42. Aclimatización de plantas fotosintéticas obtenidas de la regeneración de callo (izquierda) y crecimiento de la planta hasta la fase adulta (derecha) en condiciones de invernadero.

Por otro lado, los callos transformados con la construcción $pBGWFS7::EPB2$ para sobreexpresar EPB2 bajo el control de su propio promotor, perdieron su capacidad de regenerar plantas al momento de ser cultivados en medio selectivo con BASTA 3 mg/L (Fig. 43). Se atribuye la pérdida de la capacidad regenerativa a la presencia de BASTA en el medio selectivo, ya que otros callos control que fueron transformados y cultivados en medio sin este agente de selección lograron regenerar plantas (Fig. 44). Sin embargo, la probabilidad de obtener plantas transgénicas de este callo no seleccionado es bastante baja, debido a la baja eficiencia de transformación mediante biobalística. Tres plantas regeneradas a

partir de este callo transformado se aclimatizaron a condiciones *ex vitro* (en invernadero) y mediante PCR se evaluó la presencia del terminador t35S para determinar si eran transgénicas, pero ninguna resultó positiva.

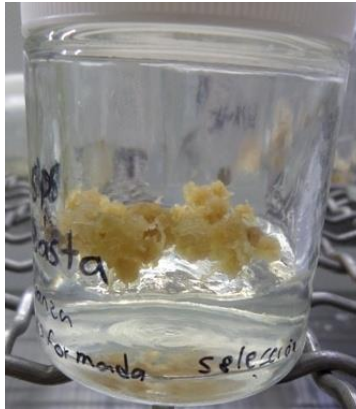


Fig. 43. Callo transformado no regenerativo en medio selectivo (BASTA 3mg/L) que perdió su capacidad de regenerativa, en condiciones de luz.

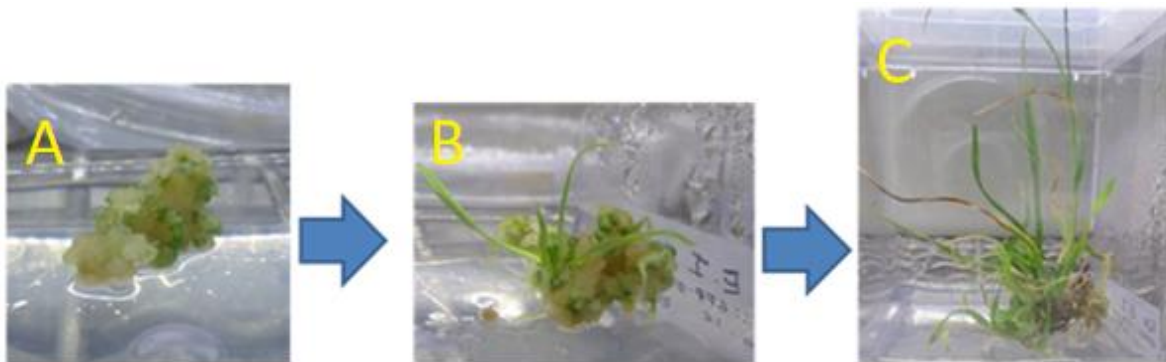


Fig. 44. Callos potencialmente transformados con capacidad regenerativa en condiciones de luz creciendo en medio sin BASTA. Formación de brotes sobre la superficie del callo en medio de regeneración (A); Crecimiento y desarrollo de hojas y tallos regenerados en medio de elongación (B y C).

9 DISCUSIÓN

9.1 La expresión de la Endoproteasa B está finamente regulada

Como se observó en los ensayos de Western Blot, la EPB no fue detectada en extractos de diferentes tejidos vegetativos (raíz, tallo y hoja), ni en semillas que no se encontraran en el proceso de germinación (semillas inmaduras a diferentes tiempos post-antesis o semillas maduras secas). Esto confirma que la EPB es una proteasa cuyo papel principal es la degradación de las proteínas de reserva de la semilla durante el proceso de germinación y desarrollo temprano de la plántula (Koehler y Ho, 1990; Marttila *et al.*, 1993).

Es importante que la expresión espacio-temporal de esta enzima no sea alterada, ya que de serlo, su expresión en etapas tempranas del desarrollo de la semilla podría ocasionar la degradación de las proteínas de reserva cuando la semilla aún se encuentra en formación, provocando alteraciones en el endospermo que conlleven la pérdida de la funcionalidad del tejido de reserva o incluso la muerte de la semilla en formación. De acuerdo a Koehler y Ho (1990), la expresión de EPB se encuentra regulada de forma positiva por la presencia de GA y de forma negativa ante la presencia de ABA. Durante el proceso de formación de las semillas se involucran diversas hormonas vegetales que actúan como reguladores genéticos. Se ha demostrado que el ABA tiene un papel importante en la regulación de la maduración de semillas durante las últimas etapas del desarrollo de las semillas, en las cuales, las concentraciones de ABA son elevadas, ya que participa en procesos como la deshidratación y la latencia, actuando como antagónico del GA. Por otro, lado el ABA actúa como un inhibidor de la germinación en semillas de cereales como el trigo, cebada, entre otros (King, 1982; Walker-Simmons, 1987). Esto sugiere que es importante inhibir la expresión de EPB durante la formación de las semillas en la planta e inducirla durante la germinación, que es cuando se reduce la concentración de ABA y se incrementa la de GA.

