



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Expresión de marcadores moleculares para
mejoramiento de cebada maltera durante el desarrollo
de semilla.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
MARIELA KALINOVA JELEZOVA

MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Vocal: Euclides Avila Chávez

Secretario: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

1er. Suplente: Martha Patricia Coello Coutiño

2do. Suplente: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

**LABORATORIO 103 DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SUSTENTANTE:

Mariela Kalinova Jelezova



ÍNDICE

1. Dedicatorias y Agradecimientos	5
2. Resumen	6
3. Introducción	
3.1. Descripción de la cebada.	7
3.2. Breve historia e importancia de la cerveza.....	8
3.3. Mejoramiento de la cebada.....	12
3.4. Marcadores moleculares.	15
4. Antecedentes	20
4.1. Trabajos previos.	24
4.2. Estructura y biosíntesis de proteínas de almacenamiento en granos.	25
4.3. Asimilación de Nitrógeno por parte de una planta y su relación con la acumulación de proteínas.	29
4.4. Bases genéticas de la resistencia a patógenos en plantas.....	32
5. Planteamiento del problema	40
6. Hipótesis	41
7. Objetivos	41
8. Materiales y métodos	42
9. Resultados	50
10. Discusión de resultados	68
11. Conclusiones	75
12. Perspectivas	75
13. Bibliografía	77
14. Anexos	83

1. Dedicatorias y Agradecimientos

Con amor y agradecimiento a mis padres, Kalin Jelezov y Mariana Jelezova, por las risas y consejos, la paciencia y la ayuda incondicional para todo. A Ivia, Ivo, Lili, Rumi, Mitko por tanto cariño que me han dado a lo largo de los años y también a la familia que no tengo tan cerca para poder abrazar cuando quisiera; Baba Vanche, Diado Pasho, Isi, Pepi, Vuicho Niki, Maminka y Diado Mitko.

A Cesy, que me hizo parte de su familia en el Lab-103 y fuera de él. Sin su guía, apoyo y confianza esta tesis no hubiera sido posible. Dudo haber podido tener mejor tutora. ¡Gracias!

A Luis Felipe Ángeles, por las horas de distracción y alegría, las aventuras, y el cariño que hemos compartido.

A Thamara y a Víctor. Que además de ser amigos entrañables, con sus consejos y amor por la ciencia me han hecho amar, cuestionar y emocionarme aún más por lo que hago. Algo que dudo poder pagarles alguna vez.

A los habitantes del laboratorio 103, excelentes personas y queridos amigos; Tham, Marisol, Kevin, Frida, Caro, Marco, Luis, David, Abraham, Alejandra y Chiapas, Érika, Naholi, Ana, Lilia y todos los que faltan. A mis amigos, Gaby, René y Emmanuel, por hacerme reír tanto y ser pilares en mi vida.

Agradecimientos

Gracias al subprograma de formación en la investigación 127 de la Facultad de Química de la UNAM y al apoyo de ingresos extraordinarios FQ10-052 por haber ayudado y financiado este proyecto en sus diferentes etapas.

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y al maestro Jorge Herrera Díaz por su enseñanza de las técnicas utilizadas y sus constantes consejos. Al jurado de esta tesis por sus consejos y correcciones. A la UNAM.

2. Resumen

La cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los cultivos más antiguos que se conocen y que ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la agricultura de diferentes civilizaciones y algunas ramas de la ciencia como la agronomía y la industria cervecera. Las propiedades de la semilla de cebada determinan la calidad de la malta y la cerveza, por lo que es importante estudiar sus características a nivel molecular. En un estudio previo, mediante análisis de proteómica en cinco variedades de cebada mexicana, denominadas: HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11 se encontró acumulación diferencial de ciertas proteínas con posible relevancia como marcadores moleculares para el mejoramiento de cebada. Los cambios encontrados pudieron ser el resultado de una expresión diferencial a nivel transcripción o traducción durante el desarrollo de la semilla, o debidos a diferentes niveles de degradación de las proteínas.

En este proyecto se probó si la acumulación diferencial de 5 posibles marcadores moleculares entre las variedades, es debida en parte a una acumulación diferencial de sus mRNAs durante el desarrollo de semilla. Los mensajeros estudiados correspondieron a dos genes relacionados con metabolismo del nitrógeno; GAD1 y PDI, así como tres genes relacionados con resistencia a patógenos; MLA1, MLA1-2 y MLA6. La cinética de acumulación de transcritos que presentan estos genes durante la maduración de semillas se estudió para las 5 variedades de cebada maltera, durante tres generaciones sembradas en invernadero durante diferentes épocas del año. Los resultados obtenidos permitieron evaluar si la transcripción de los candidatos a marcadores moleculares depende del genotipo o del ambiente en el que se encuentren creciendo las plantas. Por otra parte, se analizó si la expresión a nivel de transcrito muestra diferencias significativas entre variedades bajo la misma condición de desarrollo de la planta.

3. Introducción

3.1. Descripción de la cebada.

Uno de los cereales de gran importancia para la humanidad desde su surgimiento ha sido la cebada. Hoy en día es el cuarto cereal más cultivado en el mundo. Su historia, hasta donde sabemos cuenta con mínimo 23, 000 años de antigüedad siendo parte de la alimentación del hombre.

La cebada (*Hordeum vulgare*) es una planta monocotiledónea, es decir, de la semilla o embrión emerge una sola hoja primordial. Todas las variedades cuentan con tallos huecos en forma de caña y raíces fasciculadas. Cuando la cebada madura, desarrolla una inflorescencia en forma de espiga que contiene sus semillas. La espiga está formada por un eje principal, denominado raquis. Sobre el raquis se acumulan muchas espiguillas que contienen una o más flores. Estas flores descansan sobre dos o tres escamas denominadas lodículas. Todo lo anterior se encuentra cubierto por la lema y pálea. Éstas a su vez están pegadas entre las glumas del raquis (ver figura 1).

Pertenciente a la familia de las poáceas (gramíneas, pastos o cereales) la cebada se considera un cereal de invierno, generalmente cosechado durante el verano en los meses de Mayo y Junio. Es diploide y cuenta con 7 pares de cromosomas ($2n=14$ cromosomas) al igual que su antecesor. La cebada que conocemos hoy en día (*Hordeum vulgare*) desciende de la cebada silvestre (*Hordeum spontaneum*).

La cebada silvestre, así como la moderna se autopolinizan; es decir que la misma planta hereda los genes maternos y paternos. Esta forma de reproducción limita la variedad genética de la progenie, sin embargo también puede brindar ventajas. Mientras que las plantas que se reproducen por polinización cruzada deben contar con polinizadores que transporten su polen, otro individuo de su especie que sea compatible y condiciones ambientales favorables, las que se autopolinizan sólo necesitan del ambiente adecuado para que sus semillas germinen y den lugar a un nuevo individuo. Se cree que por lo mismo las plantas que dispersan su polen en vez de las semillas ya maduras, tienen un alcance de distribución geográfica más amplio.

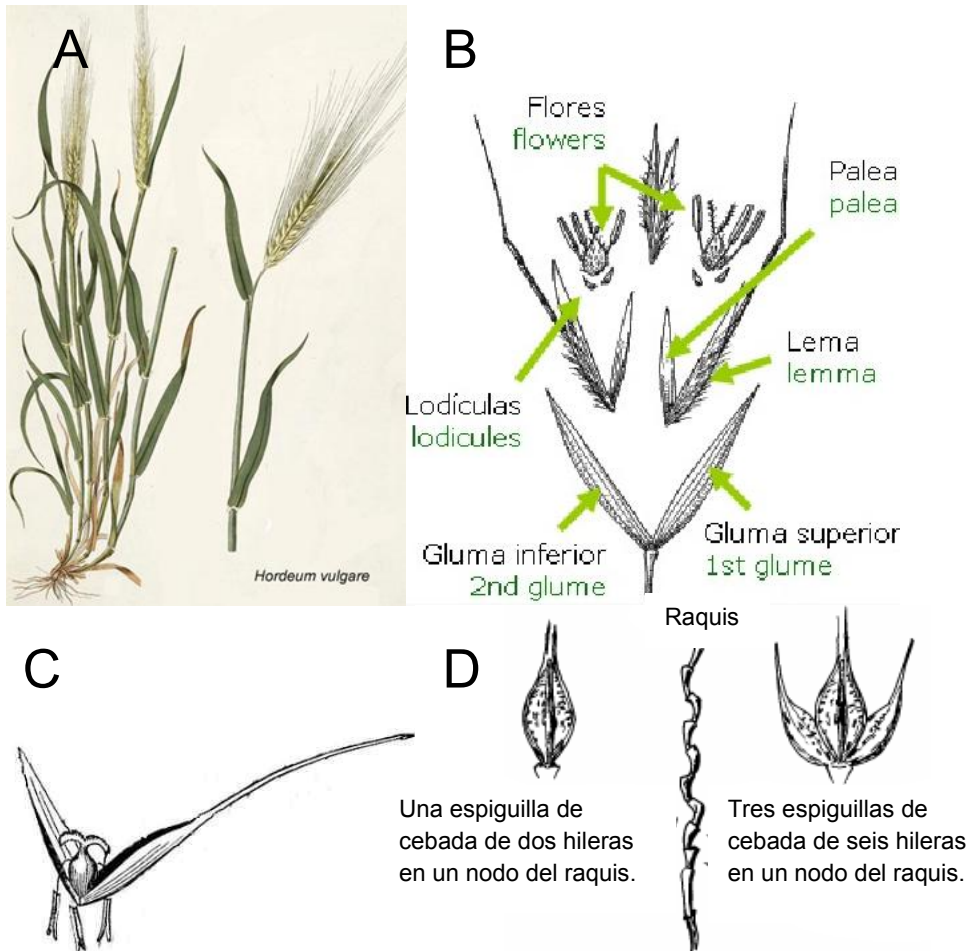


Fig. 1. Descripción física de la cebada. A) Planta de cebada con sus raíces, tallo, hojas y espigas. B) Partes de la espiguilla. C) Espiguilla mostrando el interior. D) Eje central o raquis donde se sujetan las espiguillas o granos. Del lado izquierdo se muestra pegada una espiguilla de la cebada de dos hileras y del otro las tres de la de seis hileras.

La cebada fue una de las plantas pioneras de la agricultura y principal cereal para la elaboración de panes, además a partir de la cebada también se elabora la cerveza y hoy en día es su uso más importante.

3.2. Breve historia e importancia de la cerveza.

Esta bebida alcohólica, considerada la más antigua que se ha fabricado, surgió hace 8000 años en la región de Mesopotamia. Se realiza a base de cebada fermentada y se popularizó en todo el mundo (Homan, M.M., 2004).

La importancia histórica de la cerveza es indudable. En el antiguo Egipto la cebada se convirtió en el principal alimento de la población. Durante la edad media se conoce que la sustitución del consumo de agua por cerveza salvó a muchas personas de enfermedades provocadas por las aguas contaminadas (Hornsey, I.S., 2003). Fue también entonces cuando en los procesos de producción de bebidas alcohólicas se implementaron pasos de aumento de temperatura y ebullición, que como algo extra eliminaba a las bacterias y hongos que pueden echarla a perder. Además ayudó a que se desarrollara la microbiología y se prestara más atención a las cepas de levaduras que se utilizaban para la fermentación.

Fue también en la época medieval, cuando hubo un cambio en la composición de la cerveza, pues antes se le agregaba mirto, entre otras especies como el romero, el cilantro y la aquilea. La abadesa Hildegarda de Bingen en 1079 adicionó al mosto de la cerveza el lúpulo (*Humulus lupulus*) (Butcher, A.D., 1989). El lúpulo es una planta trepadora, cuyas flores femeninas sin fecundar son utilizadas para equilibrar el dulzor de la malta y darle ese característico sabor amargo a la cerveza. Sin embargo resultó que esta planta podía brindar otros beneficios. Los ácidos alfa del lúpulo tienen un ligero efecto antibiótico contra bacterias Gram positivas, favorece la actividad de las levaduras, proporciona aroma, estabiliza la espuma y cuenta con propiedades conservadoras, lo cual alarga su tiempo de almacenamiento (Verzele, M., 1986; Moir, M., 2000).

Posteriormente también fue mejorada la forma de presentación y los envases en los que se comercializaba la bebida. Así pasó a botellas ámbar para que el lúpulo no interaccione con la luz solar, ya que sus ácidos se oxidan generando sabores desagradables (García Ruiz, J.L., 2003).

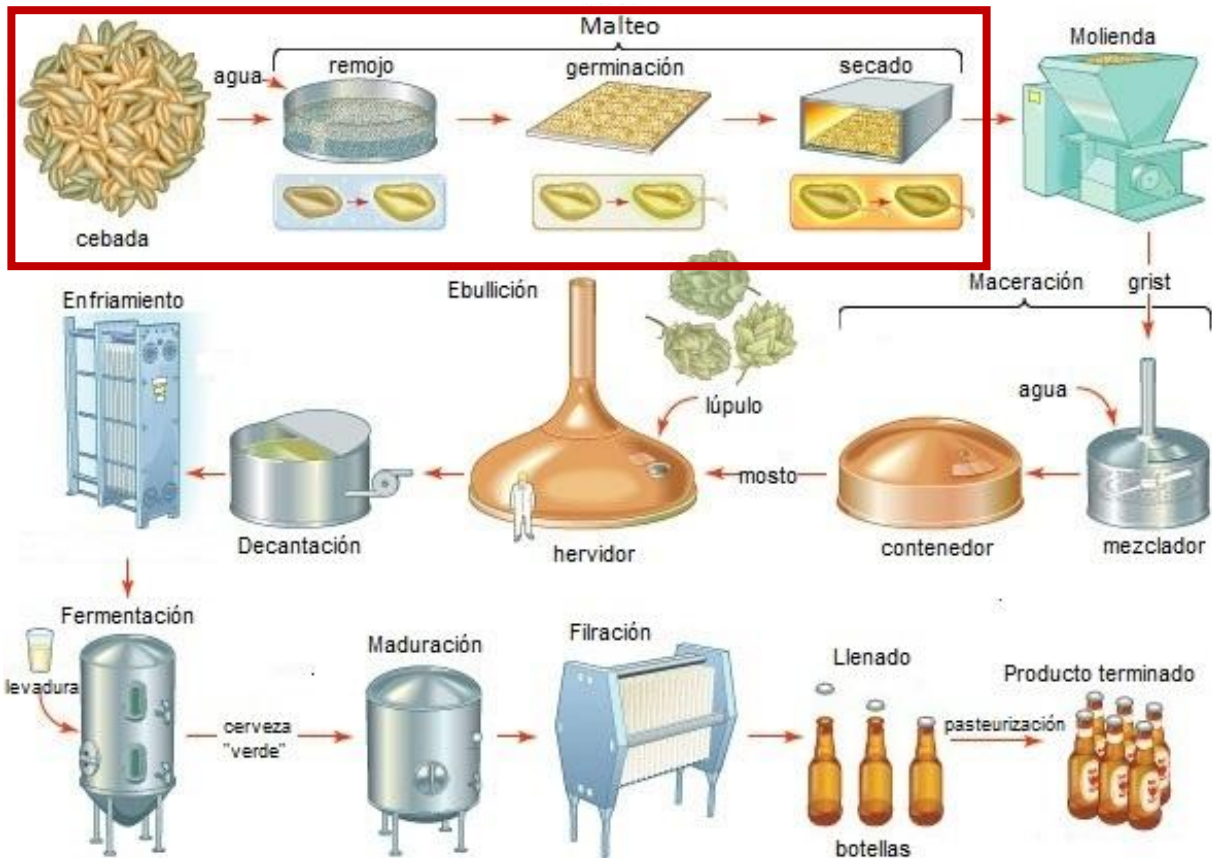


Fig. 2. Técnica de malteo de la cebada y producción de la cerveza. Tomada de la Enciclopedia Británica, 2003. Están descritos todos los pasos desde el malteo de la cebada (proceso señalado en el recuadro rojo) hasta el empaquetamiento de la cerveza.

La técnica de malteo de la cebada y producción de la cerveza hoy en día cuenta con los siguientes pasos a muy grandes rasgos. Primero las semillas de cebada recolectadas se dejan terminar de secar unos días (fig. 2). El malteo consiste en embeberlas en agua y dejar que empiecen a germinar para luego desecarlas. Esto tiene como propósito utilizar las enzimas (amilasas) que se activan en la germinación para romper el almidón acumulado en la célula y convertirlo en azúcares más pequeños (maltosas) que pueden ser utilizados por las levaduras durante la fermentación alcohólica. El color de la cerveza depende del paso de secado y de qué tanto tiempo este proceda, ya que si se le deja mucho tiempo el grano se comienza a tostar y se vuelve más oscuro.

Posteriormente la malta se va a moler y algunas veces le agregan los grits (granos de otro cereal para aumentar la densidad o darle otro sabor). A esta mezcla se le agrega agua y se va pasando por ciclos de varias temperaturas que

hacen que diversas enzimas se activen. Esto da lugar a una mezcla denominada mosto. El mosto se filtra. Su filtrado se pone a hervir por algunas cuantas horas para eliminar bacterias y otras impurezas. En seguida se le agrega el lúpulo al filtrado del mosto, para aromatizar, dar sabor y frenar lo que quede de procesos enzimáticos. Esta mezcla se pasa a los tanques de fermentación y se le agregan las levaduras para que empiece su fermentación (Eblinger H.M., 2009).

Dependiendo del tipo de cerveza que se quiera hacer van a ponerse las condiciones de fermentación y las levaduras. Para las cervezas tipo “Ale” se utiliza *Saccharomyces cerevisiae* y se fermenta por 4 a 6 días a temperaturas mayores, entre los 18 y 25°C. A este tipo se le denomina alta fermentación pues las levaduras se quedan en la parte alta del tanque de fermentación. Por el otro lado tenemos a las cervezas tipo “Lager” fermentadas por *Saccharomyces carlsbergensis* que resisten a temperaturas más bajas y por lo tanto el proceso se lleva a cabo de 8 a 10 días a una temperatura entre los 6 y 10°C. Este tipo de levaduras se quedan en el fondo del tanque. En ambos procesos es importante tener enfriamiento de los tanques para mantener la temperatura, pues la fermentación es un proceso exotérmico y libera mucho calor. Después de que se fermenta y se deja madurar a la cerveza, se filtra y ya está lista para su empaquetamiento y distribución para consumo (ver fig. 2; Libkind, D., 2011).

Se dice que la combinación entre calidad, cantidad y especie de cada uno de los ingredientes de la cerveza (agua, cereales, levaduras y lúpulo) produce su gran variedad. Hemos mencionado la mejora en el proceso, el agua y medidas de higiene, los saborizantes como el lúpulo, las levaduras, pero... ¿se podrá también mejorar a los cereales? Hace falta conocer ahora sobre el mejoramiento de la cebada.

3.3. Mejoramiento de la cebada.

Los primeros cambios que fue sufriendo la cebada fueron reflejo de su proceso de domesticación. En un inicio, *Hordeum vulgare*, al igual que la cebada silvestre, contaba con una espiga quebradiza que al madurar liberaba las espiguillas. Las lemas, que acaban en aristas puntiagudas con pequeños ganchitos se asían fácilmente al pelaje de animales que les servían como forma de transporte y expansión a nuevas áreas (Morrell, P.L. et al., 2007). Debido a que el hombre se encargaba de esparcirla y cultivarla, esta característica se fue perdiendo en la cebada moderna. Los genes responsables de volver la espiga quebradiza se



Fig. 3. *Hordeum spontaneum* o cebada silvestre, *Hordeum distichon* o cebada de dos hileras y *Hordeum hexastichon* o cebada de 6 hileras en orden de arriba abajo.

denominan *Btr1* y *Btr2*, dominantes en la cebada silvestre. Sin embargo en *Hordeum vulgare*, que ya está domesticada, es más frecuente el fenotipo sin espiga quebradiza, que es homocigota para los alelos recesivos *btr1* y *btr2* (Komatsuda, T. et al., 2004; Tanno, K. y Willcox, G., 2006; Sang, T., 2009).

Aparte de perder la espiga quebradiza, otros métodos de selección del grano durante la domesticación se enfocaron al aumento de la producción.

Un ejemplo interesante son las dos

especies cultivadas más populares, *Hordeum distichon* de dos hileras de grano, más popular para la elaboración de cerveza y *Hordeum hexastichon* de

seis hileras de semillas, más usado en la alimentación de animales y actividades en las que se necesita mayor cantidad de grano. Ambas entran en la clasificación de *Hordeum vulgare* subsp. *Vulgare*. En el caso de la cebada de seis hileras, las tres espiguillas de cada lado son fértiles, en cambio en las de dos hileras, sólo la

central lo es. Las espiguillas laterales son estériles y no se desarrollan (ver figura 3 y figura 1, recuadro D para visualizar las espiguillas). Se cree que originalmente, tal como su antepasado *Hordeum spontaneum*, la cebada era de dos hileras, sin embargo una mutación hizo que sus espiguillas laterales se hicieran fértiles (Badr, A. et al., 2000).

El número de espiguillas laterales está controlado por el gen *Vrs1*. Este gen tiene dos alelos. Uno dominante, el *Vrs1* que da lugar a la cebada de dos hileras y uno recesivo, *vrs1* que a su vez nos da las espigas de seis hileras. *Vrs1* da lugar a una proteína de tipo HD-ZIP I, que reconoce una secuencia concreta de ciertos genes y se une a ella, impidiendo que se transcriban, evitando el desarrollo de las espiguillas laterales (Komatsuda, T. et al., 2007).

El tamaño de la semilla en sí también ha aumentado con el tiempo, pues en un principio el hombre buscaba seleccionar las mejores semillas, haciendo que “las hierbas de pequeño grano” se convirtieran en hierbas de mayores granos (ver fig. 4; Wilcox, G., 2004).

Algo muy importante para cualquier cereal son sus condiciones de cultivo. La cebada no es caprichosa en cuanto a condiciones de suelo, altura o incluso temperatura, pero tiene la particularidad junto con algunas variedades de trigo de necesitar una disminución de la temperatura (entre 0 y 10 °C) para que pueda florecer.

A este proceso se le denomina vernalización y por lo mismo estas plantas se consideran de “invierno”. Así su ciclo de siembra comienza a finales del verano o inicios del otoño, las plantas jóvenes o plantones pueden sobrevivir un invierno de las temperaturas antes mencionadas y florecer al llegar la primavera. ¿Pero cómo es que se cultiva la cebada en regiones muy frías donde la temperatura baja más de los 0°C? ¿O en los trópicos, como en México? Pues esto sucede debido a que

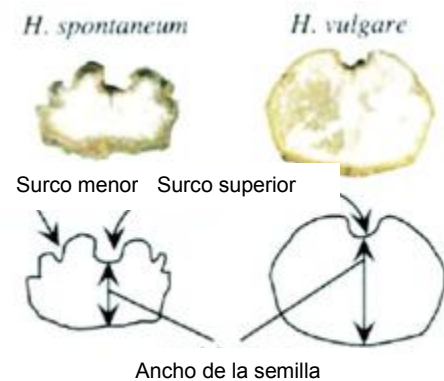


Fig. 4. Comparación esquemática del grosor de la semilla de *Hordeum spontaneum* contra la de *Hordeum vulgare*.

las plantas han sufrido mutaciones en el gen VRN1, responsable de la vernalización, cuya regulación ya no es dependiente del frío sino que se expresa todo el tiempo, generalmente creando variedades de floración prematura. Las variedades que no requieren del frío para florecer se denominan “de primavera”. Estas se pueden cultivar empezando la primavera en las regiones muy frías, para que se cosechen antes de que el frío pueda matarlas y también se pueden cultivar en regiones más calientes, donde no hay un invierno que estimule la acumulación de VRN1 por frío (ver figura 5; Trevaskis, B. et al., 2007).

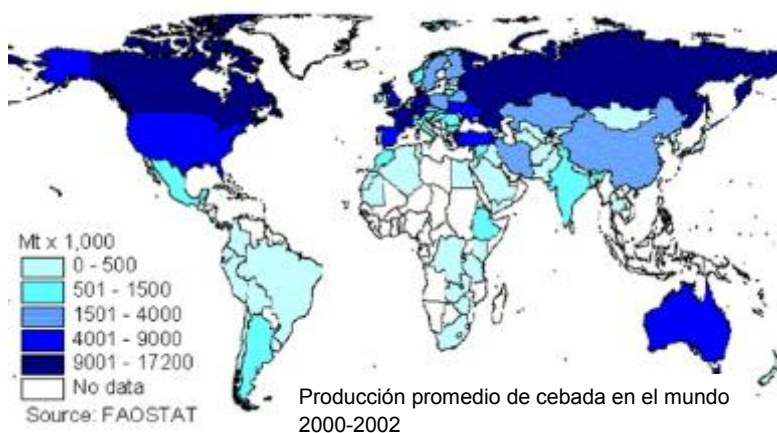


Fig. 5. Mapamundi con la representación por colores de la producción media de cebada en el periodo 2000 a 2002.

La mayoría de estas mejoras se deben a un proceso de selección por características físicas. En un principio no se sabía qué genes las regulaban ni siquiera que eran debidas a ellos. Se seleccionaban y sembraban los mejores individuos para cierta función. Cuando la ciencia fue avanzando se crearon los primeros marcadores relacionados a cierta característica deseable para la planta. Estos eran en su mayoría marcadores morfológicos, codominantes y de características que podían observarse, por ejemplo el número de espiguillas, la altura de las plantas o incluso el tamaño del grano. Se basaban completamente en características fenotípicas. Con ellos se hicieron las primeras versiones de mapas genéticos y sirven para una primera aproximación a características ligadas a genes. Una desventaja de esos marcadores morfológicos es que pueden verse modificados por el ambiente. Esta limitación los hace menos atractivos que los marcadores moleculares para el mejoramiento de cultivos (Mohan, M. et al., 1997).

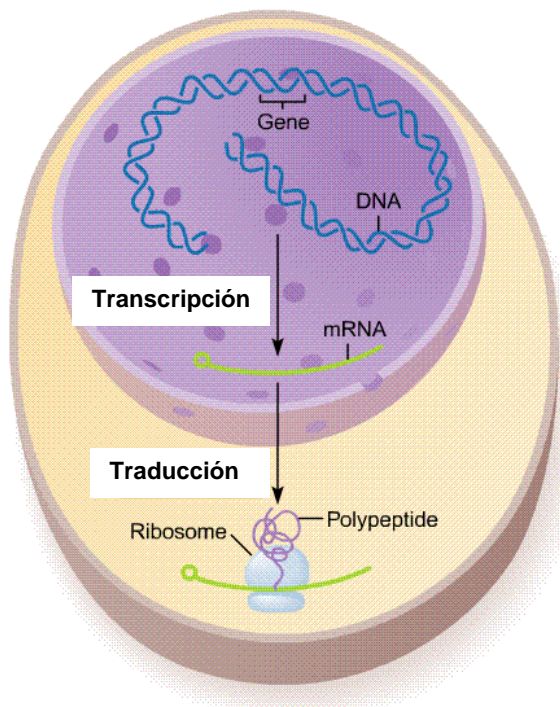


Fig. 6. Dogma central de la biología molecular. El DNA contiene los genes y es capaz de replicarse. Se transcribe dando origen al mRNA que cuando se traduce da lugar a las proteínas.

3.4. Marcadores moleculares.

Para tener una mejor idea de estas técnicas primero hay que explicar el dogma central de la biología molecular. Se trata de los mecanismos de transmisión y expresión de la información genética. El DNA es la molécula portadora de información por excelencia pues contiene a los genes. El flujo de información original en el dogma central iba en un solo sentido (ver fig. 6). De forma general establece que el DNA se replica a sí mismo, es decir puede hacer más copias y así transmitir la información a la descendencia. También se transcribe, dando lugar a moléculas mensajeras o mRNA que pueden salir del núcleo. Al pre-mRNA se le agrega un CAP o

casquete de 7-metilguanosa trifosfato al lado 5' que tiene importancia en la estabilidad del mensajero y su reconocimiento por el ribosoma y también se le pega la cola de poli A (muchas adeninas) del lado 3' que lo protege de la degradación en el citosol y alarga su vida. En el caso de los eucariontes también sufre un proceso de ajuste antes de ser exportado del núcleo. Esto consiste en cortar del mensajero las secuencias no codificantes o intrones y empalmar sólo los exones o secuencias codificantes. A veces se puede hacer un ajuste o "splicing" alternativo, en donde de un mismo gen y por tanto pre-mRNA, se cortan y unen diferentes secuencias, dando lugar a varias proteínas que pueden ser isoformas de una misma con especificidad por un tejido (ver fig.7). Una vez fuera del núcleo, el mRNA es reconocido por los ribosomas que leyéndolo en un marco de tres nucleótidos a partir del codón de inicio lo traducen a aminoácidos, que unidos forman una proteína (Crick, F., 1970).

Hoy en día se ha complementado este postulado, ya que no cubría nuevos descubrimientos como lo es la retro transcripción de algunos virus, que pueden sintetizar DNA a partir de RNA. También están las ribozimas que son RNA's autocatalíticos, capaces de duplicarse a sí mismos. Por último en presencia de neomicina se ha visto que el DNA es capaz de dar proteínas *in vitro* por lectura directa de los ribosomas sin una previa transcripción a RNA (McCarthy

B.J. et al., 1965). Todo esto ha ido modificando el dogma central de la biología molecular, rompiendo con su denominación de "dogma" así como con lo que

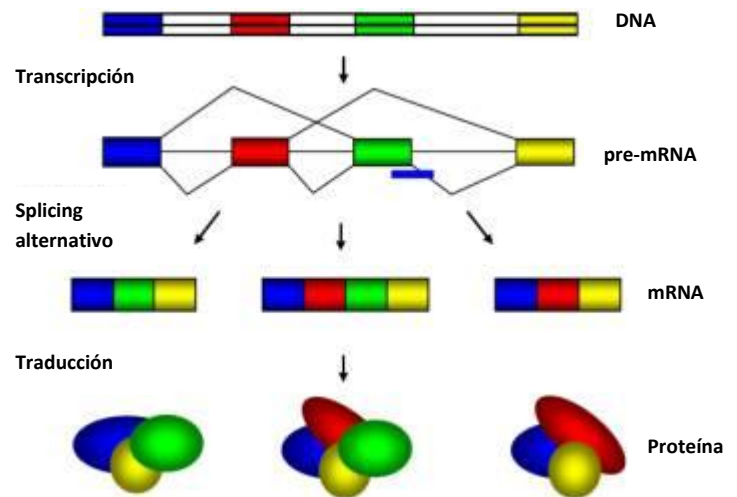


Fig. 7. Ajuste o splicing alternativo del pre-mRNA. Depende de donde se corte se pueden unir diferentes segmentos que den lugar a diferentes proteínas.

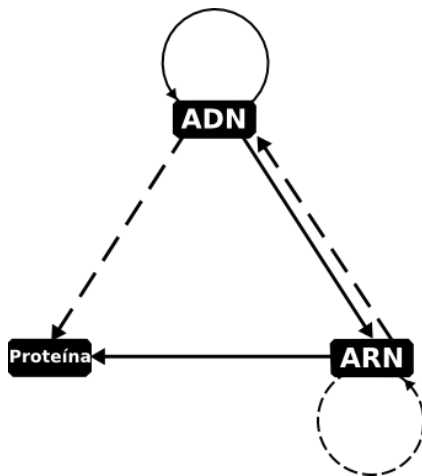


Fig. 8. Esquema del dogma central de la biología molecular.

podríamos esperar de los organismos vivos y sus sistemas moleculares (ver fig. 8).

Muchas veces la cantidad de transcritos o RNA mensajeros no corresponden a la cantidad de proteína activa en las células. Esto es debido a que existen mecanismos de regulación pre-transcripcional, transcripcional, post-transcripcional, traduccional, post-traduccional, etc. En cada uno de esos pasos se ejerce un control sobre las proteínas que se sintetizarán y que finalmente ejercerán una actividad en la célula, muy relacionada y dependiente de las condiciones

en las que se encuentre el ser vivo. Desde lo mucho o poco que se encuentre condensado el DNA en heterocromatina o eucromatina y sus metilaciones, presencia o ausencia de factores de transcripción que favorezcan o no la lectura del promotor del gen, corte y empalme alternativos del RNA mensajero, estabilidad

en el citosol y su selección para traducir, así como la síntesis y plegamiento adecuado de su proteína y la tasa de degradación o acumulación de dichas proteínas. Estos son sólo algunos pasos de regulación del flujo de la información en una célula (fig. 9). Por lo mismo, es conveniente estudiar no sólo el proteoma de un organismo, sino también su transcriptoma y su genoma para conocer más a fondo los cambios de su expresión a lo largo de su desarrollo (Griffiths, J.F.A. et al., 2002).

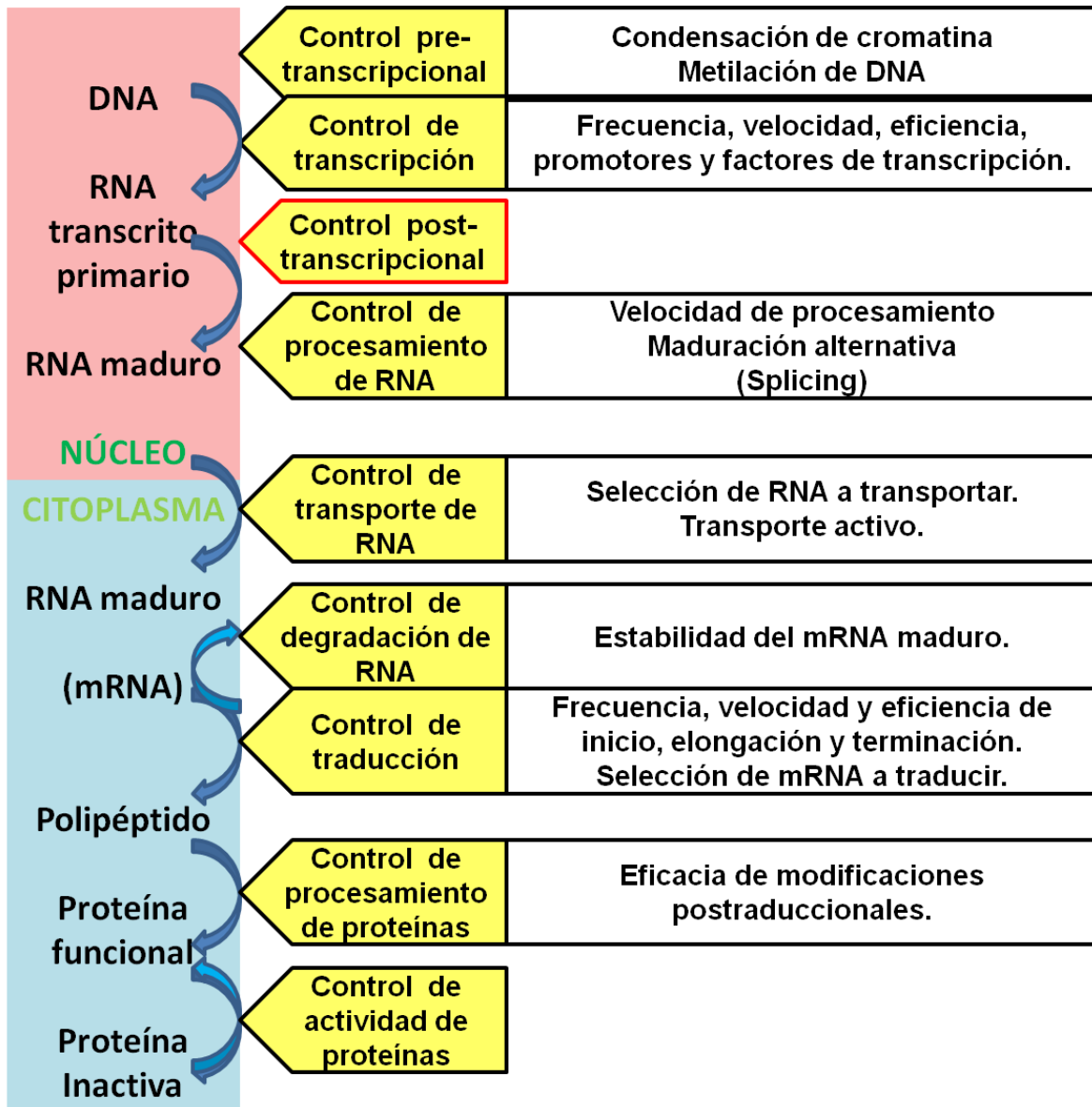


Fig. 9. Niveles de regulación en la expresión genética en eucariotes. Esquema modificado de Griffiths, J.F.A. et al., 2002.

Los marcadores moleculares son secuencias de DNA o proteínas que se relacionan con un carácter de interés, que pueda distinguir entre individuos o poblaciones y que no se va a ver afectado por las condiciones ambientales en las que se desarrollen. Se pueden dividir en tres grandes grupos, las variantes de proteínas o alozimas, polimorfismos de secuencia de DNA (RFLPs, AFLPs, SNPs, RAPDs, etc.) y variaciones de repetidas de DNA (satélites, minisatélites, microsatélites o SRTs, etc.). Con los marcadores se busca poder distinguir entre los genotipos de los individuos o poblaciones. Los marcadores moleculares, muchas veces no están ligados al gen diferencial en sí sino a otros ligados muy cercanos al de interés. Nos dan información sobre una variación alélica en determinado locus. Sus usos van desde pruebas de paternidad, identificación de enfermedades genéticas, aplicaciones forenses, filogenias pero también han sido muy importantes para el mejoramiento de cereales, donde se busca encontrar moléculas relacionadas a un mejoramiento de la producción, ya sea un mayor tamaño de grano, resistencia a frío, sequías o patógenos, entre otras. Cada tipo de marcador tiene su utilidad, pros y contras dependiendo de lo que se busca.

En cuanto a los marcadores de proteínas, generalmente representan enzimas y proteínas que se expresan diferencialmente o como diferentes isoformas. Los procedimientos para el análisis de marcadores proteicos son fáciles de realizar. Generalmente se hacen geles de poliacrilamida de doble dimensión, en donde las proteínas primero se separan por su punto isoeléctrico en un focalizador y luego por su masa durante una electroforesis. De esta forma son capaces de separarse incluso isoformas. Posteriormente se les puede identificar por espectrofotometría de masas, mandando a analizar las manchas del gel.

Con el paso del tiempo surgieron los marcadores moleculares de DNA, que son más directos, específicos y brindan más información sobre la variación directamente en los genes. Sin embargo estas técnicas también son mucho más caras de realizar (ver tabla 1; Mohan, M., 1997; Schlötterer, C., 2004).

Marcador	Ventajas	Desventajas
SNPs	<ul style="list-style-type: none"> -Baja tasa de mutación. -Alta abundancia. -Nuevos enfoques analíticos se están desarrollando. -Estudios de comparación cruzada son posibles. 	<ul style="list-style-type: none"> -Tasa de heterogeneidad sustancial entre los sitios. -Caro de aislar. -Hay sesgo de evaluación. -Bajo contenido de información con un único SNP.
Microsatélites	<ul style="list-style-type: none"> -Altamente informativo. -Sesgo bajo. -Fácil de aislar. 	<ul style="list-style-type: none"> -Alta tasa de mutación. -Comportamiento complejo de mutación. -No lo suficientemente abundantes. -Difícil de automatizar. -Las comparaciones entre estudios cruzados requieren una preparación especial.
Alozimas	<ul style="list-style-type: none"> -Relativamente barato. -Protocolos universales. 	<ul style="list-style-type: none"> -Requieren material fresco congelado. -Algunos loci muestran inestabilidad de proteínas. -Número limitado de marcadores disponibles.
RAPDs y derivados	<ul style="list-style-type: none"> -Barato -Produce gran número de bandas, que luego pueden ser caracterizadas individualmente. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja reproducibilidad. -La mayoría son dominantes. -Difícil de analizar. -Difícil de automatizar. -Las comparaciones entre estudios cruzados son difíciles.
Secuenciación del DNA	<ul style="list-style-type: none"> -El más alto nivel de resolución posible. -Comparaciones entre estudios cruzados son fáciles; ya existen bases de datos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Todavía es significativamente más cara que las otras técnicas.

RAPD; amplificación aleatoria de ADN polimórfico. SNP; polimorfismo de nucleótido simple.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de algunos marcadores moleculares. Basado en tabla del artículo de Schlötterer, C., 2004.

4. Antecedentes

A nivel mundial la variedad de cebada Metcalfe es una de las mejores para maltear y hacer cerveza. Esta variedad canadiense de dos hileras fue desarrollada en 1986 a partir de la cruce de los cultivares Oxbow y Manley (Legge, W.G.; Metcalfe, D.R., 2003).

Se caracteriza por ser resistente a una gran cantidad de patógenos debido a que varias de las generaciones previas antes de sembrarla en el campo fueron infectadas con diversos patógenos. De ellas fueron seleccionadas y cruzadas sólo las plantas resistentes. Esta variedad también tiene la ventaja de poseer poca cantidad de proteínas en las semillas, cualidad buscada por las cerveceras. La composición química del grano de cebada es de 11.8% de proteína, 1.8% de

grasa, 5.3% de fibra cruda, 78.1% de carbohidratos y 3.1% de cenizas. Estas cantidades de los componentes del grano entero cambian durante el desarrollo y malteado del grano (Briggs D.E., 1998).

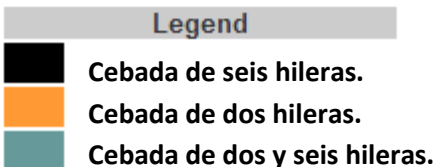


Fig. 10. Distribución de la cebada de dos y seis hileras en México y Estados Unidos. En negro está la de seis carreras, en naranja la de dos carreras y en azul los cultivos mixtos. Schwarz P.B. et al., 1995.

En México se cultiva exclusivamente la cebada de seis hileras. Se menciona que fue la que mejor se adaptó y que se intentó cultivar la de dos hileras sin buenos rendimientos, a pesar de que esta última es la cebada maltera más utilizada en Europa (Schwarz, P.B. y Horsley, R.D., 1995).

La cebada maltera se cultiva en una superficie superior a las 300 mil hectáreas en nuestro país. El 25% de estas son siembras de riego en invierno, ubicadas principalmente en la región del Bajío (Guanajuato, Michoacán, Jalisco, Querétaro) y al noroeste (Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Baja California Norte). El 75% restante son siembras de temporal en verano, ubicados en los Valles Altos de la Meseta Central (Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Zacatecas, Durango). Las cinco variedades de cebada maltera que se seleccionaron como muestras para este trabajo fueron desarrolladas por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) y son cultivadas en estas regiones. Algunas de ellas son las variedades que se usan hoy en día por la industria cervecera y cuentan con las siguientes características:

HV2005-19: Cultivada en la región del Bajío con ciclo vegetativo de 125 a 130 días. Soporta altas densidades de siembra y fertilizante nitrogenado, su característica más importante es su resistencia a la roya lineal amarilla por lo que no necesita que se le apliquen fungicidas. La región del Bajío se ha caracterizado por haber sufrido pérdidas considerables en años anteriores debido a la roya, por lo cual la resistencia a este hongo es importante para las plantas de esta área.

HV2007-23: Esta variedad fue lanzada por el INIFAP comercialmente en el año 2006, tratando de mejorar a HV2005-19. Es cultivada en el Bajío bajo condiciones de riego. Se considera con resistencia a deficiencias de humedad, y dada la combinación de sus progenitores también se considera resistente a la roya amarilla. Tiene un ciclo vegetativo precoz de 106 a 123 días dependiendo del ambiente. Su rendimiento promedio de grano es 15% mayor al de HV2005-19 (Solano, H.S., et al, 2006).

HV2007-18: Al igual que la variedad de HV2007-23, fue liberada en el año 2006 al mercado a pesar de que tiene un menor rendimiento de grano que esta última. También se le considera resistente a deficiencia de humedad y por la combinación de sus progenitores también debería resistir a la roya amarilla. Es una variedad de riego sembrada en el Bajío. Supera a HV2005-19 en rendimiento promedio del grano por 12% y es la variedad más precoz de las antes descritas con un ciclo vegetativo de 102 a 120 días.

HV2005-04: Esta variedad se siembra en condiciones de temporal en el ciclo primavera-verano en los Valles Altos del centro del País. Al igual que HV2005-19 es una de las variedades comerciales más sembradas.

HV2008-11: Esta variedad también fue diseñada para condiciones de temporal y para poder producir un mayor rendimiento de grano. En efecto supera a la variedad HV2005-04 con un 23.7% sin embargo manifiesta un ciclo vegetativo más tardío, por lo que debe sembrarse antes o corre riesgo de sufrir daño por helada (Solano, H.S. et al., 2006).

El principal problema para la producción de cerveza radica en las proteínas acumuladas durante el desarrollo de la semilla. La degradación de proteínas es importante en el malteo y depende de la expresión de genes durante la formación de la semilla de cebada.

Algunas variedades presentan altas concentraciones de proteína después del malteo, por lo que se afecta la producción de cerveza. Las proteínas taponan los filtros para el mosto, impiden que las enzimas degraden eficientemente el almidón, es más difícil romperlas en péptidos que puedan ser utilizados, producen turbidez en la cerveza y participan en la formación de espuma. Por lo mismo se buscan variedades de cebada maltera con poca cantidad de proteínas de reserva. La cebada de dos hileras tiene un contenido proteico que va de 11-13% y la de seis de 12 a 13.5%. A pesar de que México se ubica en los 10 países con mayor producción de cerveza, la producción doméstica de cebada maltera ha decaído en los últimos años y ahora se importan grandes cantidades de cebada y malta de los Estados Unidos (ver fig. 10; Burger, W.C. y Laberge, D.E., 1985).

Mundialmente ya se han desarrollado algunos marcadores moleculares para cebada, generalmente ligados a una característica de resistencia a patógenos. Específicamente para el gen *Rpg1* de resistencia del tallo a la roya existe el marcador molecular de tipo RFLP denominado ABG704 en el cromosoma 1 de la cebada. Se ha identificado que la variedad Metcalfe cuenta con este gen por lo que tiene resistencia moderada al patógeno. En el caso del gen de resistencia a la roya *rpg4* se han identificado 3 marcadores RAPDs en el cromosoma 7M y para la resistencia a *Rhynchosporium secalis* existe una congregación de marcadores moleculares tipo RFLP en el cromosoma 3 de cebada (Mohan, M. et al., 1997; Borovkova, I.G. et al., 1995). Por desgracia, a pesar de que se ha intentado encontrar marcadores también para la calidad de la malta en cuanto a contenido proteico, parece que este es más influenciado por la temporada y el año de siembra.

En México, la selección de variedades se hace con base en características morfológicas y conforme a la experiencia de los criadores, pero no se han hecho antes análisis de índole molecular en las variedades mexicanas. Sería sumamente útil estudiar estas variedades y sus características desde el punto de vista biológico molecular para establecer una correlación y una forma más adecuada para identificarlas.

4.1. Trabajos previos.

En un trabajo previo se realizó un análisis proteómico de las variedades mexicanas.

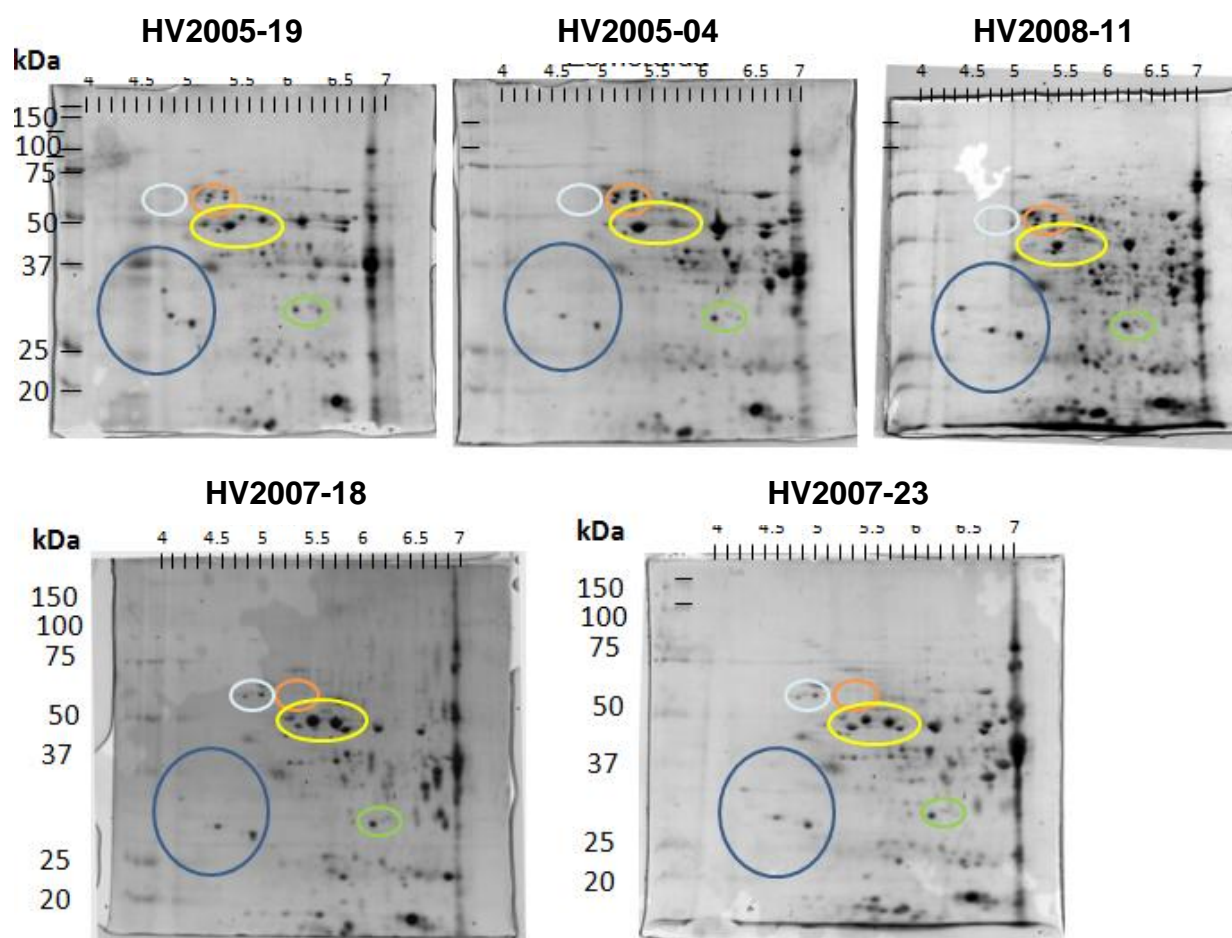


Fig. 11. Análisis proteómico de 5 variedades de cebada. En los gels de doble dimensión se observan encerradas en círculos de diferentes colores las zonas donde hay una expresión diferencial de proteínas. A partir de la detección de los cambios se pueden seleccionar esas proteínas y proceder a su identificación (Herrera-Díaz et al., en preparación).

Los patrones proteicos resueltos mediante electroforesis en 2D (punto isoeléctrico de 4 a 7 y peso molecular) de las 5 variedades mexicanas mencionadas mostraron diferencias en la composición de proteínas de semilla madura (ver fig. 11). Las

proteínas diferencialmente expresadas se identificaron en un espectrómetro de masas revelando la identidad de algunas de ellas.

Como una de las problemáticas principales para distinguir entre buenas cebadas malteras y no tan productivas son las proteínas, enfocarse hacia las relacionadas con su metabolismo sería lo más atractivo. También fue curioso que aparecieran proteínas de resistencia a patógenos, ya que esta característica es también muy importante en las buenas variedades. Las proteínas diferenciales entre variedades se sugieren como marcadores moleculares en la semilla seca. A continuación se describe lo que se conoce sobre estas proteínas y la relevancia de su función.

4.2. Estructura y biosíntesis de proteínas de almacenamiento en granos.

4.2.1. Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI).

La PDI es una proteína de 57 kDa presente en eucariontes, entre ellos levaduras, animales y plantas, encargada de la síntesis y ensamblaje de las proteínas de almacenaje. Cataliza la formación apropiada de puentes disulfuro en los péptidos, plegándolos y dándoles la conformación espacial adecuada a las proteínas, haciéndolas funcionales, más rígidas y resistentes a enzimas proteolíticas (ver figura 12).

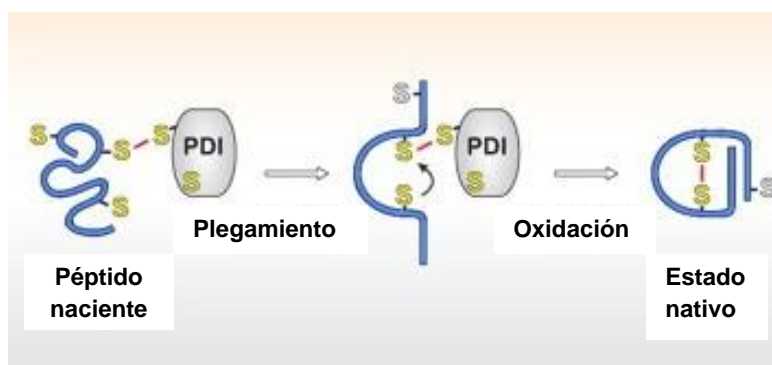


Fig. 12. Ejemplo esquemático de como la PDI ensambla proteínas que cuentan con cisteínas.