9.2 Expresión diferencial de EPB en distintos cultivares

Las inmunolocalizaciones realizadas en el cultivar Esmeralda demuestran que la EPB es una proteasa que se expresa principalmente en las células de la capa de aleurona tras las 48 h de imbibición de las semillas, lo cual coincide con lo reportado en otros trabajos (Koehler y Ho, 1990; Marttila *et al.*, 1993). Este patrón fue claramente observado en los ensayos de Western Blot de extractos de semillas de todos los cultivares de cebada analizados. Por otro lado, las inmunolocalizaciones realizadas en el cultivar Esmeralda revelaron que el escutelo es un tejido que también es capaz de producir EPB, cuya mayor expresión ocurre específicamente a las 24 h de imbibición, etapa en la que la producción de EPB en la capa de aleurona aún se encuentra muy por debajo de la observada en tiempos posteriores. En trabajos previos (Koehler y Ho, 1990; Marttila *et al.*, 1993) se ha visto la presencia de transcritos de mRNA y proteína de EPB en el escutelo al inicio de la germinación, lo cual indica que el escutelo podría tener un papel importante en la movilización de las reservas del endospermo.

Previamente se mencionó que en los ensayos de Western Blot se detectaron bandas muy tenues de EPB a las 24 h de imbibición en los cultivares Armida, Esmeralda y Metcalfe (Fig. 15). En el resto de los cultivares analizados (Esperanza, Adabella, Alina e Himalaya), no se detectó EPB en extractos de semillas a las 24 h de imbibición. Estas diferencias sugieren una expresión diferencial en estos dos grupos de cultivares señalados. Como ya se reportó anteriormente, los promotores de *EPB2* de los cultivares Armida, Esmeralda y Metcalfe son idénticos, lo cual podría explicar que la expresión de EPB en estos cultivares tenga el mismo comportamiento.

Si bien las secuencias de los promotores de *EPB2* de los cultivares Esperanza y Alina sólo presentan cambios puntuales en comparación con las secuencias de Armida, Esmeralda y Metcalfe, estos cambios podrían ser suficientes para disminuir la expresión de esta proteasa a las 24 h de imbibición al grado de ser indetectable en los ensayos de Western Blot. Sin embargo, el análisis de las secuencias en la búsqueda de sitios que pueden ser reconocidos por factores de

transcripción con el Software SoftBerry muestra que no hay diferencias en los motivos para los cultivares anteriormente mencionados, aún no se puede descartar que existan cambios estructurales a nivel de cromatina, información que el Software no puede predecir, o que bien, existen otros motivos que resultan afectados por estos cambios puntuales de las secuencias encontradas en los cultivares Esperanza y Alina que no se encuentran en la base de datos de este Software.

Por otra parte, se encontraron cambios importantes en los promotores de *EPB2* de los cultivares Himalaya y Adabella, que a diferencia de resto, carecen del motivo GARE-4, que tiene un papel fundamental en la respuesta a GA. Los elementos de respuesta a GA (GARE) son necesarios para la inducción de la transcripción de genes ante la presencia de GA y la supresión ante ABA, como ya se ha reportado en genes de α -amilasas y también para el gen *EPB1* de cebada (Gubler y Jacobsen, 1992; Lanahan *et al.*, 1992; Rogers y Rogers, 1992).

Se ha demostrado que la presencia de GA en células de aleurona induce la expresión del factor de transcripción GAMyb, el cual es capaz de interactuar con los elementos GARE y activar la expresión de genes de α -amilasas y también de proteasas (Gubler *et al.*, 1995; Gubler *et al.*, 1999). Por otra parte, análisis de mutaciones dirigidas en el promotor de *EPB1* realizados por Cercós *et al.* (1999) demostraron que secuencias pertenecientes a elementos GARE, una caja de pirimidina y una secuencia río arriba son esenciales para la inducción de *EPB1* ante GA. Basados en la secuencia consenso de los elementos GARE RTAACARANTCYGG, Cercós *et al.* (1999) encontraron cuatro secuencias dentro del promotor de *EPB1* a las que denominaron GARE-1 a GARE-4 respectivamente. Las mutaciones dirigidas hacia cada uno de estos GARE concluyeron que la alteración de las secuencias de, GARE-1, GARE-2 y GARE-3 no afecta de manera significativa la inducción de *EPB1* ante la presencia de GA, mientras que mutaciones en la secuencia GARE-4 alteran totalmente la respuesta de *EPB1* a GA, de modo que GARE-4 es el elemento más importante de los cuatro encontrados, en específico, los últimos tres nucleótidos de la secuencia,

que al ser mutados, reducen la respuesta a GA de 6 a 8 veces en comparación con el elemento sin la mutación.

En este estudio no se analizó el promotor de *EPB1* de cultivares mexicanos, sin embargo, se sugiere que los cultivares Armida, Esperanza, Alina, Esmeralda y Metcalfe poseen un promotor de *EPB2* con una mayor capacidad de inducir la expresión de este gen en respuesta a GA en comparación con los cultivares Adabella e Himalaya que carecen la principal secuencia de interacción con el factor de transcripción GAMyb. Si bien los ensayos de tipo Western Blot apoyan esta hipótesis, aún es necesario probarla mediante la comparación de niveles de transcritos de este gen en los cultivares mencionados, así como también hacer comparaciones de ensayos de la funcionalidad de este promotor. También sería enriquecedor clonar la secuencia promotora y codificante de *EPB1* de los cultivares mexicanos y compararla con la reportada ya que se podrían descubrir nuevas mutaciones presentes en el cultivar reportado Himalaya como sucedió con el gen *EPB2*.