Cuenta con cuatro dominios y un péptido señal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), este último para permanecer en el retículo endoplásmico (RE). Los otros dominios se dividen por pares. Los dominios a y a' son sitios activos

homólogos a la tioredoxina, que contienen dos cisteínas y los otros dos; b y b' son sitios inactivos encargados de interactuar con los sustratos (Kim, Y.J. et al, 2012).

Se cree que la PDI está fundamentalmente envuelta en reacciones de procesamiento pos traduccional, como ayudar al importe y ensamblaje de proteínas en el retículo endoplásmico aunque también se le ha visto relacionada con la chaperona HSP70. Se han hecho experimentos en donde si las semillas son expuestas a temperaturas mayores a edades tempranas de su formación (antes de los 14 días dada la floración) hay una menor transcripción y número en general de proteínas de almacenamiento. Sin embargo, si se ven sometidas a calor después de los 14 DAF (días después de la floración), estas proteínas aumentan (Hurkman, W.J., 1998).

La función que aquí particularmente nos interesa está relacionada con las proteínas de almacenamiento. Se ha probado en arroz que al hacer una mutante de proteínas semejantes a PDI (PDI like o PDIL) el patrón y la cantidad de proteínas almacenadas cambia drásticamente (Kim, Y.J. et al., 2012).

Todas las proteínas de almacenaje comparten ciertas características:

- Se sintetizan en grandes cantidades en tejidos específicos durante el llenado de la semilla y suelen acumularse en el grano maduro en cuerpos de proteínas.
- Contienen una buena cantidad de cisteína y metionina, por lo que necesitan azufre para sintetizarlas. Por lo mismo, estas proteínas de almacenaje se dividen en aquellas con aminoácidos ricos en azufre y aquellos pobres en azufre.
- La cantidad y tipo de proteínas almacenadas son mezclas de componentes con polimorfismos, tanto en un solo genotipo como entre genotipos de la misma especie. Estos polimorfismos se deben a familias multigénicas, glicosilación y procesamiento proteolítico.

Las proteínas de almacenaje fueron de las primeras en clasificarse, debido a su importancia económica y mayor abundancia en las semillas. Osborne en 1924 las clasificó según su método de extracción en 4 grupos. Las solubles en agua o albúminas, solubles en diluciones salinas (globulinas), solubles en mezclas de

alcohol/agua (prolaminas) y solubles en ácidos o bases diluidas (gluteínas), aunque son las primeras 3 las más abundantes (Kumamaru, T., 2007).

4.2.2. Prolaminas, las proteínas de almacenamiento en la cebada, trigo y centeno.

En el caso de los cereales como la cebada, el tipo de proteínas de almacenamiento, responsable de casi el 50% de almacenamiento de nitrógeno en la planta, son las prolaminas. Este grupo es único y característico de la familia de los pastos o cereales.

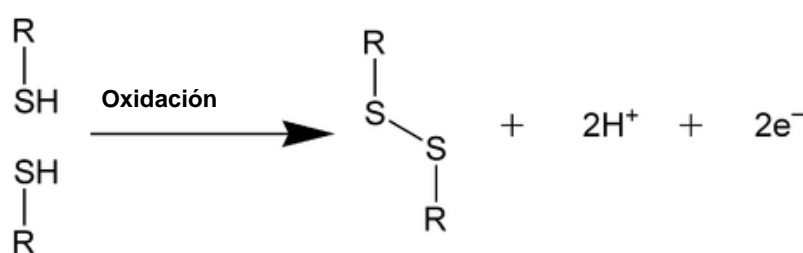


Fig. 13. Reacción de formación de un puente disulfuro por medio de la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las cisteínas. Entre las enzimas que pueden llevar a cabo esta reacción está la proteínas disulfuro isomerasa (PDI).

A su vez las prolaminas se dividen en 3 grupos, ricos en azufre, pobres en azufre y de alto peso molecular.

Aproximadamente 80 a 90% de ellas

son ricas en azufre y pueden ser de tipo monomérico (con enlaces disulfuro intracatenarios, es decir formados entre los aminoácidos de una misma cadena polipeptídica) o poliméricas (que contienen enlaces disulfuro intercatenarios, o entre cadenas peptídicas diferentes). Las prolaminas específicas de cebada se denominan hordeínas, haciendo referencia al nombre científico del cereal *Hordeum vulgare*. Las hordeínas B y gamma (γ) son las ricas en azufre. Las pobres en azufre son las C hordeínas, éstas no contienen residuos de cisteína por lo que no pueden formar oligómeros o polímeros (ver fig. 13). Las de mayor peso molecular son las D hordeínas (Shewry, P.R., 1995).

Todas estas proteínas de almacenamiento son proteínas secretoras y llevan un péptido señal para entrar al RE rugoso, donde terminan de sintetizarse y adquieren su conformación plegada. Esta conformación se adquiere por la formación de los enlaces disulfuro y ensamblaje en general. Se considera que las proteínas responsables del ensamblaje dentro del lumen del RE son la familia de

chaperonas Hsp70/BiP y la PDI, que se encargan de evitar el mal plegamiento de las proteínas y la generación de puentes disulfuro.

La formación de los cuerpos proteicos se lleva a cabo con el paso de las hordeínas del retículo endoplásmico a través del aparato de Golgi a las vacuolas donde se van a almacenar. Estas vacuolas se fragmentan, formando los cuerpos de inclusión de proteínas. A pesar de eso, también se ha encontrado una variedad de cebada rusa (Nevski cv.) que almacena hordeínas en el retículo endoplásmico, donde éste se distiende para acumularlas (Mogelsvang, S., 1998).

En los granos es dónde más acumulación de proteínas de reserva se da y por tanto donde la PDI tiene más actividad (Kim, J.Y. y Seo, Y.W., 2008). Dada su importancia, la semilla sería el tejido más llamativo para buscar esta proteína y sus RNA mensajeros. Por lo pronto lo que se ha reportado a nivel de transcritos durante el llenado de semilla ha sido un aumento en los primeros días después de la fertilización, un pico aproximadamente al día 10 DAF y un posterior decremento de la transcripción. Algunos autores afirman que los niveles de transcritos al día 30 ya son sumamente bajos en variedades de cebada consideradas buenas para el malteo como Karl cv. (ver fig. 14; Kim, J.Y. y Seo, Y.W., 2008).

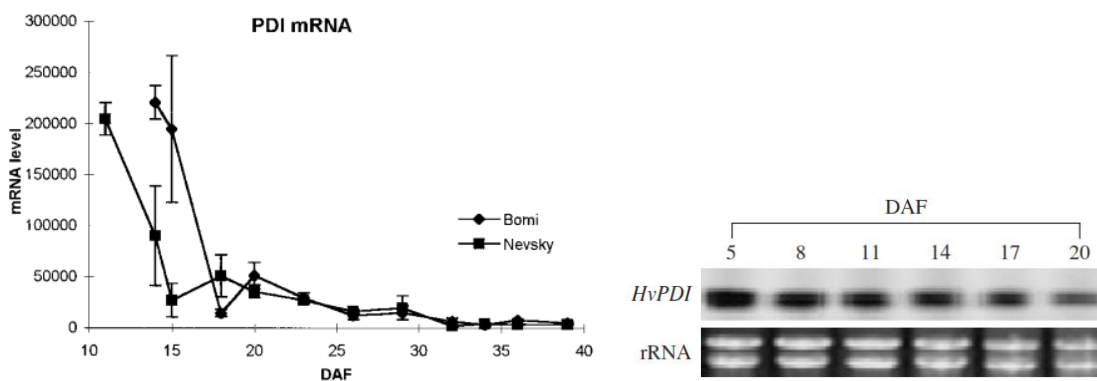


Fig. 14. Imagen de la izquierda, niveles de transcritos de la PDI a diferentes días de llenado de semillas después de la floración (DAF) entre dos variedades diferentes de cebada. Imagen de la derecha, Northern blot del gen PDI en cebada variedad Karl cv. a lo largo del llenado de semilla. El gel de abajo muestra la integridad del RNA a partir del cual se realizó el cDNA. (Kim, J.Y. y Seo, Y.W., 2008; Mogelsvang, S., 1998).

4.3. Asimilación de Nitrógeno por parte de una planta y su relación con la acumulación de proteínas.

4.3.1 Función de Glutamato Descarboxilasa (GAD).

Las fuentes de nitrógeno que pueden ser utilizadas por las plantas son el amonio (NH_4^+) y los nitratos (NO_3^-), en especial estos últimos suelen ser componentes principales de los fertilizantes. En el caso de algunas leguminosas también pueden aprovechar el nitrógeno atmosférico (N_2) si cuentan con rizobios o colectivos de bacterias asentadas en los nódulos de sus raíces capaces de reducir el N_2 a NH_4^+ .

Para ser metabolizados, los nitratos son reducidos a nitritos en el citosol por la nitrato reductasa y estos a su vez a amonio en los cloroplastos por la nitrito reductasa, como se puede observar en la figura 15.

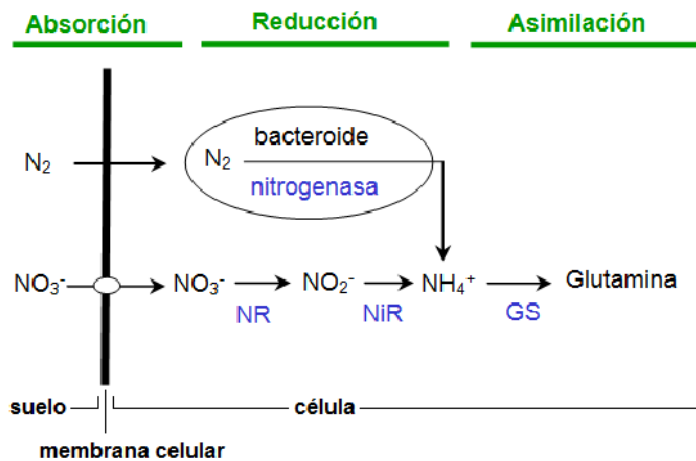


Fig. 15. Esquema de las vías de absorción de nitrógeno y su asimilación en la planta. NR, NiR y GS corresponden a las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintasa respectivamente. El N_2 es reducido por la nitrogenasa en un proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN; Monza, J. y Márquez, A., 2004).

Sin embargo, el amonio es un ión tóxico si queda libre en la célula, por lo que la enzima glutamina sintasa (GS) tiene una gran afinidad por este catión e inmediatamente lo asimila incorporándolo a una molécula de glutamato formando la glutamina seguida por una reacción mediada por la aminotransferasa llamada glutamato sintasa (GOGAT). La GOGAT transfiere el grupo amida de la glutamina al α -cetoglutarato formando dos nuevas moléculas de glutamato. Una de ellas se volverá aceptora de amonio para formar glutamina, cerrando el “Ciclo GS/GOGAT”

y el otro glutamato será utilizado por otras aminotransferasas para la síntesis de diferentes aminoácidos (Monza, J. y Marquez, A., 2004).

El glutamato no sólo participa en esta vía de formación de aminoácidos y asimilación de nitrógeno, también es el precursor principal del ácido gamaaminobutírico (GABA) y el denominado “GABA shunt” o cambio de vía a GABA (ver fig. 16; Fait, A. et al., 2007).

El GABA en plantas se encuentra típicamente en niveles bajos y su aumento se ha relacionado con diferentes estímulos, entre ellos choque térmico, estimulación mecánica, hipoxia y fitohormonas, generalmente relacionadas con algún tipo de estrés en la planta. (Fait, A. et al., 2007).

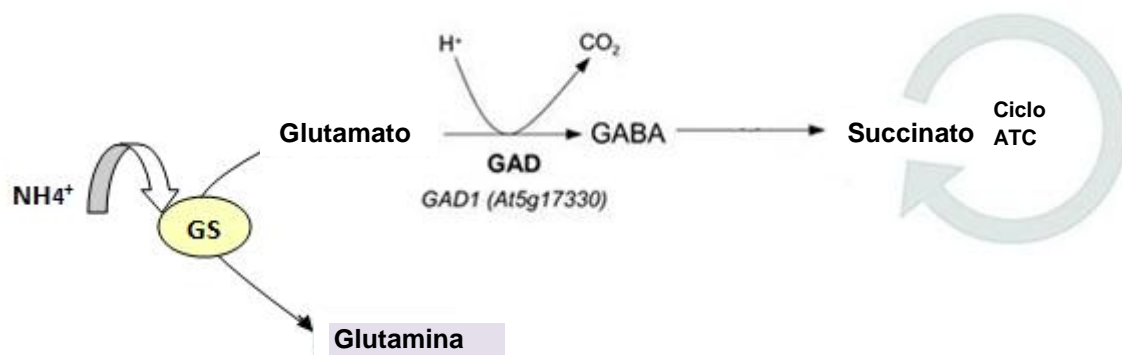


Fig. 16. La reacción del Glutamato a GABA es catalizada por la enzima Glutamato Descarboxilasa (GAD). Posteriormente GABA se transforma a succinato y se va a la vía de los ácidos tricarboxílicos.

La vía que convierte el glutamato a succinato comienza con la descarboxilación directa e irreversible del glutamato por una enzima denominada glutamato descarboxilasa (GAD) dando lugar a GABA. Se cree que esta reacción es la fuente primordial sino es que única de GABA. La glutamato descarboxilasa es específica para el L-glutamato, es dependiente de piridoxal-5-fosfato y tiene un dominio de unión a calmodulina. GAD es una enzima de localización citosólica y el pH óptimo para su función es de naturaleza ácida, alrededor de 5.5. Es por eso

que se ha propuesto que esta enzima se induce cuando el ambiente en el citosol se acidifica. Experimentos han demostrado *in vitro* e *in vivo* un aumento en GABA después de una acidosis en el citosol inducida por estrés. Esto también sugiere una función de regulación del pH por GABA. Se ha visto que en estrés por frío o por manipulación mecánica aumenta el nivel de iones Ca^{2+} dentro de la célula. Así la enzima cuenta con actividad aún a pHs no ácidos, estimulada por calcio y calmodulina. Otro activador de GAD es el aumento de su sustrato, el glutamato, lo que produce una reducción en la síntesis de glutamina y aumento en la vía de producción de GABA, el succinato y otros ácidos orgánicos del ciclo de Krebs. Esto se podría asociar a una reducción en la síntesis de proteínas o aumento en la degradación de estas (Shelp, B.J., 1999; Ueno, H., 2000). La cantidad de transcritos y proteínas de GAD observados en distintos tejidos es diferencial lo que indica que posiblemente es regulada transcripcional y traduccionalmente. Además existen por lo menos dos isoformas de esta enzima, GAD1 expresada de forma específica en la raíz y la GAD2 que se encuentra en todos los órganos de la planta. En *Arabidopsis* se han encontrado otras tres GADs putativas que parecen tener diferencias en su parte C-terminal. Es importante mencionar que se ha visto que los niveles de transcritos, las proteínas y la actividad específica de la GAD2 se reportan aumentados en hojas de plantas crecidas en suelos enriquecidos con NH_4Cl 10mM, NH_4NO_3 5mM, glutamato 5mM o glutamina 5 mM en comparación con aquellas tratadas con KNO_3 (Turano, F.J., y Fang, T.K., 1998).

4.3.2. GABA relacionado a otros procesos metabólicos.

Se ha visto un aumento en GABA también durante la acumulación de nitrógeno. Cuando se inhibe la síntesis de glutamina y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas o aumenta su degradación, el glutamato se va por la desviación GABA. Una hipótesis para explicar su función es que sirva de almacén temporal de nitrógeno. Se ha observado que en cotiledones de semillas de frijol en desarrollo, rápidamente se metaboliza todo el glutamato a GABA y luego este también se reduce, por lo que se cree que el glutamato que entra a la desviación de GABA es comparable a la incorporación directa del glutamato a proteínas. La evidencia

también indica que el glutamato y GABA se producen durante el almacenamiento de proteínas y su movilización como un medio de reciclaje de nitrógeno y de carbono derivados de la arginina. En otros estudios donde se analizó el contenido de vacuolas se observó que el 50% de glutamato, GABA y alanina están localizados en las vacuolas (Abdul-Baki A.A. et al., 1972; Bouché, N., 2004).

Se sabe que la acumulación de proteínas de reserva en cebada se lleva a cabo durante la maduración media a tardía de la semilla. Se ha visto que 25% de los aminoácidos en semilla provienen del ácido glutámico en cebada y 31% en trigo, si tomamos en cuenta también a la glutamina este porcentaje se eleva. El ácido glutámico se encuentra en todo tipo de proteínas en las semillas, pero es mucho más abundante en proteínas de reserva o almacenamiento, como lo son las hordeínas ubicadas en el endospermo de cebada. Cuando la semilla germina, se utiliza ese almacén de carbono y nitrógeno como primera fuente, por lo mismo, la glutamato descarboxilasa previene la acumulación de ácido glutámico y en cambio las convierte a otro tipo de metabolitos. Se ha considerado una relación directa entre la enzima GAD en semillas y su viabilidad, almacenaje y el vigor de las plántulas al germinar (Abdul-Baki, A.A. et al., 1972).

4.4. Bases genéticas de la resistencia a patógenos en plantas.

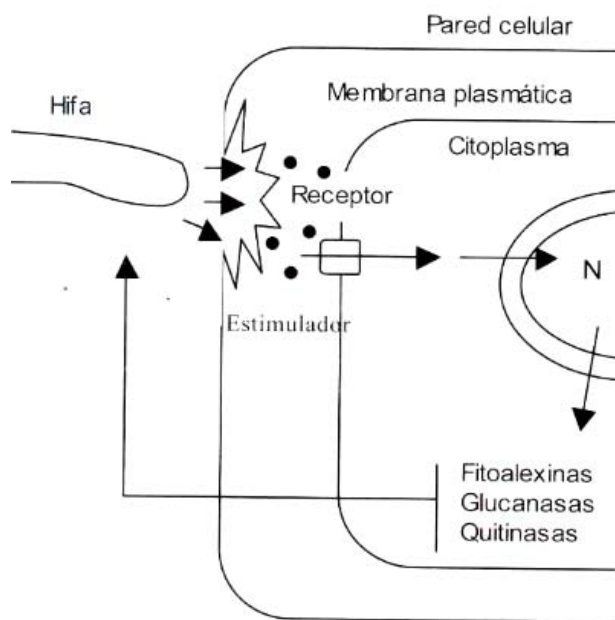
4.4.1. Respuesta inmune de la planta.

Hasta donde conocemos, la respuesta inmune de las plantas es llevada a cabo por dos diferentes vías que se diferencian cinética y cuantitativamente en la activación de los mismos genes de defensa por receptores particulares de cada vía que reconocen moléculas de los patógenos ajenas al huésped. Según el tipo de defensa, basal o específica, podemos clasificar a esos receptores en dos grupos como puede verse en la figura 18.

El primer grupo de receptores, relacionados con la defensa basal en las plantas y con una función muy similar a la inmunidad innata en animales son los PRRs (Receptores de Respuesta a Patrones) que se localizan fundamentalmente en la

membrana celular y reconocen PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos). Los PAMPs son moléculas altamente conservadas y esenciales para el metabolismo del patógeno, pueden ser partes de la pared bacteriana como los lipopolisacáridos o peptidoglicano (bacterias Gram negativas), flagelina, quitina (hongos), ácidos nucleicos virales (virus), entre otras estructuras. Cuando los PRRs reconocen a un PAMP activan toda una vía de señalización por medio de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) con el fin último de que una serín treonín cinasa viaje al núcleo, donde su función es como reguladora de la transcripción a través de modificaciones en proteínas que trabajan como factores transcripcionales, ejerciendo una modificación de la expresión de genes relacionados con defensa (Jones, J.D.G. et al., 2006).

Fig. 17. Esquema general de respuesta inmune en una planta. Primero la hifa del hongo es detectada superficialmente por PRRs que activan genes de defensa para producir fitoalexinas, glucanasas y quitinasas. Al detectar Avr las proteínas R potencian esa respuesta llevando la hoja a muerte celular.



Primero la hifa del hongo es detectada superficialmente por PRRs que activan genes de defensa para producir fitoalexinas, glucanasas y quitinasas. Al detectar Avr las proteínas R potencian esa respuesta llevando la hoja a muerte celular.

Se ha visto que por esta vía los mecanismos de defensa activados tienen que ver con una producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de genes de defensa mediados por factores transcripcionales tipo WRKY (Asai

T. et al., 2002).

La segunda clase de receptores, responsables de una resistencia más específica se conocen como proteínas R y en su mayoría son de tipo intracelular. Este tipo de receptores detectan factores de avirulencia (AVRs) que son proteínas codificadas por los genes Avr con los que cuenta el patógeno. En 1942 Harold Flor propone el modelo de la interacción gen-a-gen entre las proteínas R y los AVRs, donde explica que las interacciones huésped-patógeno incompatibles, es decir,

aquellas donde el huésped es resistente al patógeno, se dan debido a que este cuenta con una proteína R complementaria al factor Avr del patógeno que al detectarlo estimula la defensa contra él (ver fig. 17; Flor, H.H., 1947).

Por otro lado la interacción de tipo compatible es donde el patógeno puede infectar a su huésped, ya que este no cuenta con la proteína R adecuada para reconocerlo y defenderse. Así se propone que la resistencia o susceptibilidad de la planta depende de la presencia de una proteína R que interacciona justo con un AVR en específico. Existe una menor cantidad de proteínas R con respecto a factores de avirulencia, sin embargo se ha visto que una proteína R tiene la capacidad de reconocer a más de un factor de avirulencia.

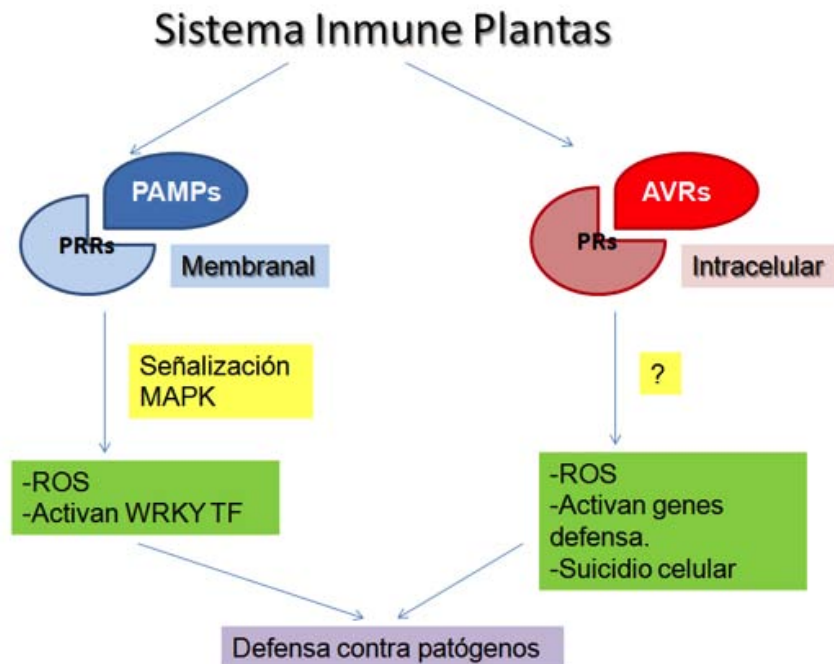


Figura 18. Representación esquemática de las dos vías de defensa; basal por PRRs y la específica por proteínas R.

4.4.2. MLAs; proteínas de respuesta a patógenos.

Generalmente las proteínas R cuentan con tres dominios importantes bastante conservados entre los receptores intracelulares en diferentes especies. En la figura 19 puede verse la estructura modular tripartita de los receptores humanos de tipo NLR (NOD-like receptor, también conocidos como familia NOD-LLR o CATERPILLER) que al igual que Apaf 1 y CED-4 de *C. elegans* regulan respuestas inflamatorias y apoptóticas comparada con la estructura de las proteínas R en plantas. Todas cuentan con un dominio de interacción con otras proteínas localizado en la parte N-terminal, que generalmente recluta factores transcripcionales, una parte central de unión a nucleótido (NB) con actividad de ATPasa (ARC) y por último la parte C-terminal que son dominios de repetición ricos en leucina (LRR) y que se encargan del reconocimiento, directo o indirecto de ligandos pertenecientes a los patógenos (Schulze-Lefert, P., 2007).

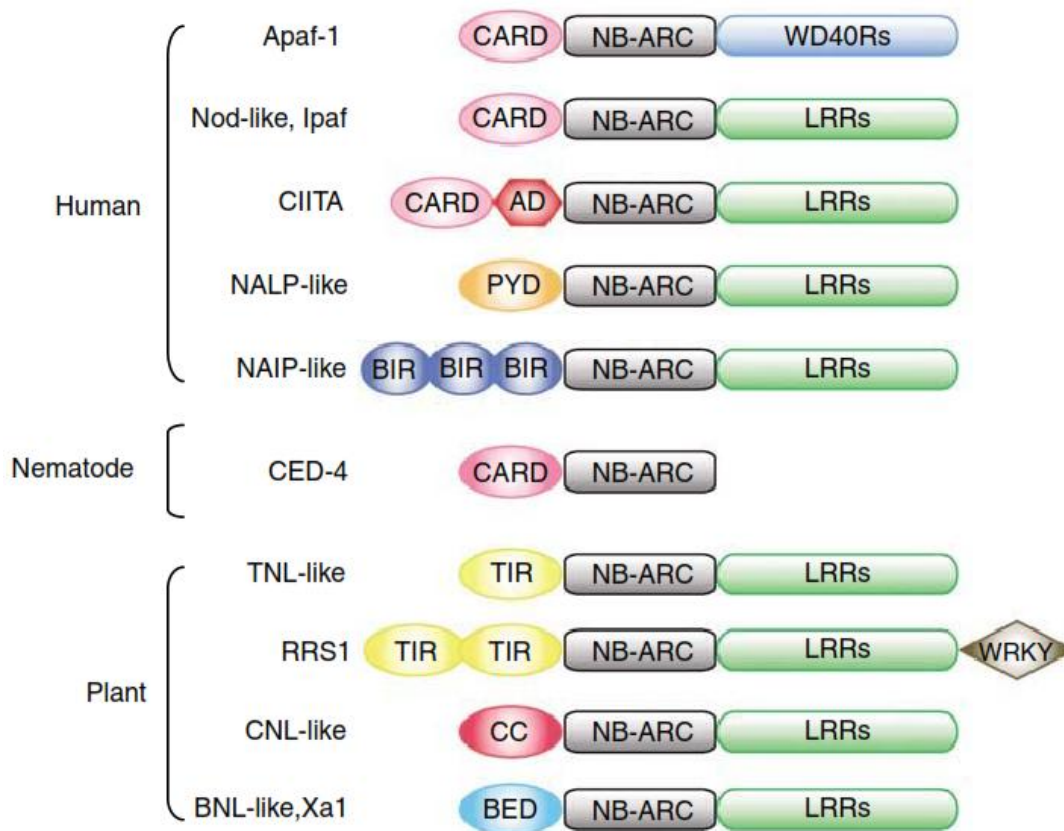


Figura 19. Estructuras tripartitas generales de receptores inmunes intracelulares que detectan estructuras microbianas en animales y plantas. Tomado de Schulze-Lefert, P. (2007).

Algo característico de la defensa específica por proteínas R es que muchas veces lleva al tejido infectado al suicidio celular, que no es de extrañar ya que los receptores con estructura similar se encargan de procesos apoptóticos. Es por lo mismo que este sistema de proteínas R debe encontrarse sujeto a regulación adecuada para no llevar a la planta a una respuesta hipersensible todo el tiempo (Schulze-Lefert P., 2003; Caldo R. A. et al., 2004).

De forma general cuando un patógeno entra en contacto con su huésped vegetal los PRRs que se encuentran en membrana detectan PAMPs y activan como defensa basal la cascada que conduce a la expresión de genes de defensa; generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico, compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas, glucanasas, quitinasas, peroxidación de lípidos, flujo de iones entre otras pero de una forma controlada (García-Pineda, 2004).

Cuando el patógeno rebasa las barreras físicas (pared celular) del huésped sus proteínas R lo detectan. Se unen a factores de avirulencia en el citoplasma, se activan y estimulan la producción de genes de defensa de forma mucho más cuantitativa, así como la respuesta hipersensible y muerte celular de tejido infectado como mecanismo de protección contra el patógeno.

Las proteínas R o de resistencia en la cebada (*Hordeum vulgare*) se denominan específicamente MLAs o proteínas Mildew A. Su nombre hace referencia a sus patógenos más importantes, que son hongos, ya que la palabra inglesa *mildew* fue exportada al francés como *mildiou* y como *moho* al español.

Estas MLAs son transcritas a partir del locus R polimórfico mildew A (MLA) ubicado en el brazo corto del cromosoma 5 de la cebada y codifican para una familia grande de proteínas de tipo receptor intracelular que comparten 90% de identidad de secuencia entre ellos (Schulze-Lefert P. et al., 2007).

Se ha reportado que las MLAs interaccionan con las proteínas HSP90 como proteínas cliente y con las co-chaperonas RAR 1 y SGT1 que ayudan a mantener niveles estables y constantes de estas proteínas para asegurar una resistencia adecuada.

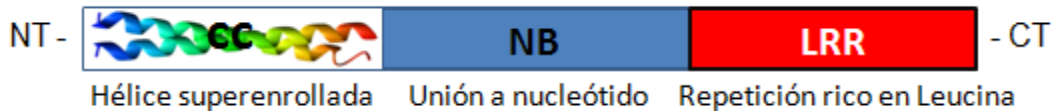


Figura 20. Se muestran los tres dominios funcionales de un receptor MLA.

Los cambios de secuencia entre los receptores MLA se dan en el dominio de repetición rico en leucina, es decir, la parte que se une a los AVR's denotando su función evolutiva de cambio para poder ajustarse al surgimiento de nuevos AVR's por parte de los patógenos. La parte N-terminal cuenta con una estructura de hélice superenrollada (coiled coil) en las MLA's que tiene la función de unirse a proteínas (fig. 20). Es el dominio de hélice superenrollada el que se une a los factores transcripcionales WRKY 1 y WRKY 2 en el núcleo (Schulze-Lefert P. et al., 2007).

La familia de factores transcripcionales tipo WRKY puede actuar en diferentes vías de estrés en plantas; tanto biótico, inducido por patógenos, así como abiótico, actuando en estrés por frío o sequía (Shen Q.J. et al., 2010). Se observó que una sobreexpresión de esos dos factores transcripcionales volvía a las plantas de cebada más susceptibles a la infección por el hongo *B. graminis* que expresa el AVR_{A10} (Schulze-Lefert P. et al., 2007).

Dado que estos factores transcripcionales aumentan su expresión al ser estimulados con PAMPs, se cree que son parte de la cascada de señalización de la defensa basal en plantas. La defensa basal activa factores transcripcionales para activar genes de defensa, pero también para reprimirlos, ya que presumiblemente se intenta evitar una respuesta hipersensible de no ser necesaria (Schulze-Lefert P. et al., 2007).

Las proteínas MLA al unirse a la proteína AVR en una interacción incompatible se activa y se traslada a núcleo, dónde se une a factores transcripcionales represores de la transcripción de genes de defensa y hace que estos se expresen de forma cuantitativamente mayor, induciendo una muerte celular en los puntos de infección, aunque hoy en día no se conoce cómo es que sucede exactamente esto (ver fig. 21). Los artículos más recientes han revelado que un tercer factor transcripcional juega un factor importante en la regulación de genes de defensa, pues se comprobó su unión tanto al factor transcripcional *HvWRKY* 1 como a la parte CC de los MLAs.

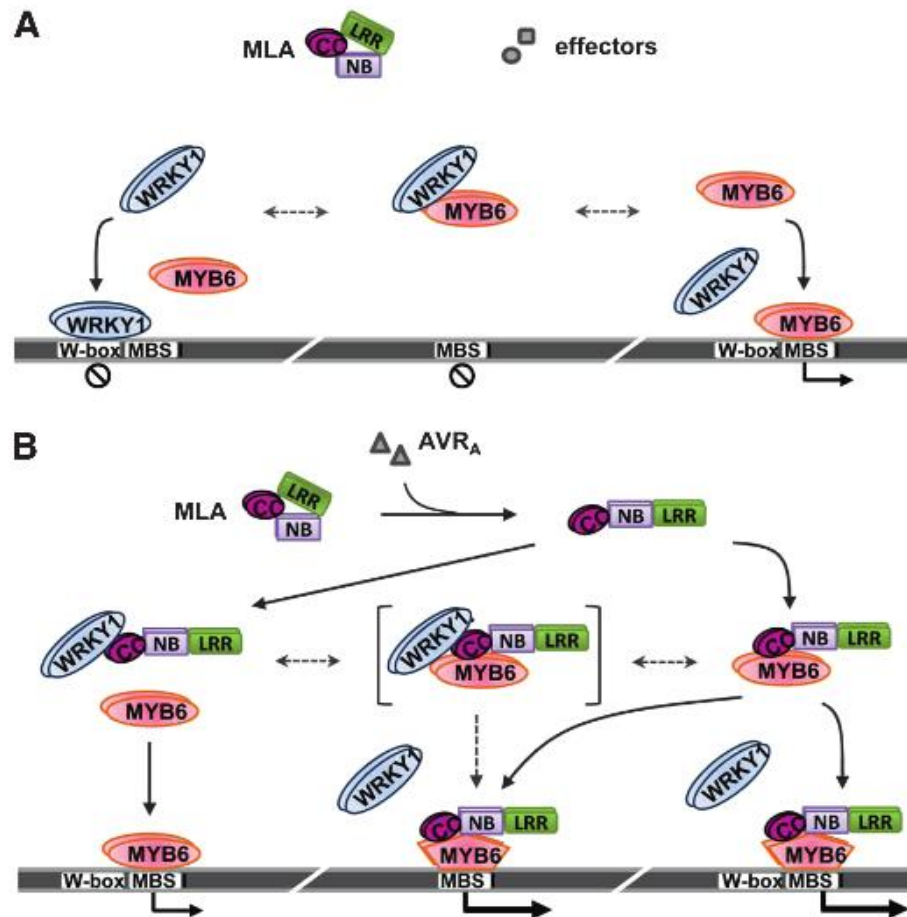


Figura 21. Mecanismo propuesto de interacción entre factores transcripcionales *HvWRKY* 1/2 y MYB 6 con los MLAs. Primero los MLAs interaccionan con el Avr específico que las activa y hace que entren a núcleo. En el núcleo se pegan a factores transcripcionales negativos tipo WRKY1, liberando el sitio que bloquean y

también se une a MYB6, activando a este promotor de genes de defensa y aumentando su expresión. Schulze-Lefert P., 2013.

Este nuevo factor transcripcional denominado MYB6 parece ser quién induce o favorece la transcripción de genes para defenderse.

1. MYB6 desplaza a WRKY1 de promotores de genes de defensa directamente.
2. MLAs se unen a WRKY1 cuando han reconocido AVR y liberan el sitio de unión a MYB6 en promotores.
3. MLAs se asocian a WRKY1 y MYB6 ayudando a posicionar MYB6 en el promotor en lugar de WRKY1.
4. La asociación entre MLAs activados por AVR y MYB6 incrementan la actividad de MYB6 sobre el promotor de genes de defensa.

Cualquiera de estas situaciones incrementa cuantitativamente la expresión de genes de defensa.

Aún falta mucho por saber sobre la cascada de señalización de las MLAs, su degradación y cómo activan la respuesta hipersensible llevando el tejido a un suicidio celular, sin embargo esto es lo que se conoce de ellas hasta el momento (Schulze-Lefert P. et al., 2013).

5. Planteamiento del problema.

Dado que ocurre una acumulación diferencial de proteínas relevantes para el desarrollo de la semilla entre variedades mexicanas de cebada, la pregunta planteada por el siguiente estudio aborda el nivel de regulación para la expresión de esas proteínas. Muy probablemente la tasa de transcripción de los genes durante el llenado de semilla podría ser diferencial también, lo cual haga que una variedad acumule más proteínas que otra. Sería interesante ver si los transcritos de las proteínas de resistencia se expresan a pesar de sembrar las variedades en invernadero y no en campo, así como ver si hay correlación en la cantidad de transcritos con la cantidad de proteína acumulada en cada variedad y tratar de relacionar este rasgo con lo que se sabe sobre la productividad de estas variedades de cebada. Al parecer HV2007-23 es una variedad que produce mayores cantidades de grano, pero presenta problemas de taponamientos de filtros. En esta tesis se decidió enfocarse en la expresión de los transcritos de 5 de estas proteínas a lo largo del llenado de semilla en las 5 variedades; la disulfuro isomerasa (PDI), que aparece en todas las variedades pero con localización y cantidades diferentes en los geles de 2D, sugiriendo acumulación diferencial de isoformas, la glutamato descarboxilasa (GAD1) que está relacionada con el metabolismo del nitrógeno, y tres MLAs o proteínas de resistencia, que fueron identificadas en el análisis por espectrometría de masas: MLA1, MLA 1-2 Y MLA6. Esperamos abrir un nuevo campo de análisis y mejoramiento de cebada en México, donde anteriormente no se ha estudiado mucho a pesar de tener una industria cervecera tan importante a nivel mundial.

6. Hipótesis.

Si se observa una acumulación diferencial en semilla madura de los candidatos a marcadores moleculares PDI, GAD1, MLA 1, MLA 1-2 y MLA 6 en cinco variedades mexicanas de cebada, entonces sus mRNAs pueden presentar acumulación diferencial dependiente de la variedad durante el desarrollo de la semilla.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general:

Analizar la acumulación de los mRNA de PDI, GAD1, MLA 1, MLA 1-2 y MLA 6 a lo largo del llenado de la semilla en cinco variedades de cebada mexicana: HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11.

7.2. Objetivos particulares:

- a) Aislar RNA total a diferentes tiempos a lo largo de llenado de semilla de las 5 variedades de cebada y convertirlo a cDNA.
- b) Analizar la presencia de mRNAs correspondientes a PDI, GAD, MLA 1, MLA 1-2 y MLA 6 por medio de RT-PCR punto final de manera semi-cuantitativa.

8. Materiales y métodos

8.1 Material biológico

Se sembraron 3 réplicas biológicas de las 5 variedades de cebada mexicana: HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11. La siembra se realizó en invernadero bajo condiciones de luz natural a 18 - 26°C. La primera generación fue sembrada con semillas obtenidas bajo condiciones de campo (cosecha Febrero 2012) en Diciembre del 2012 y cosechadas en el periodo Febrero – Marzo 2013. Todas las réplicas biológicas y datos de su crecimiento se muestran en la Tabla 2.

Réplica	Fecha de recolecta en campo	Fecha de siembra en invernadero	Fecha de recolecta en invernadero	Temperatura	Solución nutritiva
R1	Feb-2012	Dic-2012	Feb-2013	No controlada	No
R2	May-2012	Abr-2013	Jul-2013	22°C	Sí a partir D10
R3	May-2012	Feb-2014	Abr-2014	22°C	Sí

Tabla 2. Características de cultivo y crecimiento de las tres réplicas biológicas.

Las semillas se sembraron en cajas cuadradas 30 por 50 cm con la siguiente mezcla de tierra:

- 1/2 de Metromix 500
- 2/8 de tierra Sunshine
- 1/8 de Agrolita
- 1/8 de Vermiculita.

Las plántulas de todas las variedades emergieron al tercer día y a la segunda semana de la siembra midieron alrededor de 15 cm. En todos los casos HV2007-18 fue la variedad más precoz en espigar, con aproximadamente una semana antes que el resto y HV2008-11 la más tardía con una semana de retraso respecto a las variedades HV2005-19, HV2005-04 y HV2007-23. Se regaron cada tercer día.

Las muestras a recolectar fueron las espigas. Según el sistema Zadoks, que maneja las etapas de crecimiento de la cebada con números, a partir del 45 empieza a abrirse la vaina que cubre la espiga. Es entonces cuando se empieza a contar como el primer día para este experimento. Las primeras muestras comenzaron a recogerse a inicios de Febrero 2013. A partir de la apertura de la vaina, que se cuenta como el día 1 de desarrollo en este estudio, se recolectaron las espigas a los tiempos indicados en las figuras 22 y 23.



DÍA	DÍA	DÍA	DÍA	DÍA	DÍA	DÍA	DÍA	SEMILLA
1	3	5	10	15	20	30	40	SECA

Fig. 22. Días del desarrollo de una espiga de cebada. Están indicados los números de etapa del desarrollo según el código Zadok.

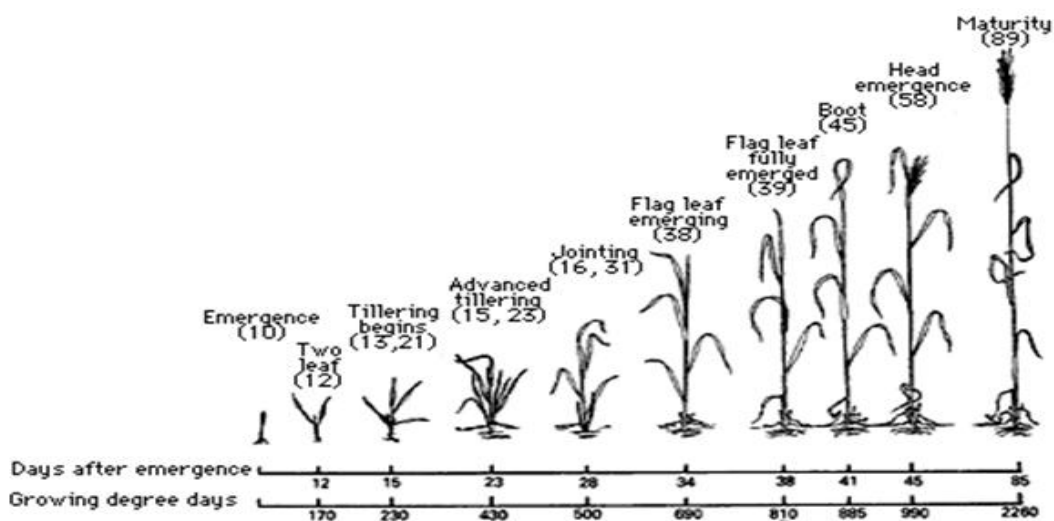


Fig. 23. Días del desarrollo de una planta de cebada.

Después de recolectar las espigas enteras, se les quitaron las aristas puntiagudas y se separaron las espiguillas del raquis. Se pesaron muestras de semillas de 0.1 gramos, se envolvieron en papel aluminio, se etiquetó la muestra y se congeló a -70°C.

La segunda y tercera generación se sembraron en la última semana de Abril y en Febrero del 2014 respectivamente, nuevamente semillas sembradas en campo de las 5 variedades obtenidas en Mayo del 2012. Estas dos generaciones se sembraron en una cámara diferente, nuevamente bajo luz natural y con una temperatura de unos 22 ° C debido al uso de aire acondicionado en esta nueva cámara. La primera generación semejaba más las condiciones de campo ya que su temperatura no estaba controlada. En las dos nuevas generaciones se reusó parte de la tierra de las anteriores y se complementó con nueva mezcla, agregando además una solución nutritiva para hacerla un poco más fértil.

La composición de la solución nutritiva, como queda luego de disolver 2.3 gramos del polvo en un litro: Nitrógeno 212 ppm, Fósforo 50 ppm, Potasio 236 ppm, Calcio 200 ppm, Magnesio 48 ppm, Azufre 68 ppm, Hierro 4.25 ppm, Manganeso 2.4 ppm, Boro 0.76 ppm, Cobre 0.69 ppm, Zinc 1.35 ppm, Molibdeno 0.012 ppm.

8.2 Extracción de RNA

Todas las soluciones para extraer RNA fueron hechas con agua tratada previamente con DEPC para evitar la presencia de RNAsas que puedan degradar la molécula.

Soluciones:

- Agua DEPC

Se deja toda la noche en agitación un recipiente cerrado con 1 mL de DEPC por litro de agua. Al día siguiente se esteriliza en la autoclave por 20 minutos a 1.5 atmósferas de presión y 120 °C.

- Buffer de extracción para RNA
TRIS 50 mM pH 8.0
LiCl 150 Mm
EDTA 5 mM pH 8.0
SDS 1%
Agua DEPC

- Cloroformo
- Fenol básico. pH 8.0
- TRIZOL
- Isopropanol
- Etanol al 70%

Para ver la integridad de RNA:

- TBE 5X
54 g TRIS
27.5 g Ácido Bórico
3.72g EDTA
Aforar con agua DEPC
Llevar a pH 8.0
Autoclavear por 20 min a 120°C y 1.5 atm.

- Agarosa
- Bromuro de etidio 10 mg/mL.
- Marcador de peso molecular 100 pb.
- Formamida desionizada de Sigma.

Metodología de extracción de RNA.

Se empleó la técnica de extracción de RNA de endospermo según Prescott y Martin (1987).

a) Extracción con SDS.

Se congela una muestra de 0.1 g de semillas en nitrógeno líquido y se tritura en un mortero, sin dejar que la muestra se descongele en ningún momento. Se pasa a un tubo Eppendorf de 2 mL agregándole 200 μ L del buffer de extracción de RNA hasta empapar toda la muestra con él. Se mezcla y se le agregan 200 μ L de una mezcla 1:1 fenol-cloroformo, agitando el tubo y dejándolo en hielo por 5 min.

Posteriormente se centrifuga por 10 min a 10,000 g a 4°C. Se agrega 200 μ L de fenol-cloroformo y se agita bien. Se centrifuga nuevamente 10 min a 10,000 g a 4°C. Se agrega 200 μ L de cloroformo, se agita bien y se deja reposar en el hielo por 5 min. Se centrifuga la muestra por 10 min a 10,000 g a 4°C.

b) Extracción con TRIZOL.

Se separa la fase acuosa superficial y se pasa a otro tubo Eppendorf de 2 mL. La fase orgánica que queda en el fondo del tubo se desecha en residuos de fenol. A este nuevo tubo se agrega 1 mL de TRIZOL. Se mezcla con vortex bien por 15 s la mezcla y se incuba por 5 min a temperatura ambiente (T.A.). Se agregan 200 μ L de cloroformo, se mezclan bien y se deja reposar a T.A. por otros 3 min. Se centrifuga la muestra por 10 min a 10,000 g a 4°C.

c) Precipitación del RNA.

Se transfiere la fase acuosa del tubo recién centrifugado y se pasa a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se le agregan 500 μ L de isopropanol, se mezcla con el vortex y se incuba una hora a -70°C. Después de ese tiempo, se descongela y centrifuga por 10 minutos a 21,000 g a 4°C para formar el pellet de RNA.

d) Lavado y disolución del RNA.

Quitar el sobrenadante con cuidado, tratando de no llevarse el pellet y agregar 1 mL de etanol al 70% preparado con agua DEPC. Centrifugar por 5 min a 21,000 g a 4°C. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet y secar el precipitado de RNA que queda en el tubo dejándolo 10 min a T.A. Disolver el pellet de RNA en 50 µL de agua tratada con DEPC y disolverlo mezclando.

e) Verificación de la integridad del RNA.

Se mide la concentración del RNA obtenido en un Nanodrop y posteriormente se carga 1 µg de esa muestra en un gel de agarosa 2%. Este gel se pone en una cámara de electroforesis llena de solución TBE 0.5x diluida con agua DEPC. La muestra de RNA se mezcla con el doble de su cantidad de formamida desionizada y se carga en los pozos del gel. Se corre a 60 Volts por 35 minutos y se observan las bandas del RNA bajo luz UV.

Tratamiento con DNasa.

Se preparó la reacción para la digestión con DNasa:

- 1-8 µL RNA extraído de semillas de cebada
- 1 µL RQ1 DNasa libre de RNasa
- 1 µL RQ1 amortiguador de DNasa 1X
- H₂O libre de nucleasas cuanto baste para (cbp) 10 µL.

Se incubó la reacción a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se agregó 1 µL de “RQ1 DNase Stop solution” y se incubó a 65°C por 10 min para desactivar a la DNasa y terminar la reacción.

Transcripción Inversa.

(Se sigue el protocolo de Reverso Transcripción de Promega para la enzima Improm II Reverso Transcriptasa). Todas las reacciones se realizaron de la siguiente manera:

Reacción A

- RNA (volumen que contenga hasta 1000 ng)
- 2 μ L de oligo d(T) (10 μ M)

H₂O DEPC cbp 5 μ L.

Se incubó a 70°C durante 5 minutos y posteriormente se llevan las reacciones en hielo a 4°C por 5 minutos.

Reacción B (Mix de RT)

- 7.1 μ L de H₂O DEPC
- 4.0 μ l de amortiguador Improm-II
- 2.4 μ l MgCl₂ 25 mM
- 1.0 μ L de dNTPs 10 mM c/u
- 0.5 μ L inhibidor de RNasa - RNasin

Se mezcló la reacción en vortex y posteriormente se agregó:

- 1.0 μ L Improm-II TM Transcriptasa Reversa

Se juntaron la reacción A y B para obtener un volumen final de reacción de 20 μ l. Se incubaron a 42 °C por 60 minutos. Finalmente se dejan 15 minutos a 70°C para desactivar la enzima. Los cDNAs ahora se guardan a -20°C o se dejan en hielo para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con Syber Green

Reacción

- 6.25 μ L Syber Green EXPRESS GREENER QPCR UNI-1000 x 50 RXNS.
- 1.0 μ L Oligonucleotidos o cebadores [10 μ M]
- 4. 25 μ L H₂O DEPC
- 2.0 μ L cDNA obtenido de la reacción de RT en el caso de PDI (diluido 1/10 de la reacción original) o 1.0 μ L cDNA para GAD1, MLA 1, MLA 1-2 y MLA6, tomado directamente de la reacción de RT.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (BioRad) con una temperatura de desnaturalización de 95°C, seguida de una temperatura de alineación de los cebadores de 65°C y de una temperatura de extensión de 72°C. El número de ciclos varía para cada gen: 22 ciclos para el control de rRNA 18S, 30 ciclos para PDI, 38 ciclos para GAD1, MLA1, MLA1-2 y MLA 6. Las secuencias de los cebadores utilizados pueden consultarse en el anexo 1 de esta tesis. Al finalizar la reacción se observaron los productos en geles de agarosa al 2.0% y se realizó un análisis densitométrico de las bandas con el programa KODAK Image Station 4000 Digital Imaging Systems.

9. Resultados

9.1 Estandarización de PCR y RT-PCR para PDI, GAD1, MLA 1, MLA 1-2 y MLA 6.

Para la amplificación de genes o transcritos se diseñaron oligonucleótidos que abarcaran fragmentos de tamaño pequeño (100-300 pb) con el objeto de utilizar PCR cuantitativo (tiempo real) en un futuro. La tabla de cebadores diseñados se puede revisar en el Anexo 1 de esta tesis. A partir de los cebadores diseñados se seleccionaron los que se muestran en la Tabla 3 para realizar los ensayos de estandarización. Como control se utilizó el transcrito correspondiente a rRNA 18S.

Gen	Cebadores	DNA (pb)	cDNA (pb)
PDI	F1; R1	321	162
GAD1	F1; R1	615	242
MLA1	F2; R1	281	281
MLA1-2	F1; R2	316	316
MLA6	F1; R1	321	321
rRNA 18S	F1; R1	218	218

Tabla. 3. Tamaños esperados de los amplicones correspondientes al gen (DNA) o transcrito (cDNA) para cada marcador acorde a los cebadores que se utilizaron en cada caso.

Los amplicones de PDI y GAD1 tienen diferentes tamaños para cDNA y DNA. Esto, aparte del tratamiento con DNAsa previo, brinda otra forma de asegurarse que la muestra no se encuentra contaminada por DNA. De haber presencia de DNA amplificarían dos bandas de diferentes tamaños. Para los transcritos de las MLAs los amplicones son del mismo tamaño en ambas secuencias ya que no hay intrones entre los sitios de complementariedad de los cebadores. En la figura 24 se puede observar un ejemplo de amplificación con los cebadores seleccionados.