En cuanto a la calidad de la malta, en términos de la expresión de *EPB2*, los cultivares estudiados se podrían dividir en dos grupos: aquellos con una expresión de *EPB* “estándar” aptos para malteo y que en teoría deberían tener una correcta degradación de las hordeínas durante el macerado que son Armida, Esperanza, Alina, Esmeralda y Metcalfe; y aquellos con una expresión afectada o reducida, debido a una respuesta de inducción menor a GA, que son los cultivares Himalaya y Adabella. Se sabe que el cultivar Himalaya no se usa para procesos de malteo ni producción de cerveza, sino que tiene una importancia como modelo biológico, ya que es el cultivar del que se han secuenciado más genes, especialmente los involucrados en procesos de germinación como amilasas, proteasas, glucanasas y otras hidrolasas. Por otra parte, se sabe que el cultivar Adabella es “malo” para la producción de cerveza por tener un mal rendimiento al ser usado como malta (datos no publicados). Su uso en la industria cervecera podría ser debido a que este cultivar tenga resistencia a patógenos o a otros factores que le brinda a la cerveza como olores, sabores o cuerpo, espuma, etc. Cabe mencionar que la

industria cervecera no brinda datos de la composición de maltas utilizadas en sus productos con el fin de mantener sus fórmulas secretas, de modo que es difícil inferir la razón por la cual usan el cultivar Adabella.

9.3 Regeneración *in vitro* de plantas fotosintéticas a partir de callo derivado de embriones inmaduros

La mayoría de los protocolos de transformación desarrollados para cebada están destinados para su aplicación en el cultivar modelo Golden Promise; sin embargo, este no es un cultivar de importancia agronómica. Lamentablemente los protocolos establecidos para la regeneración de este cultivar modelo no son aplicables a la mayoría de los cultivares de cebada de importancia comercial debido a la baja tasa de regeneración presentada en muchos de ellos (Bregitzer *et al.*, 1998; Vyroubalová *et al.*, 2011). Debido a lo exhaustivo que sería establecer protocolos específicos para la generación de callo y regeneración *in vitro* de plantas de los cinco cultivares de cebada mexicanos empleados en este trabajo, se decidió probar únicamente los medios de inducción de callo (Wan y Lemaux, 1994) y de regeneración (Marthe, 2015) que han reportado una gran eficiencia sobre los cultivares Esperanza y Armida que tienen una gran importancia en la industria cervecera mexicana.

Si bien se logró la regeneración de plantas a partir de callo derivado de embriones inmaduros de los cultivares Armida y Esperanza, únicamente un bajo porcentaje de callos del cultivar Esperanza (2 % n=50 callos) fue capaz de regenerar plantas fotosintéticas, ya que todas las plantas regeneradas del cultivar Armida fueron albinas. Sin embargo, una vez identificado un callo como competente para la regeneración de plantas verdes, éste pudo ser fácilmente propagado y posteriormente ser usado con éxito para regenerar un mayor número de plantas.

Se ha reportado que la regeneración exitosa de plantas fotosintéticas de cebada es altamente dependiente del genotipo y la composición del medio de cultivo como fuente de carbono, concentración de cobre, y la concentración de los reguladores

de crecimiento como auxinas y citocininas (Mrízová *et al.*, 2014). De modo que se necesita un estudio exhaustivo que evalúe todos estos factores en los cultivares de cebada de mayor importancia en la industria cervecera.

Las observaciones hechas en este trabajo sugieren que es conveniente identificar los callos derivados de cada embrión inmaduro y dejarlos en medio de cultivo de inducción/proliferación (Wan y Lemaux, 1994) durante un periodo de tiempo de 2 a 3 meses, haciendo subcultivos frecuentes (2 a 3 semanas), lo que permitirá tener suficiente masa para evaluar la capacidad regenerativa de cada callo genotípicamente diferente. Para probar la capacidad de regenerar plantas verdes de cada callo, se sugiere colocar un pequeño fragmento de callo en medio de regeneración (Marthe, 2015) en condiciones de luz, pero manteniendo un respaldo de dicho callo en medio de proliferación en oscuridad. Si alguno de los callos en condiciones de luz regenera plantas verdes, su contraparte guardada en oscuridad también lo hará, y es posible mantener estos callos en constante proliferación. De esta forma es posible establecer líneas de callo con capacidad de regenerar plantas verdes a pesar de tener bajos porcentajes de regeneración exitosa.

En este trabajo se estableció un protocolo exitoso para la regeneración *in vitro* de cebada del cultivar Esperanza; no obstante, este mismo protocolo no pudo ser utilizado para la regeneración de plantas transformadas mediante biobalística. El factor limitante para este proceso fue la presencia del agente selectivo. Si bien se han reportado trabajos en los que se ha utilizado BASTA® como agente selectivo en cultivares como Golden Promise, transformados con el gen *bar* que le brinda resistencia a este herbicida. (Wan and Lemaux, 1994; Tingay *et al.* 1997; Nuutila *et al.*, 1999; Tull *et al.* 2003; Joensuu *et al.*, 2006), los resultados de estos experimentos muestran que el proceso de regeneración siempre será muy dependiente del genotipo, de modo que las respuestas de un cultivar de cebada en específico son impredecibles, especialmente si no ha sido estudiado antes.

Otros agentes de selección empleados en la regeneración de cebada son la kanamicina y la higromicina (Vyroubalová *et al.*, 2011), sin embargo, nuestros resultados muestran que es necesario establecer primero la tolerancia de los

callos transformados a estos agentes para determinar si su presencia afecta de forma negativa al desarrollo y regeneración *in vitro* de los callos.