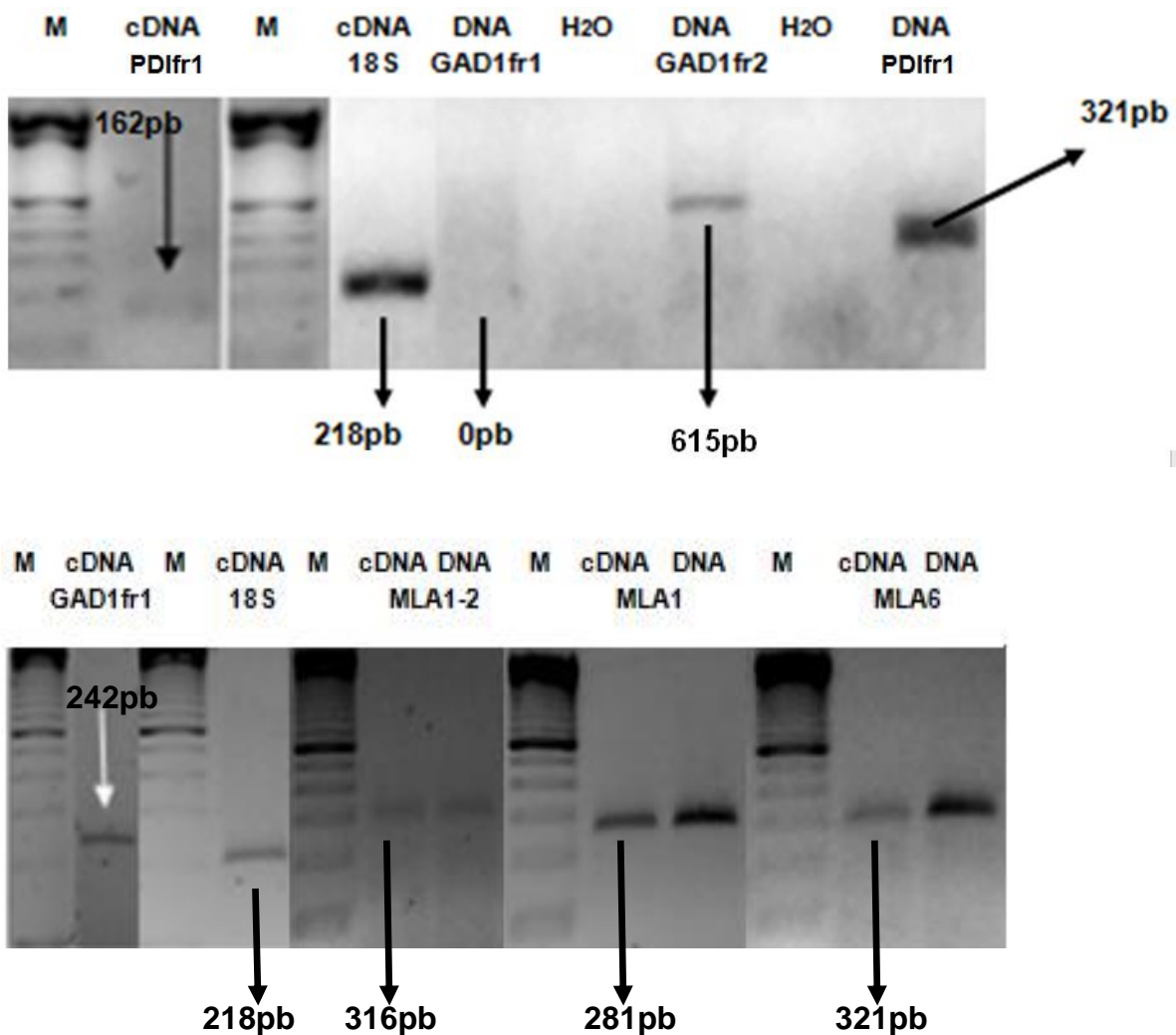


Fig. 24. En la figura se muestran geles de agarosa al 2% donde pueden observarse las bandas de los transcritos amplificados a partir del cDNA o del DNA genómico. PDI y GAD1 contienen intrones entre las secuencias amplificadas por lo que su tamaño de transcrito es diferente, en cambio los amplicones de las MLAs corresponden al mismo tamaño en cDNA y DNA ya que no contienen intrones de por medio. GAD1fr1 no amplifica en DNA debido a que su cebador reverso es complementario a la unión entre dos exones, así la presencia de un intrón entre ellos en el DNA no permite su complementariedad.

En el genoma de cebada se han reportado siete diferentes isoformas de PDI que muestran tamaños y/o puntos isoeléctricos distintos (fig. 25). Los cebadores utilizados en este trabajo pueden identificar a 4 de las 7 isoformas; PDI – 205, PDI – 204, PDI – 203 y PDI – 206. Quedarían excluidas de los resultados mostrados en este trabajo las isoformas PDI – 207, PDI – 202 y PDI – 201.

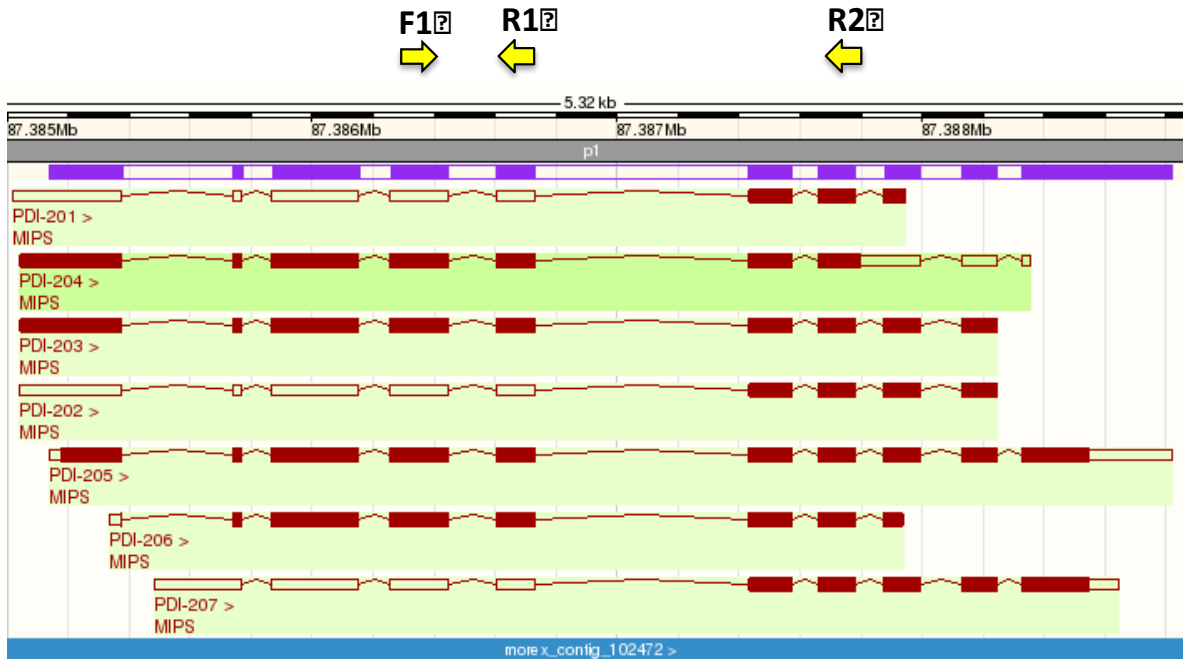


Fig. 25. En la figura están mostrados con flechas las regiones dónde fueron diseñados los cebadores. Se utilizaron F y R1 que están ubicados en los exones 4 y 5 del gen *PDI*. Cuatro de las siete isoformas pudieron ser analizadas con los cebadores elegidos.



Fig. 26. Estandarización del número de ciclos para realizar la RT-PCR punto final semi-cuantitativa de PDI utilizando como control a rRNA 18S. M: marcador de masa molecular (escala de 100 pb).

Para asegurarnos de que la enzima no se saturara y que aún pudiéramos observar un aumento en la acumulación de los transcritos, se realizó un experimento para determinar el número de ciclos óptimos (fig. 26). Como el transcrito de la PDI era mucho más abundante que el de los otros genes se utilizó una dilución del cDNA de 1/10 veces. Para los otros genes se utilizó 1µL sin diluir de cDNA en la reacción de PCR. Como puede verse en la figura 27 para la PDI 30 ciclos de amplificación son adecuados para que no se saturara y para el 18S 25 ciclos. Para GAD1 y los MLAs se utilizaron 38 ciclos debido a su menor abundancia.

9.2 Análisis por RT-PCR punto final de PDI, GAD1, MLA1, MLA1-2 y MLA6 durante el llenado de semilla de cebada.

En la figura 27 se muestra un ejemplo del resultado de RT – PCR en gel de agarosa para la variedad 19. Esos resultados corresponden a la primera réplica biológica. El análisis semicuantitativo de los datos se realizó por densitometría de las bandas en los geles. Se analizaron los datos de tres réplicas biológicas y por cada experimento se hicieron dos réplicas técnicas. El promedio de las réplicas técnicas con desviación estándar se puede observar por gen y variedad graficadas en el anexo 2 (PDI), anexo 3 (GAD1), anexo 4 (MLA1), anexo 5 (MLA1-2) y anexo 6 (MLA6).

El análisis semi-cuantitativo consiste en la densitometría de las bandas de los transcritos. Se hace la densitometría tanto del gen de estudio como del gen control 18S. A cada experimento se agrega un control positivo y de comparación; el 18S y uno negativo, agua en vez de muestra. Para cada recuadro donde medimos la intensidad de la banda, debe seleccionarse la misma área para cada gen. El primer paso en el análisis es dividir la intensidad neta del gen entre el área del recuadro seleccionado. A este valor se le resta el fondo o la intensidad del valor negativo para evitar variaciones de fondo. Ya que para el gen en estudio y el control se han realizado esos pasos, se procede a dividir la intensidad del gen entre la intensidad del 18S.

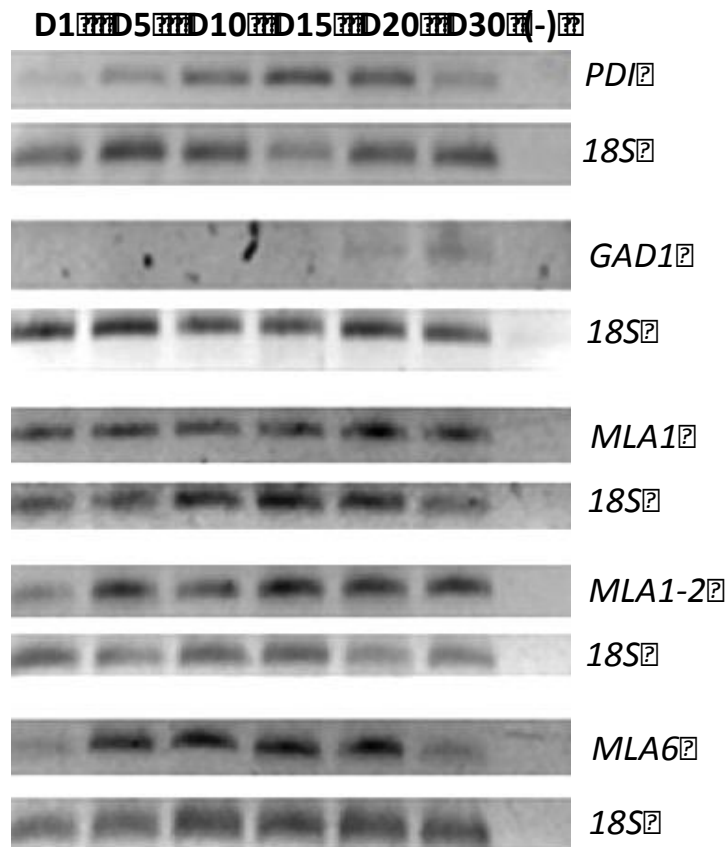


Figura 27. RT-PCR de *PDI*, *GAD1*, *MLA 1*, *MLA 1-2* y *MLA 6* para la VARIEDAD 19 durante el llenado de semilla. Un microgramo de RNA total tratado con DNasa fue utilizado para la obtención de cDNA de cada tiempo de llenado de la semilla. Para *PDI* y *18S* se utilizó una dilución 1:10 de cada cDNA (5 ng), mientras que para el resto de genes se utilizó el cDNA sin diluir (50 ng) por reacción de PCR. Para *PDI* se utilizaron 30 ciclos y 25 para *18S*. *GAD1*, *MLA1*, *MLA 1-2* y *MLA6* necesitaron 38 ciclos. D1-D30; días a partir de la aparición de espiga, (-); control sin cDNA, 18S; RNA ribosomal 18S utilizado como control de carga y para normalizar la cantidad de cDNA por muestra.

9.2.1 Ejemplo de análisis de datos para el gen *PDI* en la variedad 04.

En la figura 28 y la tabla 4 se muestra un ejemplo de los datos de RT-PCR semi-cuantitativo y el procesamiento densitométrico de bandas amplificadas. Los datos obtenidos, mostrados en la casilla E de la tabla 4, son los que se utilizaron para determinar la tendencia en la expresión de cada gen por variedad en una réplica técnica. Al realizar dos mediciones de la misma manera del mismo gen con la misma muestra, se hace el promedio de los valores en amarillo y se saca su desviación estándar para anexarlo a las gráficas. En las gráficas de comparación entre las tres réplicas biológicas los valores mostrados por las líneas son los

promedios de las réplicas técnicas para cada una. Los valores representados en las gráficas de comparación entre variedades por réplica son nuevamente los promedios de las réplicas técnicas acompañadas de su desviación estándar positiva y negativa en las barras.



Figura 28. Muestra de las bandas que resultan de los transcritos de PDI y 18S (gen control) utilizados para hacer el análisis densitométrico posterior.

<i>PDI 04</i>					
	A	B	C	D	E
Serial Number	Net Intensity	Interior Area	NetInt/Area	Resta Fondo	PDI/18S
D1	160320	1536	104.375	129.955729	0.27626296
D5	675860	1536	440.013021	465.59375	0.73351971
D10	578648	1536	376.723958	402.304688	1.20076017
D15	893866	1536	581.94401	607.52474	1.11732002
D20	1052908	1536	685.486979	711.067708	1.05260991
D30	26852	1536	17.4817708	43.0625	0.07471003
H ₂ O	-39292	1536	-25.5807292	0	
<i>18S 04</i>					
	F	G	H	i	
Serial Number	Net Intensity	Interior Area	NetInt/Area	Resta Fondo	
D1	738492	1488	496.298387	470.405914	
D5	983020	1488	660.63172	634.739247	
D10	537070	1488	360.93414	335.041667	
D15	847604	1488	569.626344	543.733871	
D20	1043714	1488	701.420699	675.528226	
D30	896204	1488	602.287634	576.395161	
H ₂ O	38528	1488	25.8924731	0	

Tabla 4. Análisis densitométrico para una réplica técnica de la primera réplica biológica de la variedad 04. En las columnas A y F se encuentra la intensidad neta de las bandas de los transcritos observados en la figura 28. A corresponde a PDI y F a 18S. En B y G se representan los pixeles en las áreas seleccionadas para la medición. En C se divide la intensidad neta del transcrito (A) entre el área seleccionada (B) para PDI. Para la

columna H ocurre lo mismo (F/G) pero para el control 18S. A continuación se resta el fondo para cada uno. En D, se va a restar el valor de la casilla que tenía agua en vez de muestra (-25.5807292) a cada uno de los valores anteriores con muestra. Para I se hace lo mismo (D1 - H2O, D2 - H2O, etc...) Finalmente se divide la intensidad del transcrito del gen en estudio entre la del control 18S (D/I) dando los resultados en la columna E. Éstos son los valores a graficar para cada réplica técnica. El promedio de dos réplicas técnicas y su desviación estándar nos dan una réplica biológica para una variedad. Este proceso se repite para las 5 variedades.

9.2.2. Comportamiento de los transcritos de PDI.

En la figura 29 se muestran las gráficas que indican la expresión normalizada de PDI por variedad durante el desarrollo de las semillas en tres réplicas biológicas diferentes (R1-R3).

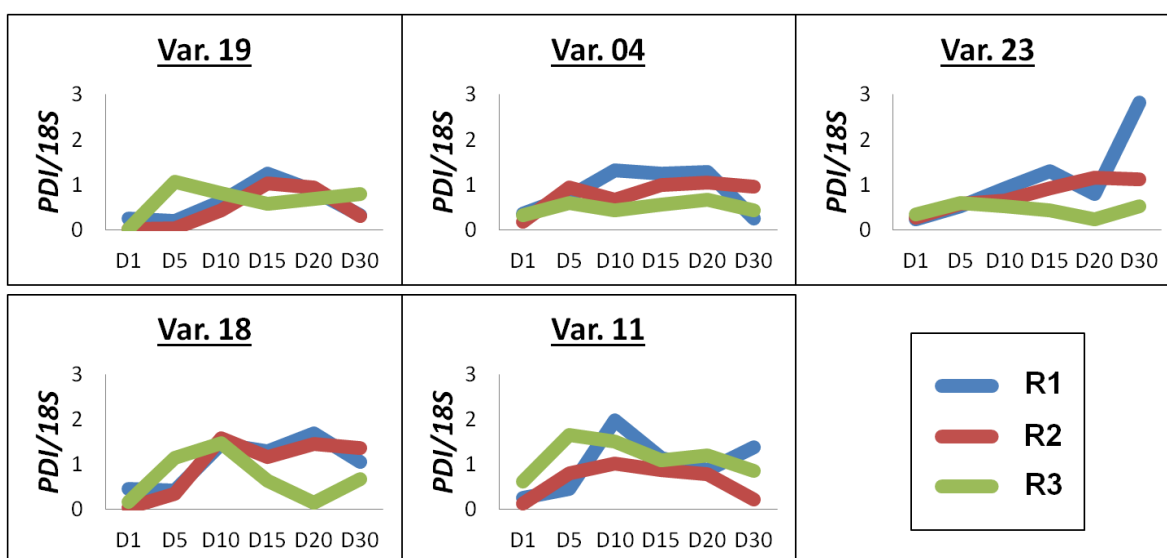


Fig. 29 Cinéticas de los transcritos de PDI para las 5 variedades durante el desarrollo de semillas de cebada. En azul se representa la primer réplica biológica, en rojo la segunda y en verde la tercera.

Para la primer réplica biológica todas las variedades presentaron un pico en la expresión de PDI entre los días 10 a 20 después de la apertura de la espiga. Las variedades 19 y 23 presentaron este pico alrededor del día 15, mientras que las variedades 04 y 11 lo presentaron en el día 10. Posteriormente, se notó una disminución en los niveles del transcrito hasta el día 30, excepto para la variedad 23 donde nuevamente se apreció un aumento.

Para la segunda réplica se observa que hubo un ligero retraso en el pico de expresión de PDI para las variedades 19, 4 y 23, hacia el día 20. En este caso las variedades 4, 18 y 23 mantuvieron altos niveles de transcrito hasta el día 30, mientras que las variedades 11 y 19 sufrieron una disminución de transcritos correspondientes a PDI en esta etapa tardía del desarrollo.

En la tercera réplica de siembra se observó un desplazamiento en el pico de transcripción de PDI hacia etapas más tempranas del desarrollo de la semilla en comparación con las otras dos réplicas. Curiosamente, en este caso la acumulación tardía de PDI para la variedad 23 no fue observada, aunque esta variedad si presentó niveles estables para el día 30.

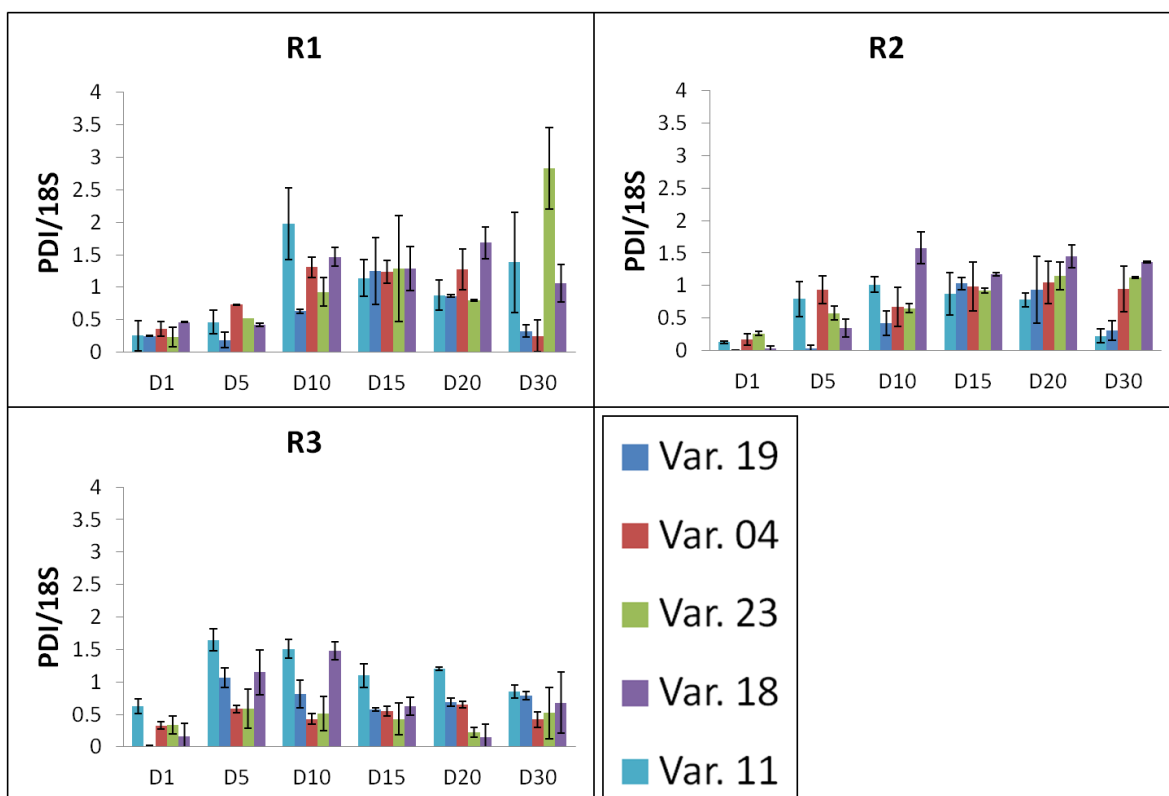


Fig. 30. Cinéticas de acumulación de transcritos de PDI incluyendo a las cinco variedades por réplica biológica. En estas gráficas se muestra graficado el promedio de las réplicas técnicas y su desviación estándar por variedad en cada cosecha o réplica biológica. En azul oscuro se observa la variedad 19, en rojo la variedad 04, en verde la variedad 23, en morado la variedad 18 y en azul claro la variedad 11.

En la figura 30 puede observarse la cinética de transcritos de PDI para todas las variedades estudiadas por réplica biológica y comparar si su comportamiento se modifica grupalmente, afectado por características propias de cada réplica biológica como nutrimentos, época del año, temperatura, etc. En la primera réplica se observa que en la mayoría de las variedades se presenta el pico de transcripción al día 15 de desarrollo de la semilla, con niveles de transcritos relativamente uniformes entre variedades. En la segunda generación este comportamiento se conserva, semejando la forma de una campana de Gauss donde el pico está entre los días 15 y 20. Llama la atención que la tercera réplica si se ve muy diferente. El pico de transcripción general parece ser más temprano, entre los días cinco y diez.

Las condiciones de cámara de crecimiento como temperatura y riego fueron las mismas entre las réplicas dos y tres, siendo diferentes a las correspondientes a R1. Sin embargo, hay mayor parecido entre las cinéticas de acumulación de R1 y R2. Por otro lado, aunque las siembras se llevaron a cabo durante diferentes meses, R1 y R3 fueron sembradas en épocas del año más frías que la R2. A pesar de estas variables, es notorio que la variedad 11 mostró consistentemente una cinética de acumulación de PDI más temprana en las tres réplicas.

9.2.3 Comportamiento de los transcritos de GAD1.

En la primer réplica los transcritos de *GAD1* se detectaban sólo en los días 20 y 30, dando bandas muy tenues en el gel. En este caso las variedades 11 y 23 mostraron los mayores niveles de *GAD1*. Esto se puede observar en la figura 31, donde la primera réplica (R1) cuya cinética se muestra en azul se comporta de forma diferente a las demás. Hay que señalar que solo en R1 no fueron agregados nutrimentos adicionales al cultivo.

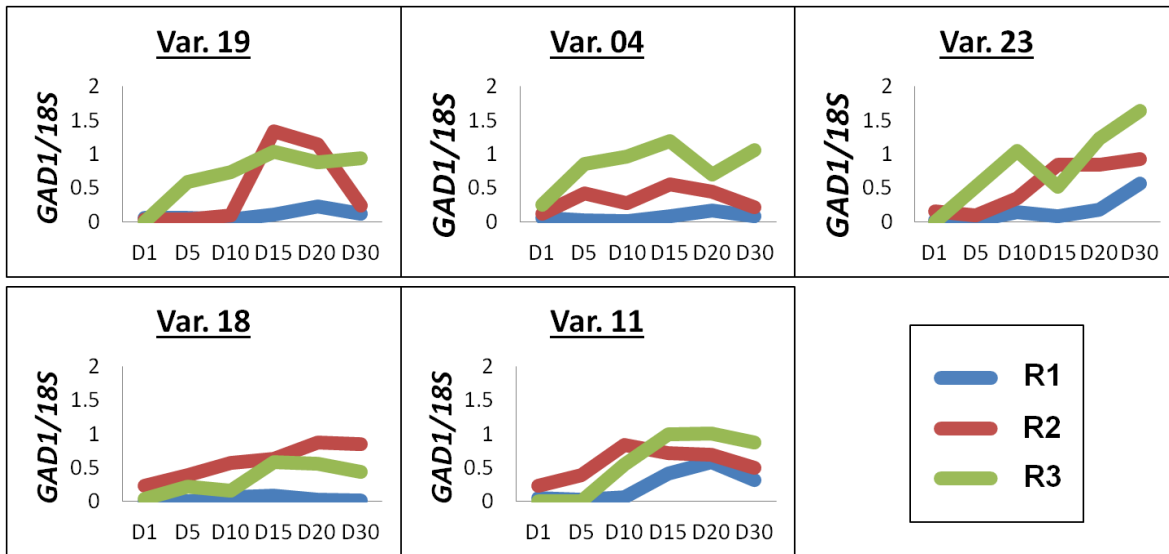


Fig. 31. Cinéticas de expresión para los transcritos de *GAD1* en las 5 variedades de cebada y 3 réplicas biológicas. En azul se representa la primera réplica biológica, en rojo la segunda y en verde la tercera.

Para las réplicas dos y tres se observaron niveles detectables desde el día 5 (fig.31). En la segunda réplica biológica (en rojo) *GAD1* presentó picos de acumulación para todas las variedades entre los días 15 al 20 pero solo para las variedades 23 y 18 se observaron incrementos en la acumulación hasta el día 30. Por su parte, en la tercera réplica de siembra (en verde) la cinética de expresión de *GAD1* fue diferente para cada una de las 5 variedades. Particularmente, la variedad 18 presentó menor acumulación y la variedad 23 mostró mayor incremento desde el día 20 (fijarse en la escala del eje y de la figura 31 para notar esto).

Si se observa la figura 32 puede verse que este gen parece transcribirse de forma más tardía, presentando un pico de transcripción en todas las variedades del día 15 al 30. Esto se repite en las tres réplicas biológicas, con la particularidad de que la tercera réplica (fig. 32) parece tener un aumento en la transcripción también entre los días 5 a 15.