Aún quedan muchos factores limitantes para el establecimiento de un protocolo rutinario de transformación de cebada de cultivares mexicanos, pero se espera que este trabajo sirva de punto de partida para futuros trabajos en este ámbito. Se sugiere que futuros trabajos profundicen los métodos aquí descritos utilizando otros agentes de selección así como el establecimiento de las concentraciones de reguladores de crecimiento adecuadas en los medios de cultivo que puedan influir de manera positiva la regeneración de plantas fotosintéticas en el cultivar Esperanza o en otros cultivares usados en México.

10 CONCLUSIONES

La EPB es una proteasa que sólo se expresa durante la germinación de las semillas. El escutelo y la capa de aleurona son los tejidos donde se observó la mayor expresión de EPB, específicamente a las 24 h de imbibición en el escutelo y a partir de las 40 h de imbibición en la capa de aleurona.

La región promotora de *EPB2* es funcional en tejidos de semilla y callos derivados de embriones de cebada.

La expresión de EPB2 se ve disminuida en los cultivares Himalaya y Adabella, los cuales tienen una mutación en la secuencia GARE-4 de la región promotora, involucrada en la transcripción del gen en respuesta a GA.

Se generó un plásmido con el promotor y la región codificante de EPB2 con el cual se podría sobreexpresar esta proteasa durante la germinación de semillas.

Se estableció un protocolo para la regeneración de plantas del cultivar mexicano Esperanza a partir de callos derivados de embriones inmaduros cultivados *in vitro*.

11 PERSPECTIVAS

- Realizar análisis de RT-PCR para determinar si existe una menor cantidad de transcritos de RNA de *EPB2* en los cultivares Adabella e Himalaya, y establecer su relación con los polimorfismos encontrados en la región promotora de estos cultivares.
- Adecuar el protocolo de regeneración *in vitro* establecido con el uso de un agente de selección apropiado para la generación de plantas de cebada transgénicas del cultivar mexicano Esperanza.
- Conocer más a fondo el papel de otras proteínas que intervienen en la calidad de la malta para así poder manipular la expresión de estos genes de forma adecuada y lograr la generación de plantas de cebada con características mejoradas enfocadas al proceso de producción de cerveza mediante la edición de genoma.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Ambawat S., Sharma P., Yadav N. R. y Yadav R. C. 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*: 19, 307-321.
- Arias García V. O. 2013. Comportamiento de Genotipos de Cebada por Rendimiento de Grano y algunos de sus Componentes (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.
- Bethune M. T., Strop P., Tang Y., Sollid L. M. y Khosla, C. 2006. Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chemistry & biology*, 13, 637-647.
- Beyene G., Foyer C. H. y Kunert K. J. 2006. Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*. 57, 1431-1443.
- Birch R. G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:297–326.
- Briggs D. E., Boulton C. A., Brookes P. A. y Stevens R. 2004. *Brewing: Science and Practice*. CRC Press LLC, Florida. USA. 900 pp.
- Bryce J., Goodfellow V., Agu R., Brosnan J., Bringhurst T. y Jack F. 2010. Effect of different steeping conditions on endosperm modification and quality of distilling malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 116, 125-133.
- Capocchi A., Cinollo M., Galleschi L., Saviozzi F., Calucci L., Pinzino C. y Zandomenighi M. 2000. Degradation of gluten by proteases from dry and germinating wheat (*Triticum durum*) seeds: an *in vitro* approach to storage protein mobilization. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48, 6271-6279.

- Carlson A. R., Letarte J., Chen J. y Kasha K. J. 2001. Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green-fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 20,331–7.
- Cercós M., Gómez-Cadenas A. y Ho, T. H. D. 1999. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *The Plant Journal*: 19, 107-118.
- Cho, M. J., Jiang W. y Lemaux P.G. 1998. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement in regenerability and decreased albinism. *Plant Science*. 138, 229–244.
- Colgrave M., Goswami H., Howitt C. y Tanner G. 2012. What is in a beer? Proteomic Characterization and Relative Quantification of Hordein (Gluten) in Beer. *Journal of Proteome Research*. 11, 386-396
- Copeland L. O. y McDonald M. B. 2001. Principles of seed science and technology. Fourth edition. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts, USA. 467 pp.
- Danilova S. A. 2007. The technologies for genetic transformation of cereals. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54,569–81.
- Davy A., Sørensen M. B., Svendsen I., Cameron-Mills V. y Simpson D. J. 2000. Prediction of protein cleavage sites by the barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B based on the kinetics of synthetic peptide hydrolysis. *Plant physiology*. 122, 137-146.
- Fincher, G. B. 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40, 305-346
- Gubler F. y Jacobsen J. V. 1992. Gibberellin responsive elements in the promoter of a barley high-pl α -amylase gene. *Plant Cell*: 4, 1435-1441.
- Gubler F., Kalla R., Roberts J. K. y Jacobsen J. V. 1995. Gibberellin-Regulated Expression of a myb Gene in Barley Aleurone Cells: Evidence for Myb Transactivation of a High-pl α -Amylase Gene Promoter. *The Plant Cell*: 7, 1879-1891.

- Gubler G., Raventos D., Keys M., Watts R., Mundy J. y Jacobsen V. 1999. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant Journal*: 17, 1-9.
- Harwood W. A., Ross S. M., Cilento P. y Snape J. W. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). 2000. *Euphytica* 111, 67–76.
- He, F. 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol* Bio101: e80
- Hensel G., Valkov V. y Middlefell-Williams J. 2008. Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions *Journal of Plant Physiology*. 165, 71–82.
- Holme I. B., Brinch-Pedersen H., Lange M. 2006. Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of *in vitro* cultured ovules. *Plant Cell Reports*. 25, 1325–1335.
- Holme I.B., Brinch-Pedersen H., Lange M. 2008. Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of *in vitro* cultured ovules. *Plant Cell Reports*. 27, 1833–1840.
- Hough J. S. 1990. *Bioteconología de la cerveza y de la malta*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 185 pp.
- Hughes P. S., y Baxter E. D. 2003. *Cerveza: Calidad, higiene y características nutricionales*. Acribia. Zaragoza, España.
- Jacobsen J. V. y Varner J. E. 1967. Gibberellic acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant physiology*. 42, 1596-1600.
- Jahne A., Becker D., Brettschneider R. y Lorz H. 1994. Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theoretical and Applied Genetics* 89:525–33.
- Jensen L.G., Olsen O., Kops O., Wolf N. y Thompsen K.K. 1996. Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)-beta glucanase during germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:3487–3491.

- Joensuu J. J., Kotiaho M., Teeri T.H., Valmu L., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey K. M. y Niklander-Teeri, V. 2006. Glycosylated F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in barley endosperm induces ETEC-neutralizing antibodies in mice. *Transgenic Research*. 15, 359-373.
- Jones B. L. 2005. Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 42, 139-156.
- Kalinova-Jelezova M. 2017. La PDI como marcador molecular de acumulación de proteínas en semillas de cebada (Tesis de Maestría). Facultad de Química. Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 84 pp.
- Kartha K. K, Chibbar R. N., Georges F., Leung N., Caswell K., Kendall E. y Qureshi, J. 1989. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (Cat) gene in barley cell-cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant cell reports* 8,429–32.
- Kihara M., Okada Y., Kuroda H., Saeki K., Yoshigi N., Ito K. 2000. Improvement of β -amylase thermostability in transgenic barley seeds and transgene stability in progeny. *Molecular Breeding*. 6, 511–517
- Kikkert J. R., Vidal J. R. y Reisch B. I. Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biostics. 2004. In: Peña L, editor. *Transgenic plants: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. p. 61–78
- King R.W. 1982. Abscisic acid in seed development: The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp 157-181
- Klein T. M., Wolf E. D., Wu R. y Sanford J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature* 327, 70–3.
- Kleinwächter M., Meyer A. y Selmar D. 2012. Malting revisited: Germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) is inhibited by both oxygen deficiency and high carbon dioxide concentrations. *Food Chemistry* 132, 476-481.
- Knudsen S. y Muller M. 1991. Transformation of the developing barley endosperm by particle bombardment. *Planta* 185:330–6.

- Koehler S y Ho T. H. D. 1988. Purification and characterization of gibberellic acid-induced cysteine endoproteases in barley aleurone layers. *Plant Physiology*. 87:95-103.
- Koehler S. M. y Ho T. H. D. 1990a. Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers. *Plant Cell* 2:769-783.
- Koehler S. M. y Ho T. H. D. 1990b. A major gibberellic acid-induced barley cysteine proteinase which digests hordein. *Plant Physiology*. 94:251-258.
- Kumamaru T., Ogawa M., Satoh H. y Okita T. W. 2007. Protein body biogenesis in cereal endosperms. *Plant Cell Monographs*. 8, 141-158.
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G. 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal*. 4, 251–261.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanahan M. B., Ho, T. H. D., Rogers, S. W. y Rogers J. C. 1992. A gibberellin response complex in cereal α -amylase gene promoters. *Plant Cell*: 4, 203-211.
- Legge W. G., Metcalfe D. R., Haber S., Harder D. E., Noll J. S., Teauz A. y Thomas P. L. 2003. AC Metcalfe barley. *Journal of Plant Science*. 83 pp. 381-384.
- Leckband G. y Lörz H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. 1998. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 1004–12.
- Ling J. Q., Kojima T., Shiraiwa M. y Takahara H. 2003. Cloning of two cysteine proteinase genes, CysP1 and CysP2, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1627, 129-139.
- López-Curto M., Márquez-Guzmán J. y Murguía Sánchez G. 2005. Técnicas para el estudio de angiospermas. Las prensas de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 178 pp.

- Mannonen L., Aspergen K., Ritala A., Simola H. y Teeri T. H. 1998. Barley as a producer of heterologous protein. In: Cunningham C. and Porter A.J.R. (eds.), *Recombinant Protein from Plants*. Humana Press, NJ, Totowa, pp. 11–25
- Marthe C., Kumlehn J. y Hensel G. 2015. Barley (*Hordeum vulgare* L.) Transformation Using Immature Embryos. In *Agrobacterium Protocols* (pp. 71-83). Springer New York.
- Marttila S, Jones B. L., Mikkonen A. 1995. Differential localization of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed. *Physiologia Plantarum*. 93:317-327
- Marttila S., Porali I., Ho T. H. D. y Mikkonen A. 1993. Expression of the 30 kD cysteine endoprotease B in germinating barley seeds. *Cell Biology International*. 17, 205-212.
- McElroy D., Louwerse J. D., McElroy S. M. y Lemaux P. G. Development of a simple transient assay for Ac/Ds activity in cells of intact barley tissue. 1997. *Plant Journals* 11,157–65.
- Mendel R. R., Muller B., Schulze J., Kolesnikov V. y Zelenin A. Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theoretical and Applied Genetics* 78, 31–4.
- Miller B. L. y Huffaker R. C. 1985. Differential induction of endoproteinases during senescence of attached and detached barley leaves. *Plant physiology*. 78, 442-446.
- Mikkonen A., Porali I., Cercos M. y Ho T. H. D. 1996. A major cysteine proteinase, EPB, in germinating barley seeds: structure of two intronless genes and regulation of expression. *Plant Molecular Biology* 31, 239-254.
- Mrízová K., Holasková E., Öz M. T., Jiskrová E., Frébort I. y Galuszka P. 2014. Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology advances*. 32, 137-157.
- Müntz K., Belozersky M. A., Dunaevsky, Y. E., Schlereth, A. y Tiedemann, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization

in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1741-1752.