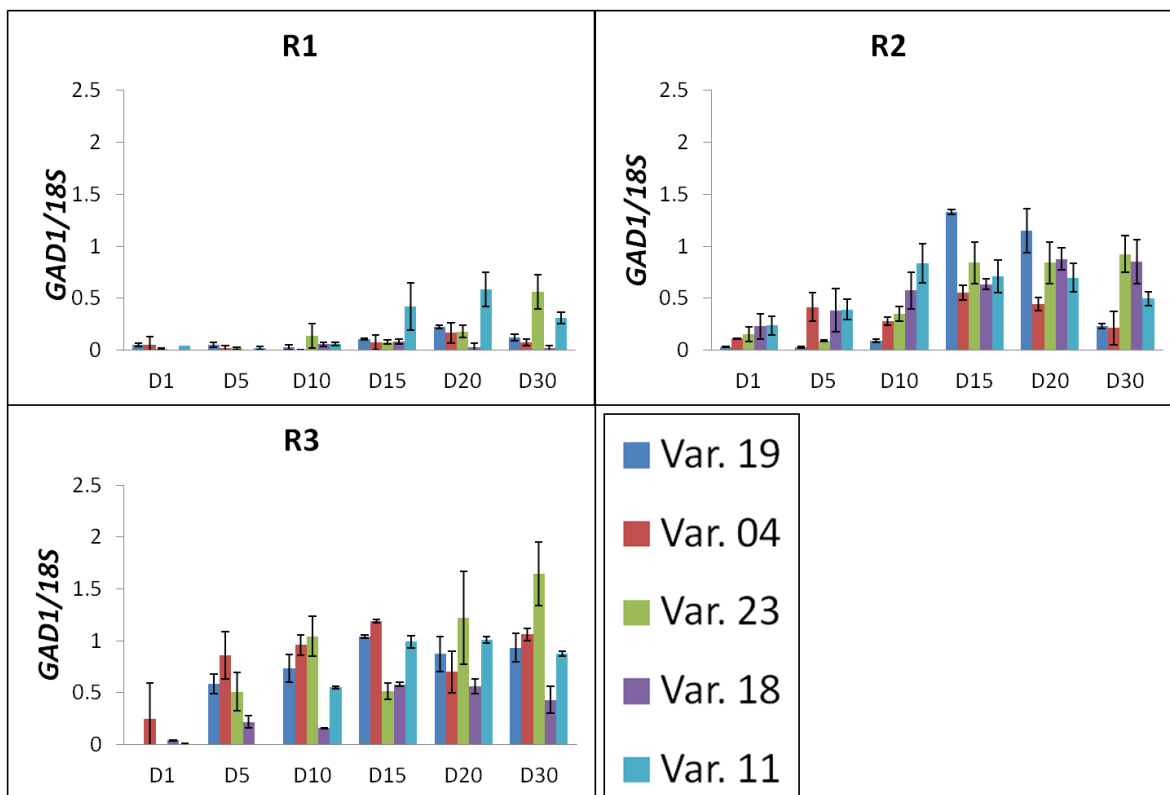


Fig. 32. Cinéticas de acumulación de transcritos de GAD1 incluyendo a las cinco variedades por réplica biológica. En estas gráficas se muestra graficado el promedio de las réplicas técnicas y su desviación estándar por variedad en cada cosecha o réplica biológica. En azul oscuro se observa la variedad 19, en rojo la variedad 04, en verde la variedad 23, en morado la variedad 18 y en azul claro la variedad 11.

En la figura 32 puede verse que la variedad 23, representada en verde, es la única que siempre tiene su pico de transcritos al día 30 y este pico es de los más intensos entre variedades.

9.2.4 Comportamiento de los transcritos de MLA1, MLA1-2 y MLA6

El comportamiento cinético de las MLAs fue muy variable (ver figuras 33, 34 y 35), no sólo entre variedades sino también entre réplicas. No se puede establecer una tendencia general. Únicamente para las variedades 19 y 04 es notoria una expresión significativamente constitutiva de los transcritos de estos genes. En las variedades, 23, 18 y 11 se dan picos temporales de expresión que difieren de día en las tres réplicas biológicas (ver anexo 7).

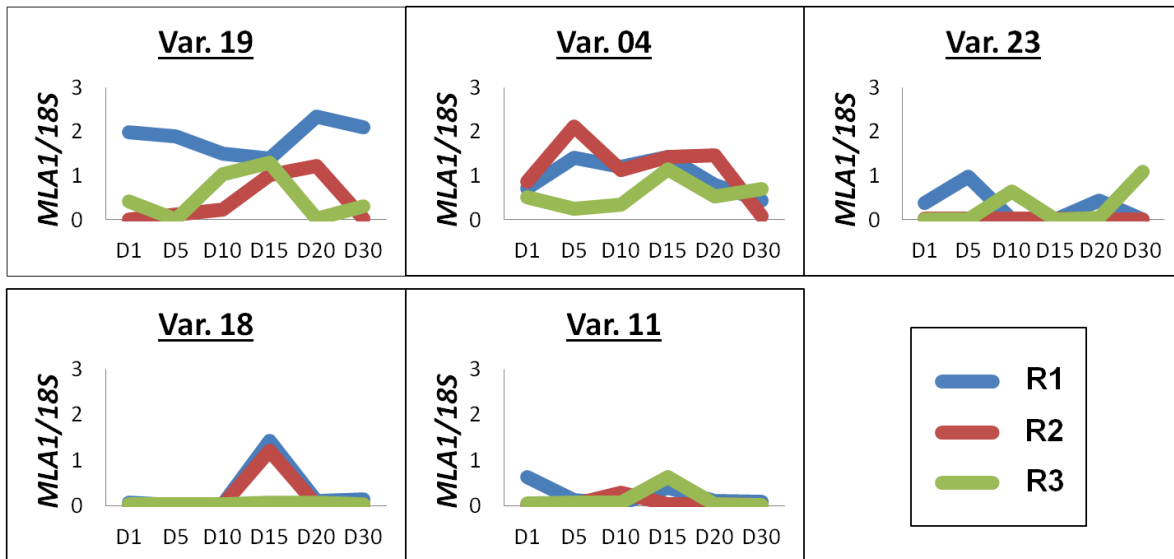


Fig. 33. Cinéticas de expresión para los transcritos de *MLA1* en las 5 variedades de cebada y 3 réplicas biológicas. En azul se representa la primera réplica biológica, en rojo la segunda y en verde la tercera.

En las gráficas para *MLA1*, mostradas en la figura 33, puede notarse que las variedades 19 y 04 son las que tienen cinéticas de transcripción más constantes. Esto es aún más claro en el anexo 7, donde se observan las bandas amplificadas por RT-PCR en todas las etapas de desarrollo solamente para estas variedades. En las variedades 23 y 11, se presentan uno o dos picos del día 1 al 30 de muestreo por réplica y la variedad 18 sólo se expresa al día 15 en dos de las réplicas, mientras que en la tercera no mostró expresión de *MLA1*.

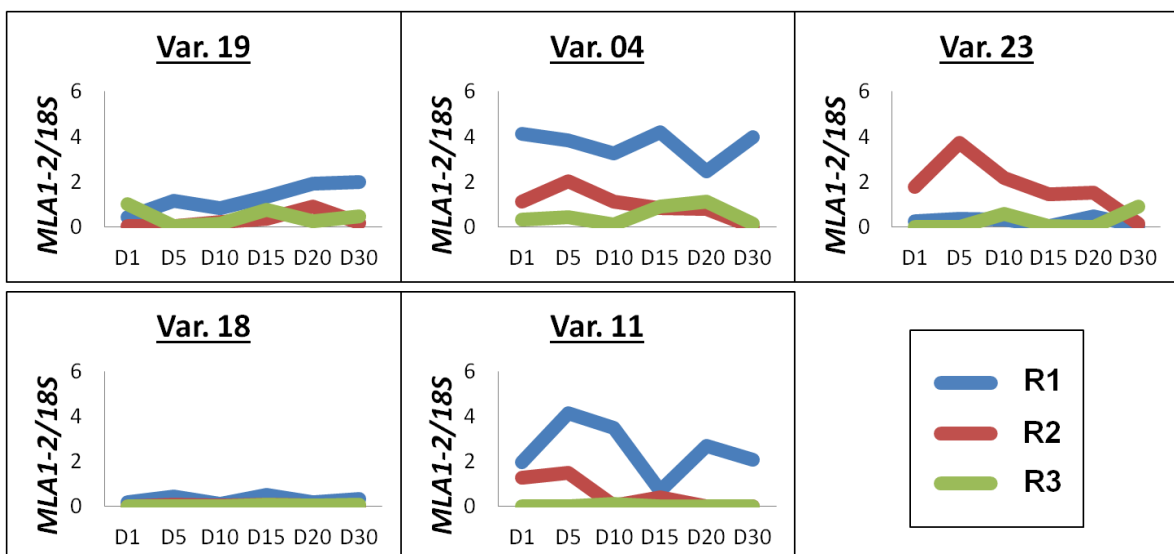


Fig. 34. Cinéticas de expresión para los transcritos de *MLA1-2* en las 5 variedades de cebada y 3 réplicas biológicas. En azul se representa la primera réplica biológica, en rojo la segunda y en verde la tercera.

Para *MLA1-2* nuevamente se presenta una transcripción constitutiva y mucho más constante en las variedades 19 y 04, especialmente para la primera réplica, en azul (fig. 34). Por su parte las variedades 23, 18 y 11 presentan picos esporádicos de transcritos. En la réplica dos y tres, a pesar de que las variedades 19 y 04 siguen transcribiendo constitutivamente, los amplicones son mucho menos intensos. La variedad 23 despunta con un pico al día cinco, mucho más intenso que todos los demás. En la réplica tres, los amplicones para todas las variedades fueron mucho menos intensos para *MLA1-2*.

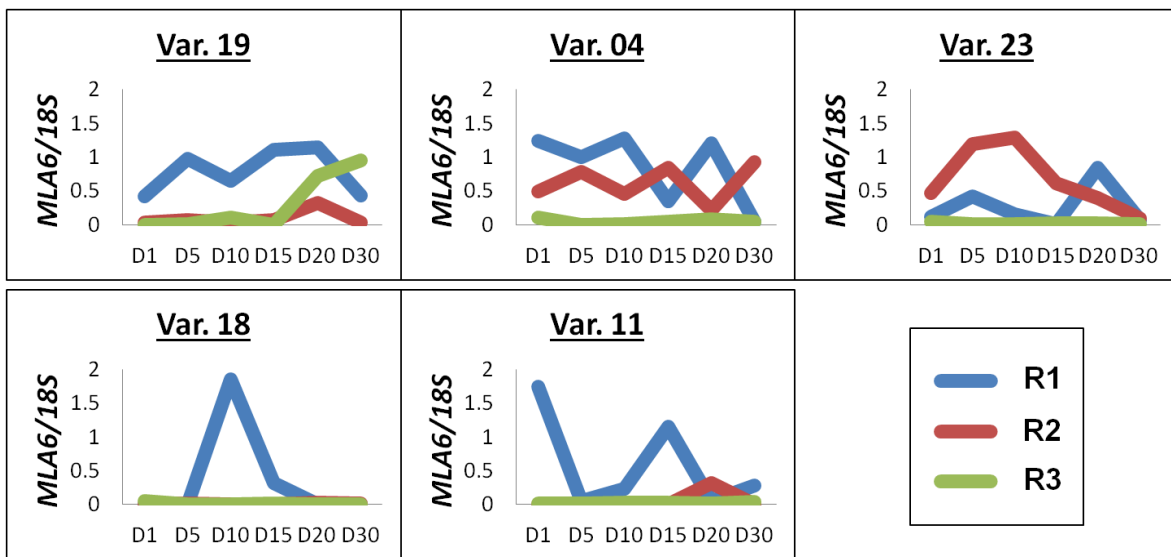


Fig. 35. Cinéticas de expresión para los transcritos de *MLA6* en las 5 variedades de cebada y 3 réplicas biológicas. En azul se representa la primera réplica biológica, en rojo la segunda y en verde la tercera. En esta figura, la cinética de la réplica dos (R2) en rojo para la variedad 18 no se observa porque está detrás de la línea verde de la réplica tres (R3). Para ambas la cinética de transcripción es casi nula.

El comportamiento de los transcritos de *MLA6* se parece al observado para *MLA1* y *MLA1-2*. De hecho los tres genes de MLAs por variedad y en una misma réplica biológica muestran cinéticas similares. *MLA6* muestra en la réplica uno (R1) de

color azul, una transcripción constitutiva para las variedades 19 y 04 y picos esporádicos en las otras tres variedades. En la réplica dos (R2), la variedad 23 y la 04 parecen presentar mayor actividad de transcripción, en cambio 19, 18 y 11 apenas y son visibles. En la réplica tres (R3) por su parte, sólo la variedad 19 parece transcribir a *MLA6* (fig.35).

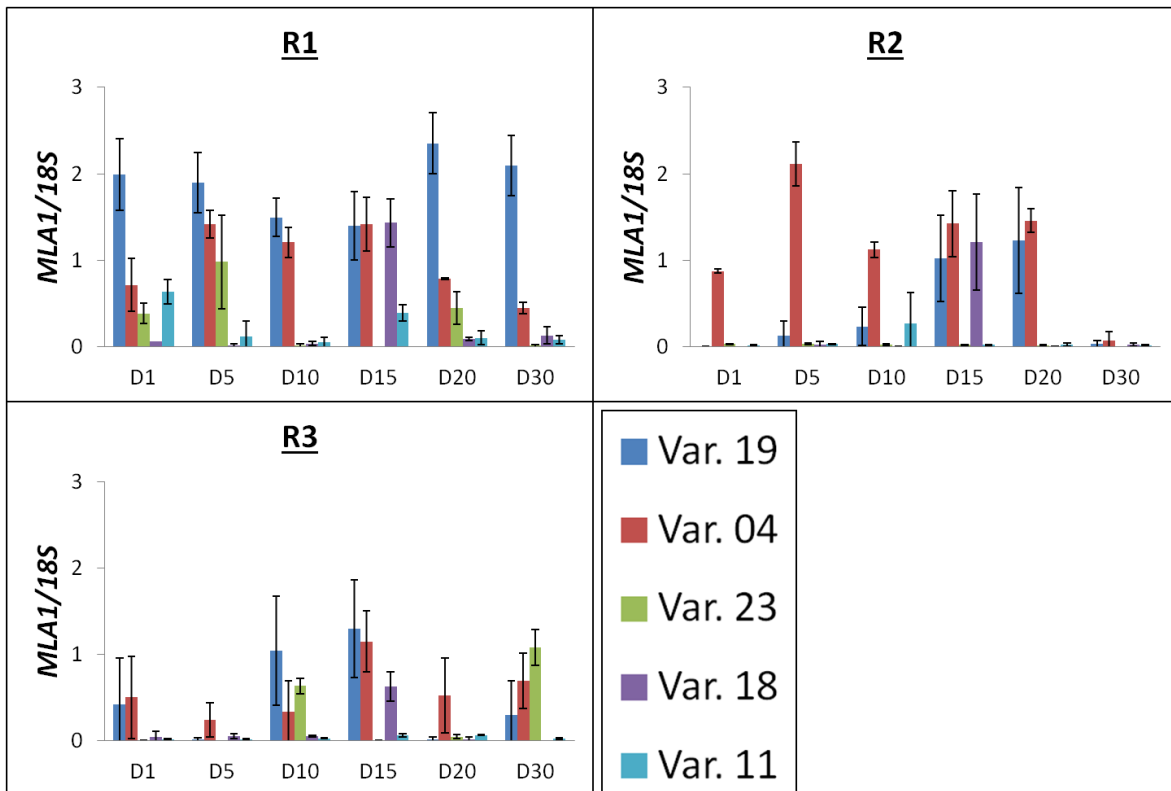


Fig. 36. Cinéticas de acumulación de transcritos de *MLA1* incluyendo a las cinco variedades por réplica biológica. En estas gráficas se muestra graficado el promedio de las réplicas técnicas y su desviación estándar por variedad en cada cosecha o réplica biológica. En azul oscuro se observa la variedad 19, en rojo la variedad 04, en verde la variedad 23, en morado la variedad 18 y en azul claro la variedad 11.

En las figuras 36, 37 y 38 se puede ver que en la primera réplica la intensidad de los picos para las variedades 04 y 19 (en color rojo y azul fuerte) es mucho más grande en comparación a las otras variedades y mucho más notoria.

Esto mismo se repite para los genes *MLA1-2* (fig.37) y *MLA6* (fig.38), donde la variedad 23 adquiere un poco de protagonismo en la segunda réplica para *MLA1-2* y *MLA6*. La variedad 18 por su parte, parece ser la que menos transcribe estos genes en las tres réplicas, con apariciones esporádicas de picos únicos a lo largo del tiempo de estudio. La variedad 11 intenta sobresalir en la primera réplica principalmente para los genes *MLA1-2* y *MLA6*, transcribiendo muy poco a *MLA1*.

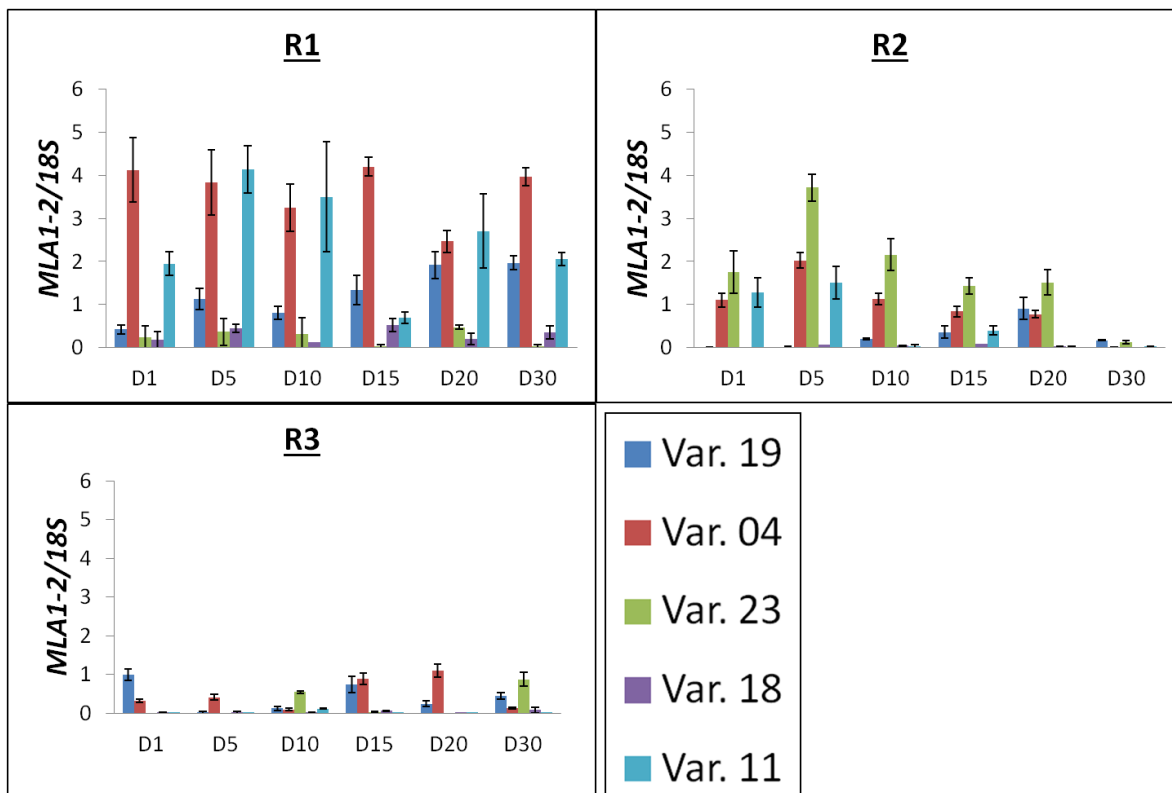


Fig. 37. Cinéticas de acumulación de transcritos de *MLA1-2* incluyendo a las cinco variedades por réplica biológica. En estas gráficas se muestra graficado el promedio de las réplicas técnicas y su desviación estándar por variedad en cada cosecha o réplica biológica. En azul oscuro se observa la variedad 19, en rojo la variedad 04, en verde la variedad 23, en morado la variedad 18 y en azul claro la variedad 11.

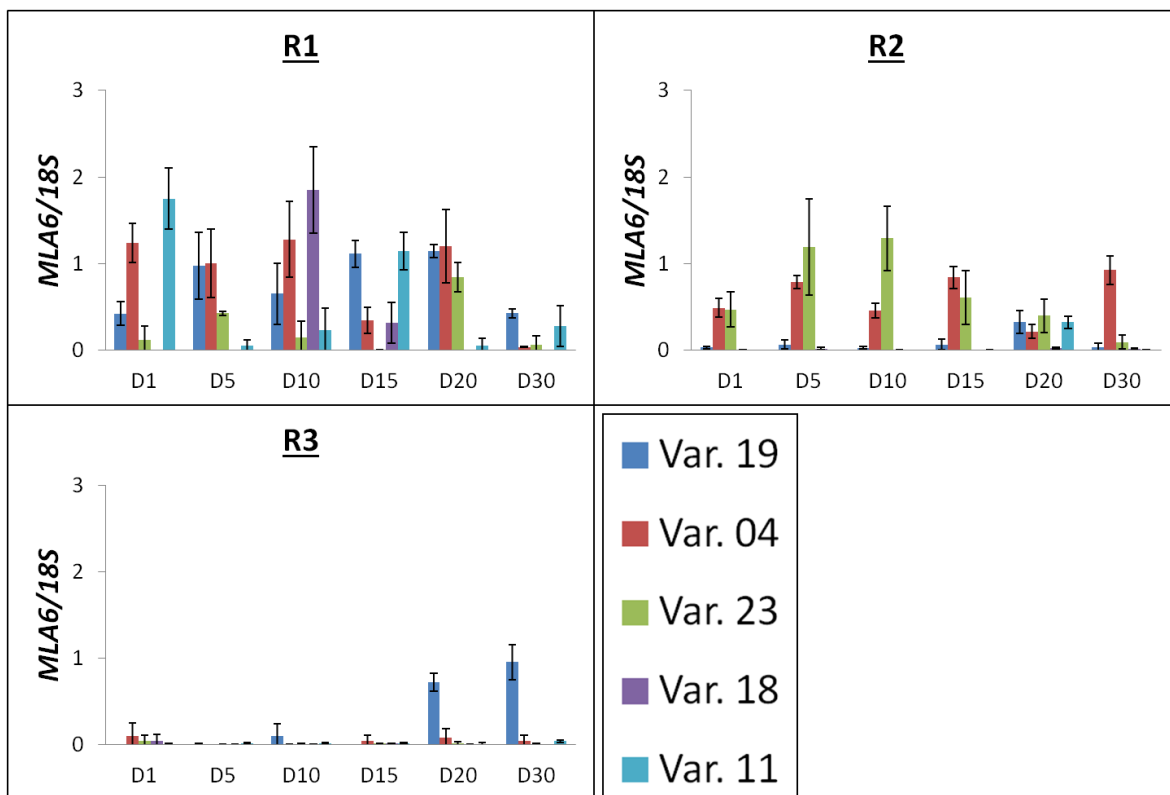
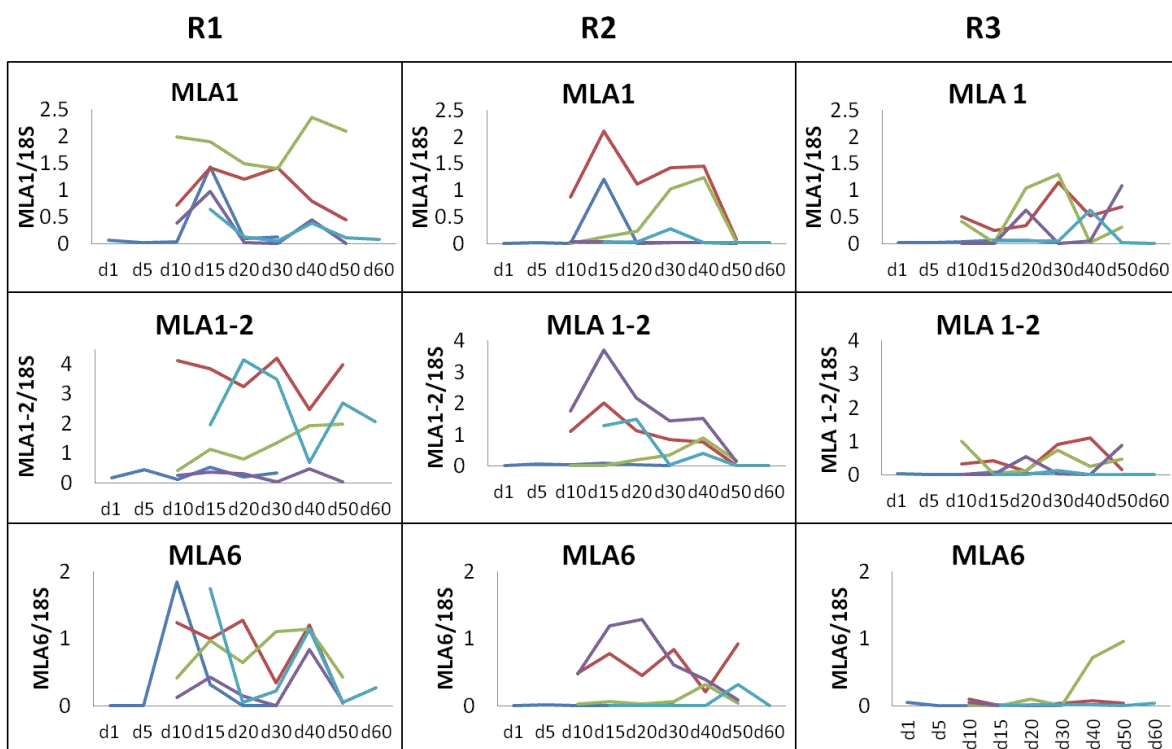


Fig. 38. Cinéticas de acumulación de transcritos de *MLA6* incluyendo a las cinco variedades por réplica biológica. En estas gráficas se muestra graficado el promedio de las réplicas técnicas y su desviación estándar por variedad en cada cosecha o réplica biológica. En azul oscuro se observa la variedad 19, en rojo la variedad 04, en verde la variedad 23, en morado la variedad 18 y en azul claro la variedad 11.

Tomando en cuenta los resultados anteriores para las tres MLAs y dada su función biológica de proteínas de respuesta a patógenos, se decidió proponer otra forma de representar sus cinéticas, ya que esta parece estar ligada al ambiente en el que crece la planta. Las diferentes variedades, como se mencionó en la parte de metodología, tienen diferentes tiempos de espigamiento. Algunas variedades espigan antes, como la variedad 18, que es más precoz y otras tienen un retraso en el espigamiento de días, como es la variedad 11. Las espigas recolectadas para hacer estos experimentos se cuentan desde el día 1 o día en el que la espiga de la planta empieza a abrir. Este tiempo a pesar de tomarse de forma igual en cuanto a características fisiológicas de la espiga, correspondían a días diferentes en el calendario, y por lo mismo, no correspondían exactamente a las mismas

condiciones ambientales por día. A modo de ejemplo, si las plantas se enfrentan a una infección por patógeno el 20 de marzo, todas responderán al estímulo, sin embargo, este día representará el día 15 para la variedad 18, el día 10 para las variedades 19, 04 y 23 y día 5 para la variedad 11. Por tanto, no se podrían observar correlaciones entre las cinéticas de expresión de *MLAs* entre las variedades ya que sus picos corresponderían a diferentes etapas de desarrollo en las gráficas, a pesar de que el estímulo externo ocurrió al mismo tiempo. Por lo tanto, se propuso el siguiente cambio en la representación de datos. Considerando que la variedad 18 es la primera que espiga, el día 5 para la variedad 18, sería el día 1 para la variedad 04; el día 10 de la variedad 18 sería el día 5 para las variedades 04,19 y 23; el día 15 para la variedad 18 sería el día 10 para las variedades 04,19 y 23 y el día 1 para la variedad 11, que espiga dos semanas después de la 18. Realizando estos cambios obtenemos las gráficas de la figura 39.