- Nájera-Torres E. 2017. Identificación y caracterización de la actividad proteolítica durante el macerado en diferentes variedades de cebadas cerveceras (Tesis de maestría). Facultad de Química. Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 116 pp.
- Navarrete Tabla M. A. 2016. Identificación de hordeínas para evaluar su potencial como marcadores moleculares en variedades mexicanas de cebada (Tesis de licenciatura). Facultad de Química. Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 90 pp.
- Nonogaki H., Bassel G. W. y Bewley J. D. 2010. Germination - Still a mystery. *Plant Science* 179, 574-581.
- Nuutila A. M., Hämäläinen J. y Mannonen L. 2000. Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). - *Plant Science*. 151, 85-92.
- Okamoto T., Shimada T., Hara-Nishimura I., Nishimura M. y Minamikawa T. 2003. C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiology*, 132, 1892-1900.
- Permyakova N. V., Shumnyi V. K., Deineko E. V. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: transfer of vector DNA fragments in the plant genome. *Russian journal of genetics*. 45, 266–75.
- Phillips H. A. y Wallace W. 1989. A cysteine endopeptidase from barley malt which degrades hordein. *Phytochemistry*. 28, 3285-3290.
- Poulle M., Jones B. L. 1988. A proteinase from germinating barley. *Plant Physiology*. 88, 1454-1460.
- Ramírez P. J., Zamora D. M., Márquez C. L. A., Ibáñez C. A. M. 1997. Esperanza: Variedad de cebada maltera para el Bajío. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación

Regional del Centro. Campo Experimental El Bajío. Boletín Técnico Núm. 1. México, D.F. 20 pp.

- Rechinger K. B., Simpson D. J., Svendsen I. y Cameron-Mills V. 1993. A role for g3 hordein in transport of prolamins to the vacuole in developing barley endosperm. *Plant Journal*. 4, 841–853.
- Ritala A., Wahlstrom E. H., Holkeri H., Hafren A., Makelainen K., Baez J., Mäkikien K. y Nuutila A. M. Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures. 2008. *Protein Expression and Purification* 59,274–81.
- Rogers J. C. y Rogers S. W. 1992. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid cis-acting hormone response complexes. *Plant Cell*: 4, 1443-1451.
- Saldívar S. R. S. 2009. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT Editor. México. DF
- Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D. y Allen N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5, 27–37.
- Shewry P., Napier J. y Tatham A. 1995. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *The Plant Cell*. 7, 945-956.
- Shewry P. y Tatham A. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *The Biochemical Journal*. 267, 1-12.
- Shirasu K., Nielsen K., Piffanelli P., Oliver R. y Schulze-Lefert P. Cell-autonomous complementation of mlo resistance using a biolistic transient expression system. 1999. *Plant Journals* 17,293–9.
- Solano-Hernández S., Zamora-Díaz M., Gámez-Vázquez F. P., García Rodríguez J. J., Sánchez de la Cruz R., Ireta-Moreno J., Díaz-Espino F. y Garza-García R. 2009. Alina, nueva variedad de cebada maltera para riego en el Bajío. *Agricultura técnica en México*. 35, 471-473.
- Soreng R. J. 2003. *Hordeum*. 48, 389–402. In: Soreng R. J., Peterson P. M., Davidse G., Judziewicz E. J., Zuloaga F. O., Filgueiras T. S. y Morrone O.

- (eds.). Catalogue of new world grasses (Poaceae): IV. Subfamily Pooideae. Contributions from the United States National Herbarium, 48, 1-730.
- Sørensen M. B., Muller M., Skerritt J., Simpson D. 1996. Hordein promoter methylation and transcriptional activity in wildtype and mutant barley endosperm. *Molecular and General Genetics*. 250, 750–760.
 - Stevens C., Titarenko, E., Hargreaves J. A. y Gurr S. J. 1996. Defense-related gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora (Septoria) nodorum* and barley (*Hordeum vulgare* L.) coleoptile cells. *Plant molecular biology*. 31, 741-749.
 - Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S. y Brettell R. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* 11, 1369-1376.
 - Travella S., Ross S. M., Harden J., Everett C., Snape J. W. y Harwood W. A. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. 2005. *Plant Cell Reports* 23,780–9.
 - Tull D., Phillipson B. A., Kramhoft B., Knudsen S., Olsen, O. y Svensson B. 2003. Enhanced amylolytic activity in germinating barley through synthesis of a bacterial alpha-amylase. *Journal of Cereal Science*. 37, 71-80.
 - Ullrich S. E. 2011. Barley production, improvement and uses. Wiley-Blackwell. Ames, IA, USA. 500 pp.
 - Vora H., McIntire J., Kumar P., Deshpande M. y Khosla, C. 2007. A scaleable manufacturing process for pro-EP-B2, a cysteine protease from barley indicated for celiac sprue. *Biotechnology and bioengineering*, 98, 177-185.
 - Vyroubalová Š., Šmehilová M., Galuszka P. y Ohnoutková, L. 2011. Genetic transformation of barley: limiting factors. *Biologia Plantarum*, 55, 213-224.
 - Walker-Simmons M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant physiology*, 84, 61-66.