■ Var. 18 ■ Var. 04 ■ Var. 19 ■ Var. 23 ■ Var. 11

Fig. 39. Cinéticas de acumulación de transcritos para *MLA1*, *MLA1-2* y *MLA6* incluyendo a las cinco variedades por réplica biológica. En estas gráficas se muestra la cinética de acumulación por días de calendario o estímulo ambiental por variedad en cada cosecha o réplica biológica. En azul oscuro se observa la variedad 19, en rojo la variedad 04, en verde la variedad 23, en morado la variedad 18 y en azul claro la variedad 11. Abajo están representados los días tomados para hacer esta gráfica. Datos monitoreados durante los dos meses de recolección de muestras, debido al tiempo de retraso de las variedades.

Representados los datos de esta forma, nos pueden dar más información sobre las cinéticas de las MLAs. Se puede notar que la cinética de *MLA1*, *MLA1-2* y *MLA6* correlacionan en cuanto a tendencias por réplica, pero no entre réplicas. Se puede notar además que en comparación al control *18S*, *MLA6* es la que menos parece transcribirse en las tres réplicas y en todas las variedades, la escala de sus gráficas es mucho menor en comparación a las de *MLA1* y *MLA1-2*. La R3 (ver tercera columna de fig. 39) es la que presentó una cinética de transcripción menos activa, en todas sus variedades. Se puede ver que los transcritos para todas las MLAs de la variedad 04 (en rojo) son de los más abundantes en cada una de las gráficas. Es claro que existe una correlación y similitud de comportamiento de MLAs en una misma variedad en una misma réplica a pesar de que los niveles de transcritos son diferentes.

10. Discusión de resultados.

10.1 Expresión de PDI.

La PDI se encuentra estrechamente relacionada con el llenado de grano en cereales (Shewry P.R., 1995) ya que participa en la acumulación de proteínas de reserva. Es por ello que su acumulación normalmente precede a la correspondiente acumulación de las proteínas de reserva. En nuestro análisis es interesante observar que la tercera réplica, fue expuesta más temprano a la solución nutritiva con el objeto de mejorar el crecimiento de las plantas, ya que en la segunda réplica hubo que recurrir a su uso porque había problemas con el crecimiento de las plantas. Esta solución contiene entre otros ingredientes, nitrógeno. Con mayor abundancia de nitrógeno en el suelo aumenta el metabolismo del nitrógeno y por lo tanto la producción de aminoácidos y proteínas. Aunque los niveles de transcritos de PDI en la tercer generación no fueron mucho más altos, se presentó un incremento de estos a un tiempo más temprano que en las dos réplicas anteriores. Esto sugiere que bajo esta condición las plantas empiezan a almacenar proteínas desde una edad más temprana. Sería interesante ver si hay diferencias en el contenido proteico entre las semillas maduras de las tres réplicas. Las variedades 19 y 18 son las que presentan un comportamiento más parecido, a este grupo podría unirse la variedad 23 si no fuera por el brusco incremento de transcritos al día 30 en la primera réplica que cambia la escala de la gráfica. Comparándolo con las otras dos réplicas no puede decirse que su incremento sea tan radical, sin embargo si es notable la diferencia con respecto al mismo día en las otras variedades. Esto puede indicar que la variedad 23 presenta una acumulación diferencial de PDI con respecto al tiempo de maduración independientemente de las condiciones de temperatura y nutrimentos. La variedad 04 parece ser constante en sus transcritos de PDI durante todo el llenado de semilla, dónde aún en la última generación no se ve un pico tan llamativo los primeros días y luego decrece, como en la mayoría. La variedad 11 parece acumular transcritos de PDI desde un tiempo más temprano en todas las réplicas. Otro factor llamativo, mencionado en artículos como responsable del cambio de la cantidad de transcritos para PDI es la temperatura. Se reporta que si las plántulas se exponen a una mayor temperatura antes de los

14 días después de la floración (DAF) se reduce la transcripción de la PDI, pero empieza a transcribirse más si se aplica calor después de los 14 DAF, debido a que la PDI interacciona con la proteína de choque térmico HSP70. Podríamos pensar que las diferencias en el lugar de cultivo y la época del año tendrían efecto sobre ellos, pero las primeras dos réplicas son las que mayor parecido conservan, cuyas condiciones de temperatura difirieron más que entre la R2 y R3. Por lo tanto, podemos inferir que para las variedades analizadas en este trabajo, las condiciones de nutrimentos en el suelo influyeron más que la variación en la temperatura sobre la cinética de expresión de *PDI*. Por otro lado, la R3 es la generación que más coincide con reportes en la literatura con otras variedades de cebada, dónde observan un pico al día 10 DAF con un posterior declive de la transcripción de mensajeros (Kim, J. Y. Seo, Y. W., 2008, Mogelsvang S., 1998). Sin embargo, hay que señalar que las condiciones del suelo en campo no son iguales a las de invernadero, ya que muchas veces en campo fertilizan los suelos para incrementar el rendimiento de las cosechas.

Además de la influencia del medio ambiente, en este estudio fue posible observar el impacto de un factor genético en la expresión de PDI. Las variedades 19 y 23 presentaron un pico de acumulación de transcritos más tardío que las demás variedades independientemente de la réplica biológica. Dada la estrecha relación entre la expresión de PDI y la acumulación de proteínas de reserva, en particular de prolaminas (Hordeínas para la cebada), esta observación podría interpretarse como mayor acumulación de proteínas en las semillas maduras de estas variedades. Hasta aquí podríamos decir que aunque la transcripción de PDI es dependiente del ambiente, existen características particulares de su cinética de expresión que dependen de cada variedad (factor genético).

10.2 Expresión de GAD1.

GAD1 es una enzima que cataliza la descarboxilación de glutamato convirtiéndolo en GABA. GABA a su vez se puede incorporar al ciclo de los ácidos tricarbónicos, para generar nuevos aminoácidos, generalmente destinados a proteínas de almacenamiento. GAD1 y GABA están muy relacionados con el metabolismo del

nitrógeno y se ven muy influenciados por su presencia o ausencia. Es por eso que en el presente trabajo fue interesante notar como en la primera réplica o R1 apenas hay un aumento de la transcripción de *GAD1* en los últimos días y sólo en algunas variedades, mientras que la segunda réplica se notó un cambio en su expresión a partir del día 10 o 15, coincidiendo con el comienzo de la aplicación de nitrógeno a través de la solución nutritiva. Consistente con este comportamiento, en la tercera generación se observó un aumento de la transcripción de *GAD1* mucho más temprano y mucho más uniforme a lo largo de los días de desarrollo. El comportamiento de la variedad 19 sustenta claramente la hipótesis de que la solución nutritiva puede estar modificando la cantidad y tiempo de expresión de los transcritos de *GAD1*.

En la réplica tres destaca el comportamiento de la variedad 23, que presenta un aumento importante de *GAD1* en los últimos días analizados, cuando fisiológicamente la semilla empieza a secarse y llegar a la madurez. Esto correlaciona con la identificación de la proteína *GAD1* únicamente en la semilla seca de la variedad 23 en el trabajo previo (Herrera-Díaz et al., en preparación). Hipotéticamente, una variedad de cebada que mantiene menores niveles de RNA mensajero de *GAD1* podría ser candidata para acumular menos proteínas a pesar de su ambiente. Sin embargo, esto tendría que ser probado por el análisis de los niveles de proteínas durante el desarrollo de la semilla.

Existen reportes que indican que los niveles de proteínas en semillas son mucho más variables temporada con temporada y año con año. Es decir dependen mucho del ambiente y de algunos factores genéticos. De hecho, a pesar de que se recomienda mucho hacer rotación de cultivos, se sugiere no sembrar cebada en campos previamente cultivados con legumbres como chícharos u otras leguminosas que aumentan los niveles de nitrógeno en el suelo (Turkington, T.K., 2012).

Nuestro análisis indica que *GAD1* comienza a transcribirse a partir del inicio de maduración de la semilla y se mantiene o incluso puede seguir aumentando hasta

el último día de toma de muestra (D30) dependiendo sus niveles de la presencia de nitrógeno en el suelo. Específicamente en la réplica 3, en las cinco variedades se observa una correlación entre la presencia de solución nutritiva desde edades tempranas de la planta y la transcripción prematura de *GAD1*.

La presencia de la enzima *GAD1* implica una desviación de la vía del glutamato hacia producción de GABA y el ciclo de ácidos tricarbóxicos. Ya se mencionó en la introducción que se ha visto la activación de estas vías al darse la acumulación de las proteínas de reserva. La variedad 04 presenta un comportamiento ligeramente diferente al presentar una transcripción mucho más constante, de principio o fin, sin mostrar picos llamativos a ciertos días.

Fisiológicamente, en la semilla primero ocurre una acumulación de *PDI* que procesa las proteínas de almacenamiento y posteriormente una acumulación en estas a los días más avanzados en la maduración de la semilla. Esto correlaciona hasta cierto punto con la cinética de *GAD1*, donde los transcritos de *PDI* generalmente se expresan un poco antes que los de *GAD1* o al mismo tiempo, denotando que primero se necesita utilizar *PDI* para todas las proteínas nuevas que se sintetizan y después *GAD1* relacionado al almacenamiento de estas.

10.3 Expresión de *MLA1*, *MLA1-2* y *MLA6*.

Para discutir el comportamiento de los transcritos de *MLAs*, es necesario contextualizarlas con su función en el ambiente. Estas son proteínas señalizadoras que en presencia de una infección disparan una cascada de señales para la defensa. Por lo mismo, su expresión no debería depender de la edad fisiológica de la semilla, sino de los estímulos externos que monitorean.

En este caso, es muy importante hacer un reajuste en los datos obtenidos, ya que los días mostrados son días a partir de que se abre la espiga. Si tomamos en cuenta el hecho de que no todas las variedades espigan al mismo tiempo, sino

que unas son precoces y otras se atrasan, es necesario tomar en cuenta esos días de retraso para reconstruir la historia de los estímulos que se percibieron.

En la figura 39 de resultados puede observarse que de forma general, en las plantas hay más transcritos de *MLA1* y *MLA1-2* que de *MLA6*.

Para funcionar, *MLA6* requiere a *RAR1*, proteína de unión a Zinc, y la subunidad *SGT1* del complejo ubiquinina ligasa *SCF*. Por el contrario *MLA1* no parece usar la vía *RAR1-SGT1*, a pesar de que comparte 92. 2% de similitud con *MLA6* y las interacciones *MLA-Bgh* hoesped-patógeno son indistinguibles. En cebada hay aproximadamente 30 variantes de *MLAs* que confieren la especificidad gen por gen al hongo de la roya amarilla *Blumeria (=Erysiphe) graminis* f. sp. hordei (Jørgensen J.H., 1994). Muchos de estos, incluyendo a *Mla1*, *Mla6* y *Mla 13* confieren el fenotipo de respuesta rápida, mientras que otros, como *Mla7* y *Mla14* confieren una resistencia retardada y una defensa moderada. (Wei F. et al., 1999; Wise R.P. y Ellingboe A.H., 1983).

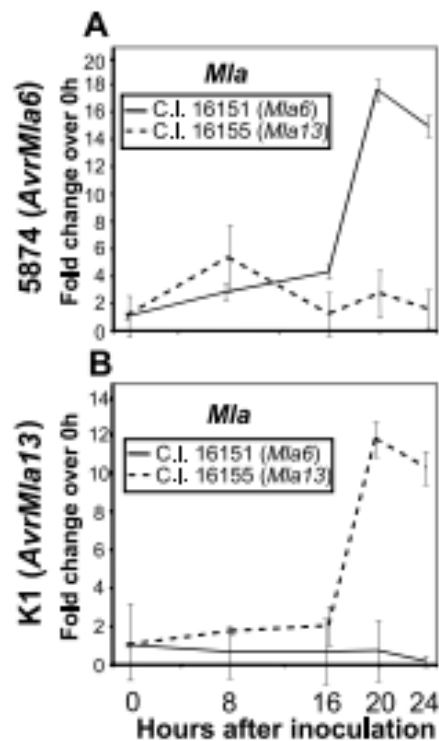


Fig. 40. En las gráficas se muestra que un aumento en la cantidad de transcritos del nivel basal, se relaciona con una infección donde las proteínas R son capaces de

reconocer el Avr del patógeno. Si el MLA reconoce su Avr específico su transcripción basal aumenta.

Algunos reportes han establecido que estos genes se transcriben a un nivel basal en plantas saludables (Ayliffe M.A. et al., 1999; Wang Z.X. et al., 1999; Shen K.A. et al., 2002), y la mayoría de estos estudios concluyeron que la transcripción de los mismos era constitutiva.

Sobre las MLAs estudiadas es prudente decir que MLA1-2 es un homólogo de MLA1, sin embargo, tiene menos porcentaje de identidad con este (85%), que MLA1 con MLA6 (92.2%). También hay que hacer hincapié en que estas proteínas se encuentran más abundantes en hoja que en semilla y es ahí donde generalmente se les ha estudiado, siendo el tejido principalmente infectado por el hongo. También, los estudios para relacionar transcritos de estas proteínas con infecciones se siguen por periodos de horas después de la infección, ya que como antes se mencionó, las MLAs estudiadas son de respuesta rápida. Como aquí se estudiaron durante días y en un invernadero, los cambios no se pueden relacionar a una infección estudiada como tal.

Existen concordancias en una variedad en su patrón de expresión de MLAs, pero en cada réplica, no concuerdan entre réplicas y esto es porque los estímulos que reciben las plantas en cada siembra son diferentes. Esto nos indica que las MLAs son genes cuya transcripción es muy influenciada por estímulos externos. A pesar de eso, se notó una característica interesante en las variedades 19 y especialmente la 04. Estas mostraron expresión constitutiva de los transcritos de las tres MLAs, aunque con mayores niveles en la primera réplica. Puede que esto se deba a su crecimiento en invernadero, donde las plantas no se encuentran expuestas a patógenos como en campo. Podemos decir que bajo las condiciones que fueron crecidas, estas dos variedades expresaron transcritos de MLA1, MLA1-2 y MLA6 más constantemente que las variedades 18, 11 y 23. Estas últimas expresaron transcritos de forma esporádica, es decir, sólo algunos días, a pesar de contar con picos altos de transcripción en algunos tiempos específicos. Por otro

lado es muy interesante notar que en la primera generación, las semillas utilizadas en la siembra fueron de una cosecha en campo diferente a las utilizadas en las otras dos réplicas, por lo que es posible que durante el crecimiento de las plantas exista una “memoria de desarrollo y ambiente” de las semillas originales como causa del comportamiento de las variedades 04 y 19 en esta réplica en particular. Cabe mencionar que fue en estas dos variedades donde se identificaron las MLAs en el análisis proteómico de estas mismas semillas que fueron utilizadas para la siembra de R1.

Con los resultados obtenidos hasta el momento es difícil discernir si la expresión de MLAs en las variedades analizadas puede ser una característica variedad-dependiente (factor genético) o memoria-dependiente (factor epigenético). Es interesante mencionar, que hablando de hábitos del patógeno en campo, suele atacar los cultivos en meses invernales como Diciembre debido a las condiciones de temperatura y humedad, en cambio ataca menos los cultivos en verano cuando la temperatura es mayor. Puede que esto explique la disminución de la expresión en las diferentes réplicas biológicas, ya que las plantas pueden detectar la época del año por el Sol y la longitud de los días.

Una perspectiva sería estudiar a las variedades 19 y 04 bajo estímulos de patógenos. Sería idóneo haber visto la expresión de los transcritos bajo estímulos de inoculación de patógenos controlados. El presente trabajo nos brinda pistas de que la transcripción de las MLAs es diferencial entre las variedades, y aunque es mayoritariamente influenciada por el ambiente, más allá del estímulo ambiental las variedades 19 y 04 podrían ser candidatas a mayor expresión de MLAs y por ende mayor resistencia a patógenos.

11. Conclusiones

- Los transcritos de PDI tienen potencial de ser un marcador molecular, ya que hay diferencias notables de expresión en las variedades 11 y 23 con respecto a las variedades 18, 19 y 04. La variedad 23 tiene la tendencia de aumentar al día 30 y la variedad 11 empieza a transcribir PDI desde tiempos más tempranos en todas las réplicas. Sería recomendable ver si a nivel de proteína estos cambios son más marcados. La transcripción de los RNA mensajeros para todas las variedades aumenta a tiempos más tempranos de maduración de la semilla en presencia de nutrimentos extra en el suelo.
- GAD1 se propone como marcador molecular a nivel de transcritos para la variedad 23, ya que sólo esta variedad presenta aumento de transcritos de GAD1 al día 30. Esto es muy notorio en la primera réplica, donde no fueron expuestos a solución nutritiva. Con solución nutritiva los niveles de transcritos aumentan en todas las variedades y se expresan a días más tempranos, sin embargo la característica expresión de la variedad 23 se conserva durante las tres réplicas biológicas y diferentes condiciones ambientales, haciéndolo un buen marcador molecular.
- MLA1, MLA1-2 y MLA6 se transcriben en mayor o menor cantidad dependiendo del ambiente, por lo que difícilmente serían marcadores moleculares confiables. Las variedades 19 y 04 transcriben constitutivamente estos genes, en mayor o menor cantidad, en comparación con las variedades 23, 18 y 11, que presentan picos de acumulación esporádicos a lo largo de los días de muestreo. La presencia de transcritos varió a lo largo de las tres generaciones, probablemente debido al periodo del año en el que fueron cultivadas y su incidencia de infección en campo en diferentes épocas anuales.

12. Perspectivas

- Con respecto a PDI, los cebadores utilizados abarcaban solamente 4 de las 7 isoformas para PDI 1.1. Podrían diseñarse cebadores específicos para cada isoforma y otras PDI recientemente reportadas en cebada (Yan Y., 2014) así como hacer anticuerpos para poder detectar a cada isoforma y tipo de PDI en las variedades mexicanas estudiadas. Esto nos permitiría ver si hay diferencias en las PDI que se utilizan por cada variedad y que esto influya en los tiempos de acumulación de transcritos de las mismas y en la cantidad de proteínas acumuladas, ya que PDI está estrechamente relacionada con el proceso de acumulación de proteínas.
- Realizar experimentos para evaluar la acumulación de GAD1 en ambientes más nitrogenados de manera controlada para las 5 variedades de cebada mexicana. Es recomendable evaluar la cantidad de proteínas totales acumuladas en semillas secas de cebada en presencia de diferentes concentraciones de solución nutritiva, ya que esto puede influenciar mucho la acumulación de proteínas, probablemente más en algunas variedades que en otras.
- Para las MLAs es interesante retar a las plantas con un estímulo de patógeno de la roya y ver como es que los transcritos de estas variedades se modifican. También sería interesante secuenciar las MLAs de cada variedad, para ver si la resistencia de alguna está relacionada a cambios en sus genes o polimorfismos simples de nucleótido (SNPs).

13. Bibliografía.

1. Abdul-Baki A.A. et al (1972) Relationship Between Decarboxylation of Glutamic Acid and Vigor in Soybean Seed, *Crop Science*, Vol. 13. pp. 227-232.
2. Asai T. et al (2002) MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. Vol 415. pp. 977-983.
3. Ayliffe MA, Frost DV, Finnegan EJ, Lawrence GJ, Anderson PA, Ellis JG (1999) Analysis of alternative transcripts of the flax L6 rust resistance gene. *Plant Journal* 17 pp.287–292
4. Barnett J.A., Payne RW, Yarrow D.(2000). Yeasts: Characteristics and Identification. 3rd edn. Cambridge University Press: Cambridge.
5. Barnett, J.A. (2001). A history of research on yeasts. *Yeast (John Wiley & Sons, Ltd.)*18: pp. 363-388.
6. Badr, A. et al, (2000) On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* 17:499-510.
7. Borovkova I. G, Steffenson B.J. et al.(1995) Identification of Molecular Markers Linked to the Stem Rust Resistance Gene rpg4 in Barley. Vol. 85, No. 2. *The American Phytopathological Society*.
8. Bouché N. et al (2004) GABA in plants: just a metabolite? *TRENDS in Plant Science*, Vol. 9. No. 3. pp. 1360-1385.
9. Burger W.C. and Laberge D.E.,(1985) Malting and Brewing Quality in Barley, D.C. Rasmusson, Ed. (*American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin*, pp. 367-401.
10. Butcher D. A.(1989). Ale & beer: a curious history. *McClelland & Stewart*: pp. 10.
11. Caldo R.A. et al (2004) Interaction - Dependent Gene Expression in Mla – Specified Response to Barley Powdery Mildew. *The Plant Cell*, Vol. 16. pp. 2514-2528.

12. Crick, F. (1970): Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, pp.561-563.
13. Eblinger H.M.,(2009) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp.779.
14. Fait, A. et al (2007) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Cell Press*. pp. 1360- 1385.
15. Flor, H.H. (1947) Host – parasite interactions in flax rust, Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: pp.680-685.
16. García-Pineda E. (2004), Genes de Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 22. Núm. 3. pp. 414-422.
17. García Ruiz, J. L. (2003). LID. ed. Cervezas Mahou 1890-1998, un siglo de tradición e innovación. Constanza Laguna Roldán (Primera edición). Madrid.
18. Griffiths, J.F. A. et al. (2002). Genética. McGraw-Hill Interamericana.
19. Homan, M.M., (2004) Beer and Its Drinkers: An Ancient near Eastern Love Story. *Near Eastern Archaeology*, Vol. 67, No. 2, pp. 84 -95.
20. Hornsey, I.S., (2003). A history of beer and brewing. *Royal Society of Chemistry paperbacks*, pp.742.
21. Hurkman W. J. et al (1998) BiP, HSP70, NDK and PDI in wheat endosperm. I. Accumulation of mRNA and protein during grain development. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 103: pp.70 – 79.
22. Jones J.D.G., et al (2006) The plant immune system. *Nature*. Vol. 444, pp. 323-329.
23. Jørgensen, J.H. (1994). Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Revista Plant Science* Vol. 13, pp.97–119.
24. Kim J. et al. (1997) Protein Disulfide Isomerase as a Regulator of Chloroplast Translational Activation. *Science*, Vol. 278, No. 5345, pp. 1954-1957.

25. Kim, J. Y. Seo, Y. W. (2008) Molecular Characterization of a cDNA Encoding Disulfide Isomerase during Barley Kernel Development. *Russian Journal of Plant Physiology*. Vol. 55, No. 5. pp. 676-686.
26. Kim J. Y. et al (2012) Protein Disulfide Isomerase-Like Protein 1-1 Controls Endosperm Development through Regulation of the Amount and Composition of Seed Proteins in Rice. *PLOS ONE*. Vol. 7, No. 9.
27. Kumamaru, T. (2007) Protein Body Biogenesis in Cereal Endosperms, *Plant Cell*.
28. Komatsuda, T. et al (2004) High-density AFLP map of non brittle rachis 1 (btr1) and 2 (btr2) genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 109, No. 5.
29. Komatsuda, T. et al (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.104, pp. 41424-41429.
30. Legge, W. G., Metcalfe, D. R., Haber, S., Harder, D. E., Noll, J. S., Tekauz, A. and Thomas, P. L. (2003). AC Metcalfe barley. *Journal of Plant Science*. 83 pp.381–384.
31. Libkind, D. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108 (35): pp. 14539-14544.
32. McCarthy B.J. and Holland J.J. (1965). Denatured DNA as a Direct Template for *in vitro* Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 54 (3): pp. 880–886.
33. Møgelvang, S. (1998) Changes in the levels of seven proteins involved in polypeptide folding and transport during endosperm development of two barley genotypes differing in storage protein localization, *Plant Molecular Biology* 36: pp.541-552.
34. Mohan M. et al (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* Vol. 3 pp.87-103.
35. Moir, M. (2000). Hops: A millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (4): pp. 131-146.

36. Monza J., et al. (2004) Metabolismo del nitrógeno en las plantas. Editorial Almuzara.
37. Morrell, P.L. y Clegg, M. T. (2007) Genetic evidence for a second domestication of barley (*Hordeum vulgare*) east of the Fertile Crescent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 104, no. 9 pp. 3289-3294
38. Nelson M. (2012). Barbarian's Beverage (Tercera edición). Nueva York.
39. Prescott A., Martin C. (1987) A rapid method for the quantitative assessment of levels of specific mRNAs in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 4. No. 4. pp. 219 – 224.
40. Sang, T. (2009) Genes and Mutations Underlying Domestication Transitions in Grasses. *Plant Physiology* 149. pp. 63-70
41. Shelp B.J. et al (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science*. Vol. 4, No. 11. pp. 446- 452.
42. Schlötterer C. (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 5, pp. 63-69.
43. Schulze-Lefert P., Shirasu K. (2004) RAR1 Positively Controls Steady State Levels of Barley MLA Resistance Proteins and Enables Sufficient MLA 6 Accumulation for Effective Resistance. *The Plant Cell*, Vol. 16. pp.3480-3495.
44. Schulze-Lefert P., Shen Qian-Hua,(2007) Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *The EMBO Journal* Vol. 26. No. 20. pp.4293-4301.
45. Schulze-Lefert P., et al. (2007) Nuclear Activity of MLA Immune Receptors Links Isolate-Specific and Basal Disease-Resistance Responses. *Science*. Vol. 315. February, 2007. Pages: 1098-1103.
46. Schulze-Lefert P., et al. (2010), WRKY transcription factors. *Trends in plant science*. Vol. 15. No. 5. pp. 247- 258.
47. Schulze-Lefert P., et al. (2013) Barley MLA Immune Receptors Directly Interfere with Antagonistically Acting Transcription Factors to Initiate Disease Resistance Signaling. *The Plant Cell*, Vol. 25. No. 3. pp. 1158- 1173.