- Wan Y. y Lemaux P. G. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*. 104, 35-47.
- Willaert R. 2006. Biochemistry and fermentation of beer. In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Hui, Y. H. (ed.) Vol. 4. FL, USA. pp. 1-20.
- Zamora-Díaz M., Márquez-Cedillo L. A., Ramírez-Pérez F. e Ibáñez-Carranza. A. M. 1997. Esmeralda, variedad de cebada maltera para los Valles Altos. SAGARPA–Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigaciones de la Región Centro (CIRCE), Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX). Folleto técnico núm. 5. Chapingo, Estado de México, México.
- Zamora-Díaz M., Solano-Hernández S., Gómez-Mercado R., Rojas-Martínez I., Ireta-Moreno J., Garza-García R. y Ortiz-Trejo C. 2008. Adabella: variedad de cebada maltera para valles altos de la mesa central de México. *Agricultura técnica en México*. 34, 491-493.
- Zamora-Díaz M., Solano-Hernández S., Garza-García R., Islas-Gutiérrez J., Huerta-Zurita R. y López Cano M. 2010. Armida, nueva variedad de cebada maltera para riego en El Bajío. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 1, 723-726.
- Zarnkow M., Mauch A., Back W., Arendt E. K. y Kreis S. 2007. Proso millet (*Panicum miliaceum* L.): An evaluation of the microstructural changes in the endosperm during the malting process by using scanning-electron and confocal laser microscopy. *Journal of the Institute of Brewing*. 113, 355-364.
- Zhang N. y Jones B. I. 1996. Purification and partial characterization of a 31-kDa cysteine endopeptidase from germinated barley. *Planta*. 199, 565-572.
- Zhang S., Cho M. J., Koprek T., Yun R., Bregitzer P. y Lemaux P. G. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. 1999. *Plant Cell Reports* 18,959–66.

- Zohary D., Hopf M. y Weiss E. 2012. Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. Oxford University Press on Demand. 243 pp.

13 ANEXOS

13.1 Anexo I: Extracción y purificación de plásmido (Maxi-Prep)

1. Precrecer la cepa de *E. coli* con el plásmido elegido en medio LB selectivo (líquido) por 6 h aproximadamente.
2. Inocular la cepa precrecida en 500 mL de medio LB empleando un matraz de 2 L y dejar creciendo en agitación continua por toda la noche.
3. Centrifugar el cultivo a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C separando dos lotes de 250 mL. Desechar sobrenadante.
4. Resuspender cada botón con 5 mL de solución GTE (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl pH 5 25 mM)
5. Agregar 10 mL de solución de lisis alcalina (NaOH 200 mM, SDS 1 %) agitando suavemente hasta obtener una solución clara.
6. Pasar la solución a tubos Corex (50 mL) y añadir 7.5 mL de solución de neutralización (acetato de sodio 3 M pH 5). Mezclar por inversión.
7. Incubar en hielo por 30 min.
8. Centrifugar a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C.
9. Colectar el sobrenadante en un tubo nuevo y adicionar un volumen de isopropanol frío (-20°C).
10. Incubar a -20°C por lo menos durante 1 h.
11. Centrifugar a 10000 rpm por 15 min a 4°C.
12. Descartar sobrenadante y dejar secar el botón.
13. Disolver el botón en 3 mL de agua.
14. Adicionar 3 mL de LiCl 5M previamente enfriado en hielo. Mezclar bien y centrifugar a 9000 rpm por 10 min a 4°C.
15. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Adicionar un volumen de isopropanol y centrifugar a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C.
16. Decantar cuidadosamente e invertir el tubo para que drene bien.
17. Disolver el botón en 0.5 mL de agua que contenga 10 µL de RNAsa (stock: 20 mg/mL) libre de DNAsa. Transferir en un Eppendorf e incubar a 37°C por 30 minutos.

18. Adicionar 0.5 mL de NaCl 1.6 M que contenga PEG 8000 13 %. Mezclar bien. Recuperar el plásmido por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos en microcentrífuga.
19. Eliminar el sobrenadante y disolver el botón en 0.5 mL de agua.
20. Agregar 0.5 mL de PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1) y agitar con vórtex.
21. Centrifugar a máxima velocidad y recuperar la fase acuosa superior.
22. Añadir un tercio de volumen de acetato de amonio 10 M y dos volúmenes de etanol absoluto.
23. Homogeneizar por inversión y conservar a -20°C por lo menos 1 h.
24. Centrifugar a 14000 rpm por 10-15 minutos.
25. Descartar el sobrenadante y lavar dos veces el botón con 1mL de etanol 70 % frío y recuperar el botón en cada ocasión que se centrifugue de 2 a 5 minutos en microcentrífuga.
26. Secar el botón centrifugando en vacío (speed back) hasta que la pastilla se seque y sea transparente.
27. Resuspender cada botón en 200 µL de agua (volumen final de 400 µL).

13.2 Anexo II: Prueba histoquímica para detectar la actividad del gen reportero gus en tejido vegetal transformado.

1. Remover el medio de cultivo de las células o tejidos.
2. Sumergir los tejidos en la solución de tinción para detectar gus (fosfato de sodio pH 7 0.1 M, EDTA pH 8 10 mM, Tritón X-100 0.1 % (v/v), $K_3Fe(CN)_6$ 1mM, X-Gluc 2 mM).
3. Incubar los tejidos en la solución por 12-72 h a 37°C.
4. Remover la solución de tinción.
5. Lavar los tejidos varias veces con etanol 50 % (hasta 12 h por lavado), hasta que el tejido se aclare.