48. Schwarz P.B. and Horsley R.D.,(1995) Malt Quality Improvement in North American Six-Rowed Barley Cultivars Since 1910. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53 (1), pp. 14-18.
49. Shen KA, Chin DB, Arroyo-Garcia R, Ochoa OE, Lavelle DO, Wroblewski T, Meyers BC, Michelmore RW (2002) Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: pp.251–261
50. Shewry P.R. et al (1995) Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, Vol. 7, pp.945-956.
51. Sigsworth, E. M. (1965). Science and the Brewing Industry, 1850-1900. *The Economic History Review* 17 (3): pp. 536-550.
52. Solano, H.S., Zamora, D.M.R., Gámez, V.F.P., García , R. J.J., Gámez, V.A.J., (2006) Informe anual del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias).
53. Tanno, K. y Willcox, G. (2006) How Fast Was Wild Wheat Domesticated? *Science: Vol. 311. No. 5769, pp.1886*
54. Trevaskis, B. et al (2007) The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends in Plant Science, Volume 12, Issue 8, pp. 352-357.*
55. Turano, F.J., Fang, T.K. (1998) Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from Arabidopsis, *Plant Physiol.* 117, 1411-1421.
56. Turkington T.K. et al. (2012) Effect of crop residue, nitrogen rate and fungicide application on malting barley productivity, quality, and foliar disease severity. *Journal of Plant Science* Vol. 92 pp.577-588
57. Ueno Hiroshi (2000) Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10 pp.67-79.
58. Verzele, M. (1986). Centenary review. 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. *Journal of the Institute of Brewing* 92 (1): pp. 32-48.
59. Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999) The Pib gene for rice blast resistance belongs

to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant Journal*, Vol 19 pp.55–64.

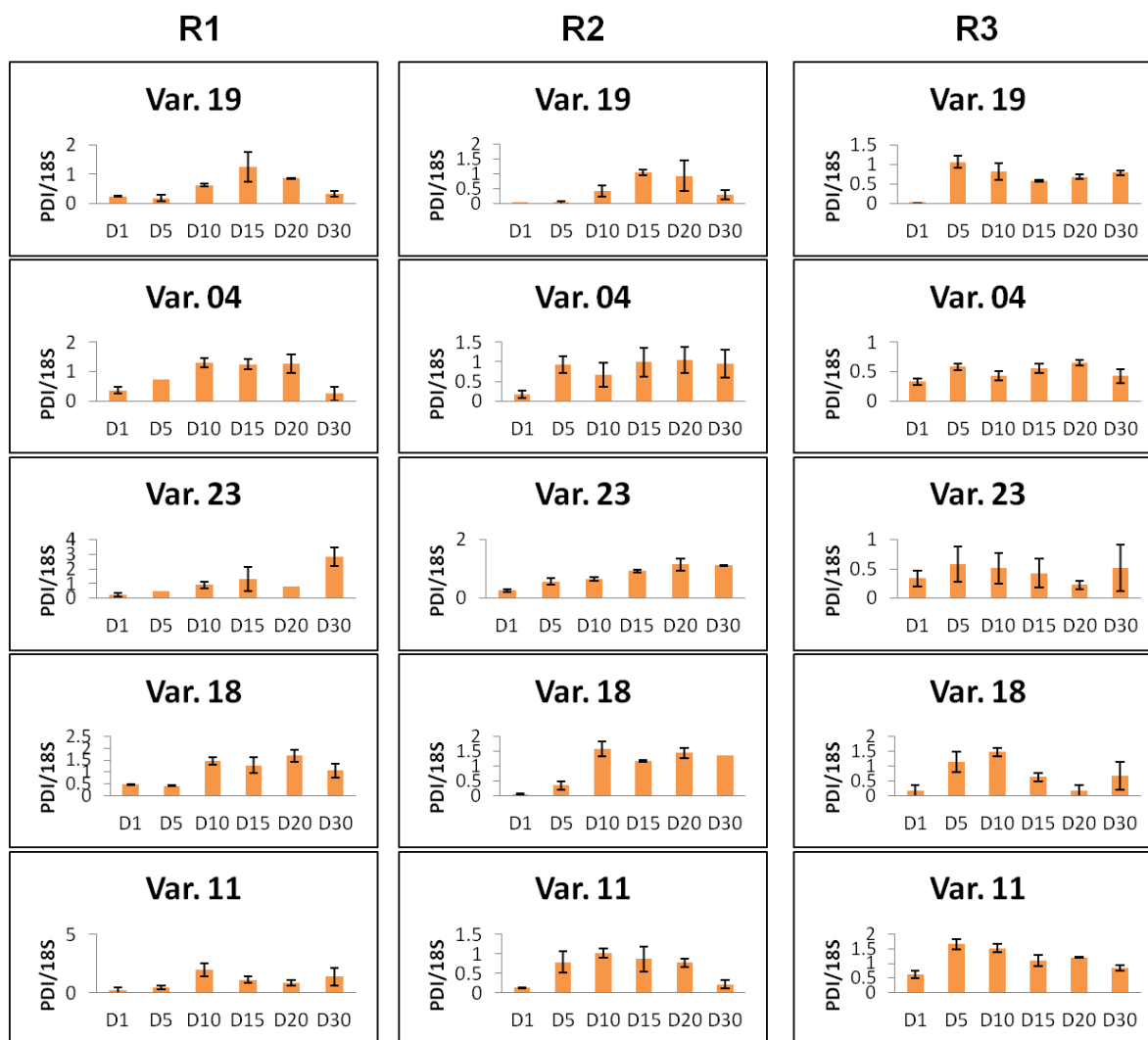
60. Wei, F., Gobelman-Werner, K., Morroll, S.M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Schulze-Lefert, P., and Wise, R.P. (1999). The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* Vol.153, pp.1929–1948.
61. Weiss, E. et al (2004) The broad spectrum revisited: Evidence from plants remains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 26, pp. 9551-9555.
62. Willcox, G. (2004) Measuring grain size and identifying Near Eastern cereal domestication: evidence from the Euphrates Valley. *Journal of Archaeological Science*, Volume 31, Issue 2, pp.145-150.
63. Wilson G.R. (1998). The Dynamics of the International Brewing Industry Since 1800 (Primera edición). Routledge (History). Ed.
64. Wise, R.P., and Ellingboe, A.H. (1983). Infection kinetics of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* on barley with different alleles at the *Mla* locus. *Phytopathology* 73, pp. 1220–1222.
65. Yan Y., Zhu C. et al,(2014) Molecular Characterization and Expression Profiling of the Protein Disulfide Isomerase Gene Family in *Brachypodium distachyon* L., *PLoS ONE*, 9(4): e94704

14.ANEXOS

Anexo 1. Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

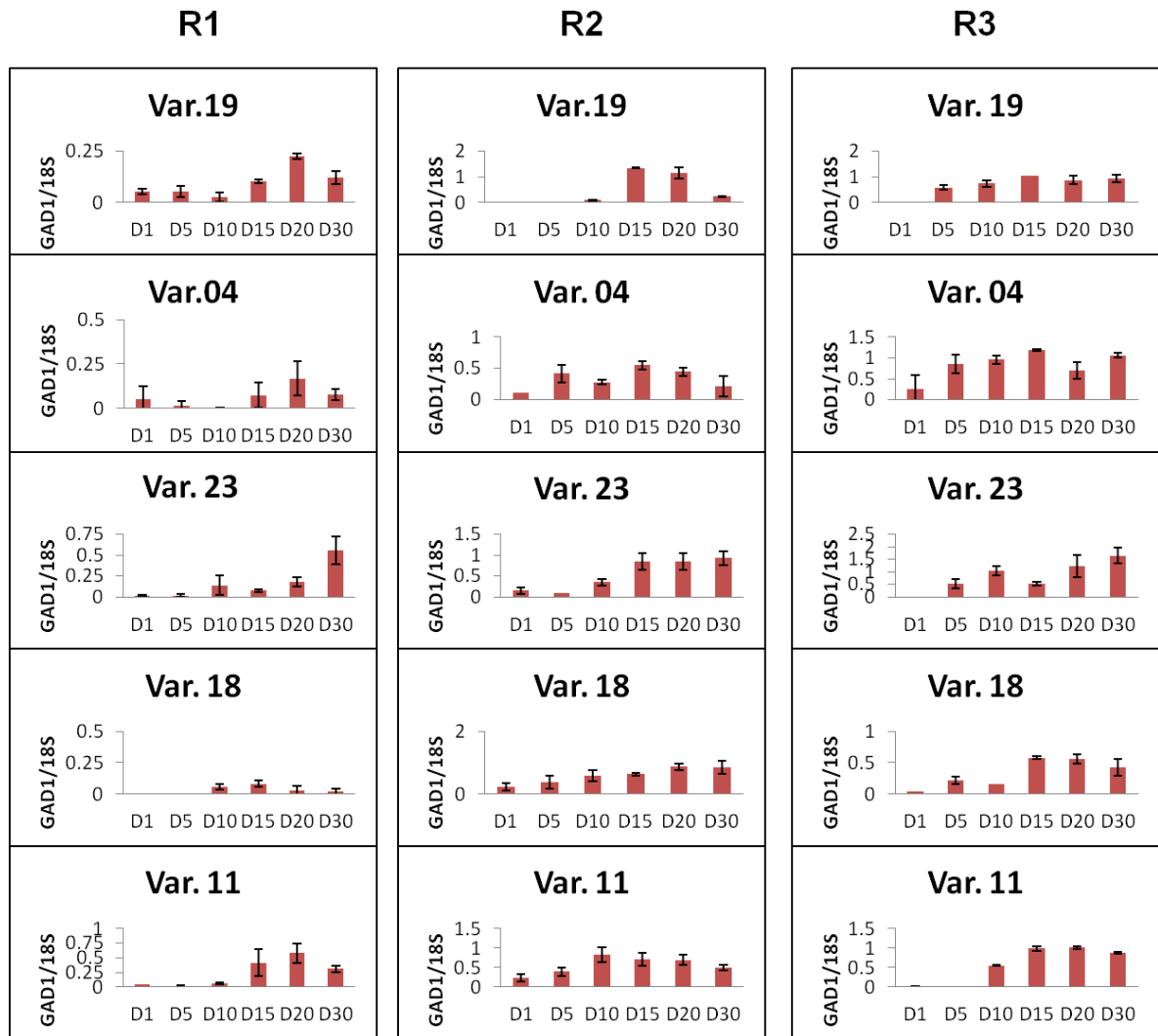
GEN		SECUENCIA
18S	Forward:	5'- GGAAACTTACCAGGTCCAGACATAG-3'
	Reverse:	5'- GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC-3'
PDI	Forward:	5'- CAGCAGTGGAGAGGCCAGTGGTCAG-3'
	Reverse 1:	5'- GGTACGGATGGTTGTCAGGGTTCTT-3'
GAD1	Forward:	5'- ATGGTGGTGACCGTGGCAGCGACG-3'
	Reverse1:	5'- GCTTGCCGCACTCGGGCTCCATCC-3'
MLA1	Forward2:	5'- GCCTTCGTCGTCTCTTTATAATAAC-3'
	Reverse1:	5'- CATATAAACAGAGACAAACTCTCG-3'
MLA1-2	Forward1:	5'-GACATCAACATTGCTTTCTCTATCA-3'
	Reverse2:	5'- GTTTAGGTTTCACCTTCTCGCCACC-3'
MLA6	Forward1:	5'-CTTAGTCCTGCCAGTGAAGGAAGTG-3'
	Reverse2:	5'-TGCCGCCGAAGGGATAGCAAGTTCC-3'

Anexo 2. Gráficas de PDI.



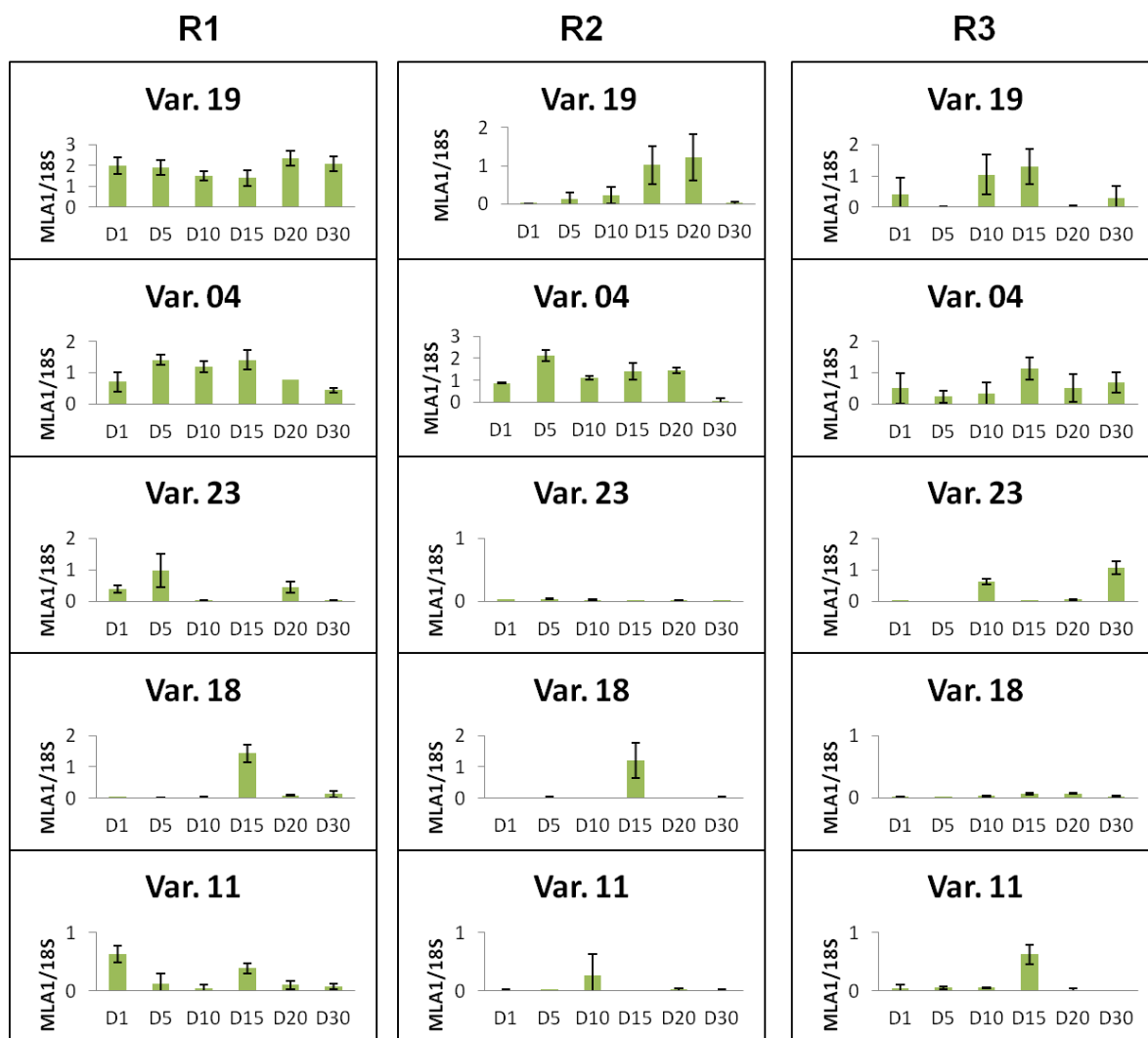
Gráficas de la cantidad relativa de transcritos de *PDI* respecto al control de rRNA 18S contra tiempo de maduración de la semilla en el que se recolectó la muestra. D1 indica el día en que la espiga empezó a abrirse y fue el primer día de recolección de muestra. Las columnas indican una sólo réplica biológica (R1, R2 o R3). En cada gráfica está indicada la desviación estándar de las réplicas técnicas, es decir, repeticiones técnicas de la misma muestra biológica.

Anexo 3. Gráficas de GAD1.



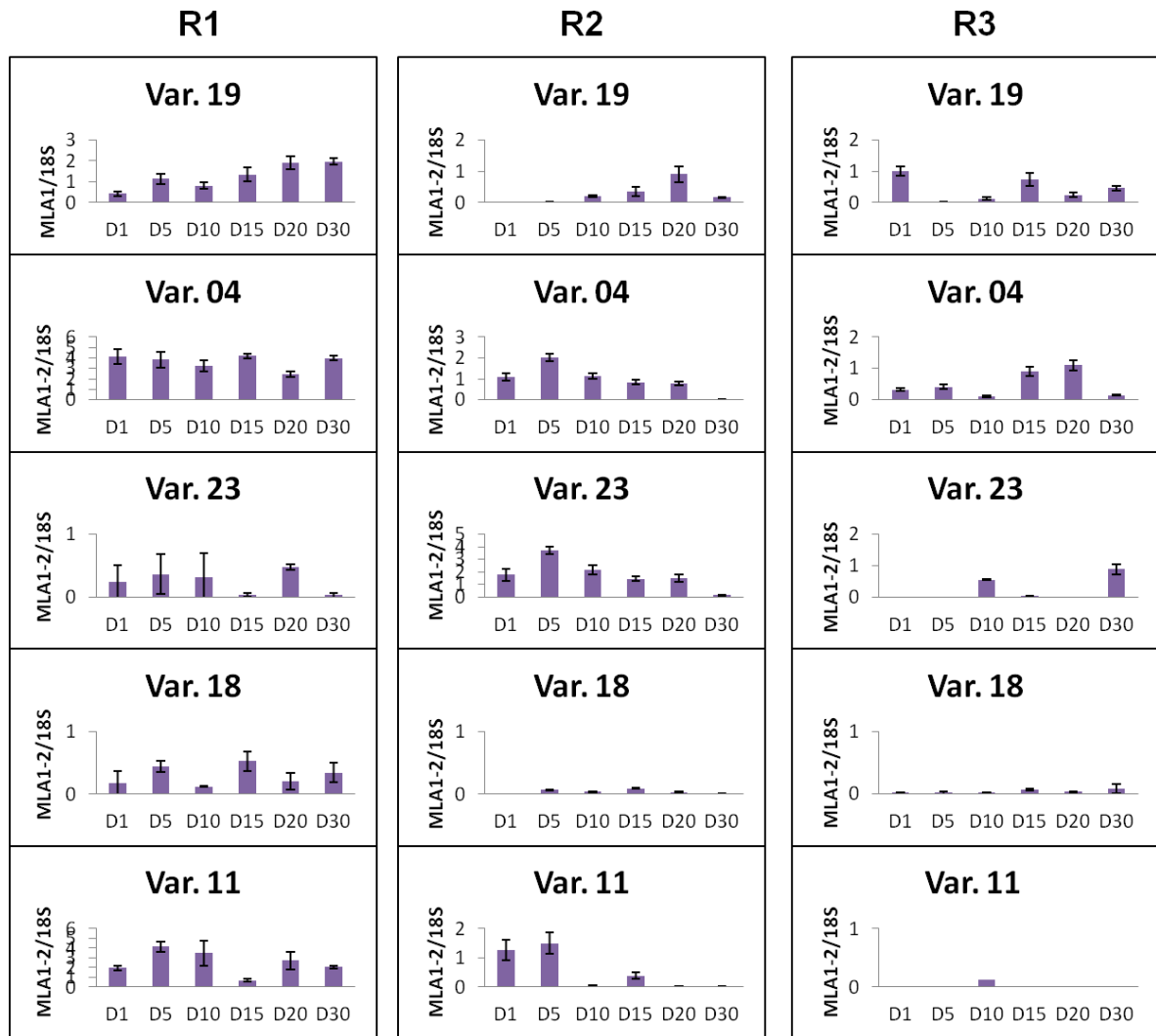
Gráficas de la cantidad relativa de transcritos de *GAD1* respecto al control de rRNA 18S contra tiempo de maduración de la semilla en el que se recolectó la muestra. D1 indica el día en que la espiga empezó a abrirse y fue el primer día de recolección de muestra. Las columnas indican una sólo réplica biológica (R1, R2 o R3). En cada gráfica está indicada la desviación estandar de las réplicas técnicas, es decir, repeticiones técnicas de la misma muestra biológica.

Anexo 4. Gráficas de MLA1.



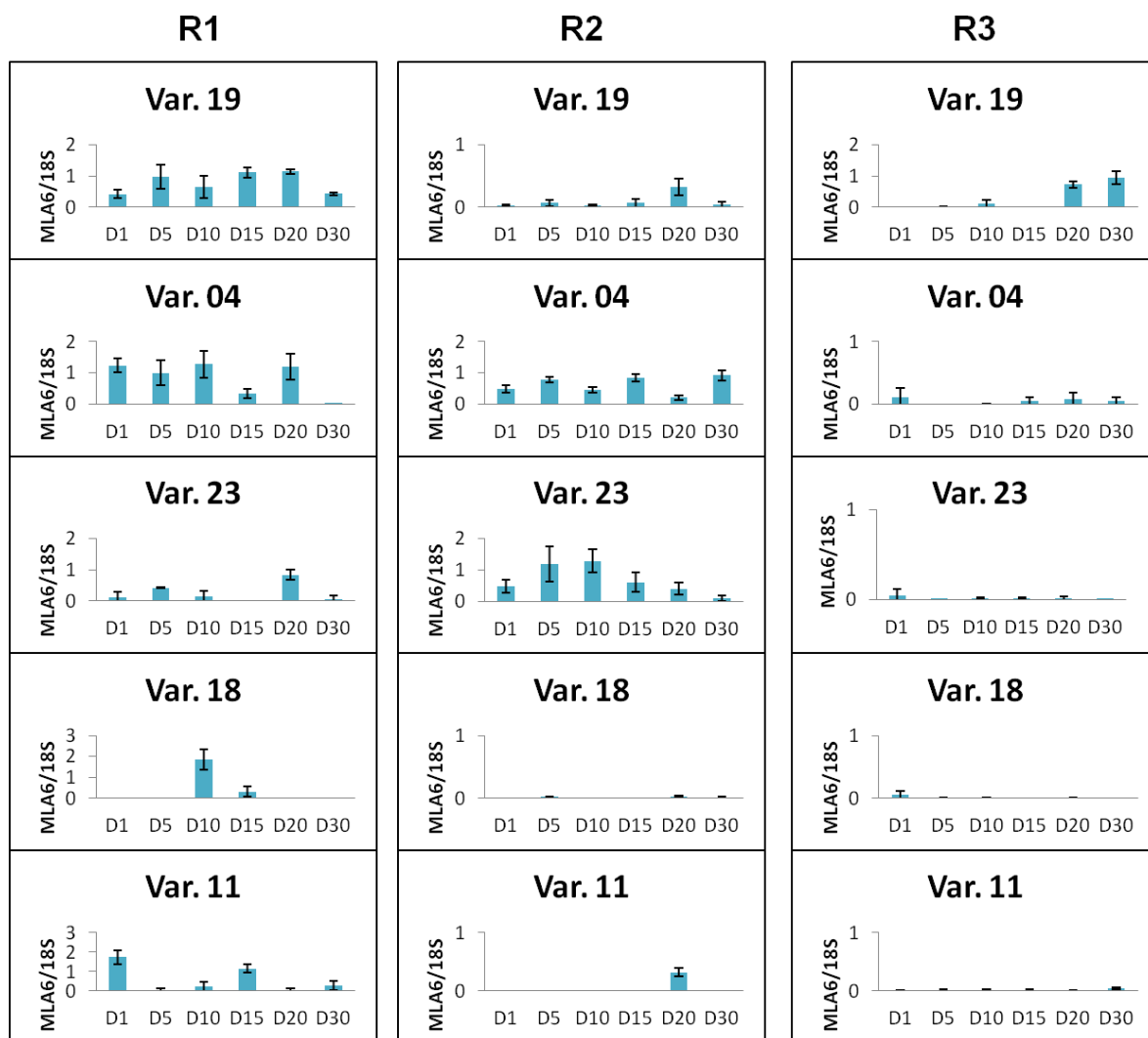
Gráficas de la cantidad relativa de transcritos de *MLA1* respecto al control de rRNA 18S contra tiempo de maduración de la semilla en el que se recolectó la muestra. D1 indica el día en que la espiga empezó a abrirse y fue el primer día de recolección de muestra. Las columnas indican una sólo réplica biológica (R1, R2 o R3). En cada gráfica está indicada la desviación estandar de las réplicas técnicas, es decir, repeticiones técnicas de la misma muestra biológica.

Anexo 5. Gráficas de MLA1-2.



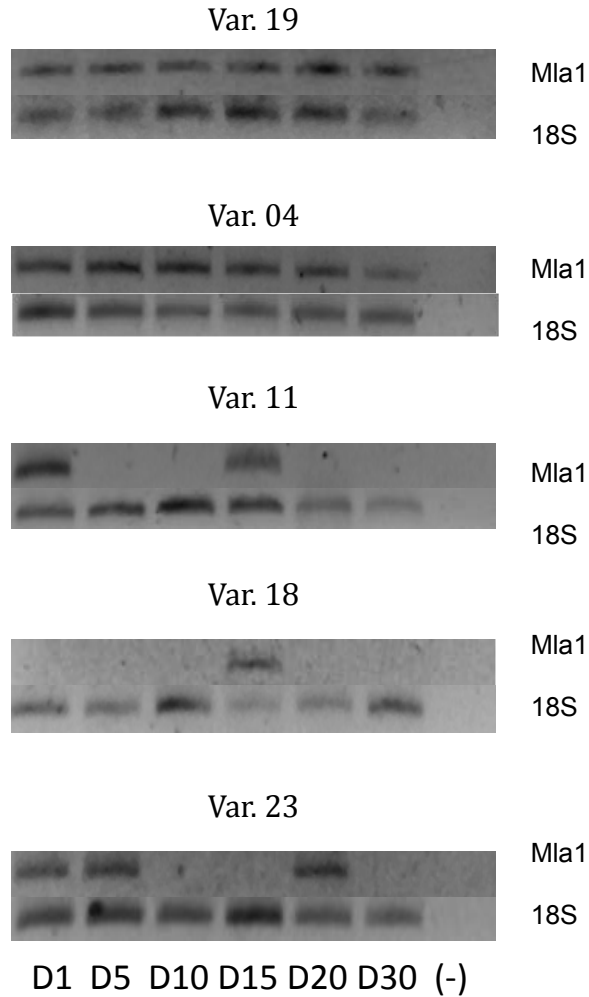
Gráficas de la cantidad relativa de transcritos de *MLA1-2* respecto al control de rRNA 18S contra tiempo de maduración de la semilla en el que se recolectó la muestra. D1 indica el día en que la espiga empezó a abrirse y fue el primer día de recolección de muestra. Las columnas indican una sólo réplica biológica (R1, R2 o R3). En cada gráfica está indicada la desviación estándar de las réplicas técnicas, es decir, repeticiones técnicas de la misma muestra biológica.

Anexo 6. Gráficas de MLA6.



Gráficas de la cantidad relativa de transcritos de *MLA6* respecto al control de rRNA 18S contra tiempo de maduración de la semilla en el que se recolectó la muestra. D1 indica el día en que la espiga empezó a abrirse y fue el primer día de recolección de muestra. Las columnas indican una sólo réplica biológica (R1, R2 o R3). En cada gráfica está indicada la desviación estandar de las réplicas técnicas, es decir, repeticiones técnicas de la misma muestra biológica.

**Anexo7. Transcritos de MLA1 para las variedades; 19, 04, 23, 18 y 11.
Primera réplica.**



A modo de ejemplo, para que se note más claramente, imagen donde se muestran los transcritos de MLA1 (arriba) y los de 18S (abajo). Las variedades 19 y 04 transcriben constitutivamente este gen, en cambio las variedades 11, 18 y 23 sólo tienen transcripción a ciertos días. La última casilla vacía es el control negativo (agua).