13.3 Anexo III: Medio de inducción de callo de cebada a partir de embriones inmaduros (Wan y Lemaux, 1994).

Reactivos	Concentración final en el medio
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1.65 g/L
KNO ₃	1.9 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.37 g/L
KH ₂ PO ₄	0.17 g/L
CaCl ₂ ·2·H ₂ O	0.44 g/L
Micronutrientes	
KI	0.83 mg/L
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ H ₂ O	16.89 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·5H ₂ O	25 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 mg/L
Quelantes	
Na ₂ EDTA	37.3 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8 mg/L
Otros componentes	
Caseína hidrolizada	1 g/L
Prolina	0.69 g/L
Tiamina-HCl	1 mg/L
Reguladores de crecimiento	
Dicamba	2.5 mg/L
Fuente de carbono	0.002
Maltosa	30
Gelificante	
Phytigel	3.5
pH	5.7~5.8

13.4 Anexo IV: Medio de regeneración de callo de cebada (Marthe *et al.*, 2015)

Reactivos	Concentración final en el medio
Macronutrientes K4N	
NH ₄ NO ₃	0.32g/L
KNO ₃	3.64g/L
KH ₂ PO ₄	0.34g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.441g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246g/L
Micronutrientes K	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.084mg/L
H ₃ BO ₃	0.031mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.072mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0012mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00025mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00025mg/L
KI	0.0017mg/L
Vitaminas B5	
myo-Inositol	100mg/L
Ácido nicotínico	1mg/L
Piridoxina-HCl	1mg/L
Tiamina HCl	10mg/L
Quelantes	
NaFeEDTA	27.53 g/L
Otros componentes	
L-glutamina	0.1464 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.245 mg/L
Reguladores de crecimiento	
6-BAP	0.225 mg/L
Fuente de carbono	
Maltosa	36 g/L
Gelificante	
Phytigel	3 g/L
pH 5.8	

13.5 Anexo V: Alineamiento de promotores de EPB1 y EPB2 con los diferentes elementos de respuesta a GA

GARE-1

```
Himalaya_prom CGCCAGGCACAACAGCACTACGCACGTACGTGATCGATCAAGTATGACCAGTAAGTGCATCTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Adabella_prom CGCCAGGCACAACAGCACTACGCACGTACGTGATCGATCAAGTATGACCAGTAAGTGCATCTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Armida_prom CGCCAGGCA-----CTACGCACGTACGTGATCGATCAAGTATGACCAGTAAGTGCATCTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Alina_prom CGCCAGGCA-----CTACGCACGTACGTGATCGATCAAGTATGACCAGTAAGTGCATCTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Esperanza_prom CGCCAGGCA-----CTACGCACGTACGTGATCGATCAAGTATGACCAGTAAGTGCATCTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
GARE-1 -----GTAAGTGCATCTAC-----
EPB1_promotor CGCCAGGCACA-----CTACGCACGTACGTGATCGATCAAGTATGACCAGTAAGTGCATCTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
*****
```

GARE-2

```
Himalaya_prom CGCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACCCTGCCGCTCAG
Adabella_prom CGCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC--CTCCGCTCAG
Armida_prom CGCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC-----AG
Esperanza_prom CGCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC-----AG
Alina_prom CGCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC-----AG
GARE-2 -----CCAGCAGAATCTGA-----
EPB1_promotor CGCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACCAGCATTCTGTTAC
*****
```

GARE-3

```
Himalaya_prom AGTACCAGCGCCGCAC-GCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACCCTGCCGCTCAGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Adabella_prom AGTACCAGCGCCGCAC-GCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC--CTCCGCTCAGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Armida_prom A---CCAGCGCCGCAC-GCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC-----AGCATTCTGTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Alina_prom A---CCAGCGCCGCAC-GCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC-----AGCATTCTGTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Esperanza_prom A---CCAGCGCCGCAC-GCAATTCGGGAGCAAGCTGCAACCACCTTCGAGCAGAATCTGACACC-----AGCATTCTGTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
[-]_GARE-3 -----GCAGAATCTGACAC-----
EPB1_promotor A---CCAGCGCCGCACGCAACTCGGGAG-AAGCTAGAACCACTTCGAGCAGAATCTGACACC-----AGCATTCTGTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
*****
```

GARE-4

```
Himalaya_prom ACCCGTCCCGCTCAGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Adabella_prom ACCG--CTCCGCTCAGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Armida_prom ACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Esperanza_prom ACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
Alina_prom ACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
[-]_GARE-4 -----CC-----
EPB1_promotor ACC-----AGCATTCTGTTACCGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGC
** *****
```

Box 1

```
Himalaya_prom CTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Adabella_prom CTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Armida_prom CTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Esmeralda_prom CTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Alina_prom CTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
Box_1 -----CATCCAT-----
EPB1_promotor CTACCCCGATTCTACGGCGGCGTAGCATCCATACATAGAACGGCACACCTACGGTCAGCA
*****
```

Pyrimidine box

```
Himalaya_prom CGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGCAAAGCAATCGATCTCTGCTTTACC
Adabella_prom CGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGCAAAGCAATCGATCTCTGCTTTACC
Armida_prom CGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGCAAAGCAATCGATCTCTGCTTTACC
Esmeralda_prom CGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGCAAAGCAATCGATCTCTGCTTTACC
Alina_prom CGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGCAAAGCAATCGATCTCTGCTTTACC
Pyrimidine_box -----TTTTTCC-----
EPB1_promotor CGCCATTTAAACCTCCTCGTGTGTTTTCCGCGCAAAGCAATCGATCTCTGCTTTACC
***** **
```