



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“La PDI como marcador molecular de acumulación de
proteínas en semillas de cebada”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Mariela Kalinova Jelezova

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
[Facultad de Química](#)

Dra. María Soledad Funes Argüello
[Instituto de Fisiología](#)

Ciudad de México. Enero, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Ruiz Terán Francisco
Vocal: Dra. González Segura Lilian
Vocal: Dra. Lara Núñez Aurora
Vocal: Dra. Coello Coutiño Martha Patricia
Secretario: Dra. Vera Estrella Rosario

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

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Mariela Kalinova Jelezova



Only a wayfarer born under unruly stars would attempt to put into practice in our epoch of proliferating knowledge the Heraclitean dictum that “men who love wisdom must be inquirers into very many things indeed.”

ÍNDICE

1. Dedicatorias y Agradecimientos.....	5
2. Resumen.....	8
3. Introducción.....	9
3.1 Descripción de la cebada.....	9
3.2 La cebada en México.....	12
3.3 Marcadores moleculares.....	15
3.4 De cebada a cerveza.....	16
3.5 Proteínas de reserva.....	19
4. Antecedentes.....	22
4.1. Trabajos previos.....	22
4.2. Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI).....	25
5. Hipótesis.....	37
6. Objetivos.....	37
7. Materiales y métodos.....	38
8. Resultados.....	48
9. Discusión.....	65
10. Conclusiones.....	73
11. Perspectivas.....	74
12. Bibliografía.....	75
13. Anexos.....	81

1. Dedicatorias

Le dedico mi tesis al tiempo mismo, que se me ha escapado entre los dedos...escurriendo entre risas y pesares. Las viejas clepsidras no volverán a medir su pasar, así como esos años no volverán a mí, más que en los recuerdos. El tiempo me ha observado al verlo pasar. Se ha reído de mí y ha llorado conmigo. Sutil y sabio, me ha dejado regalos atemporales que guardar de la gente que me ha acompañado y querido;

Gracias mamá Mariana y papá Kalin, por ser refugio en la tormenta, pan en manos hambrientas, esperanza y admiración en la humanidad.

Gracias Ivi, por ser la roca que me respalda y el viento que se lleva mis preocupaciones. Mi futuro está puesto en ti.

Gracias a mis abuelos Mariika, Dimitar, Ivanka y Pasho que han clavado y nutrido mis raíces, alimentando mis más tiernas memorias con imaginación y alegría. El tiempo sin pasado no es tiempo.

Gracias a mis tíos Ivo, Lili, Niki y Katia; a mis primos Mitko, Rumi, Isi y Pepi y a mis sobrinos Yavor y Alex, que me han dado un nido en el que crecer y un sentido de pertenencia.

Gracias a Cesy que ha sido un ángel guardián y a los suyos; Tony, Jorge y Axel que son familia para todos los del laboratorio 103 y nos han ayudado de mil formas posibles.

Gracias a Víctor, Thamara, Hugo y René que me vieron en mis horas más oscuras y permanecieron hasta que se despejaron las tinieblas. ¡Los quiero!

Gracias a Emmanuel y Gaby que son mis faros a la distancia; hace mucho que estaría perdida sin ellos.

Gracias a todos mis amigos del 103; Marco, Marisol, Abraham, Kenia, Brenda, Caro, Kevin, Frida, Luis, Saray, Allan, Eduardo, Jesús, Naholi, Carlos y todos los que me faltan...fueron el cultivo perfecto para crecer, gracias por su ayuda.

Gracias a mis compañeros de sueco que me hicieron tan feliz; Polo, David, Liuba, Rudy, Itzul, Erna y todos los que faltan. Tack! Jag älskar ni! Ni är bäst!

Gracias a CONACYT por la beca, sin ella no estaría escribiendo estas palabras.

Gracias a todos aquellos que me han hecho el día, la hora, el minuto con una mirada, una sonrisa, un chiste, una buena palabra o su presencia. A fin de cuentas, *the devil is in the details*.

Y si algún incauto obsesionado con el tiempo como yo, se topa alguna vez con mi tesis por casualidad, le diría que de todas las frases y pensamientos bellos que he anotado sobre el tiempo con los años, éste es el que más me ha servido;

“Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades”- M. de Cervantes.

M.K.

Agradecimientos y menciones especiales

Este trabajo fue realizado en el marco del convenio de colaboración entre la Universidad Nacional Autónoma de México e Impulsora Agrícola S.A. de C.V. denominado “Análisis de marcadores bioquímicos en variedades contrastantes de cebada que impactan la productividad” con No. de registro 41611-1321-2-VI-15 (FQ 10-105).

Se agradece al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado PAIP 5000-9118 por el financiamiento complementario de este trabajo.

Así mismo se agradece al proyecto de infraestructura CONACYT 252001 por el financiamiento de los equipos de uso común en el Departamento de Bioquímica.

2. Resumen

La cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los cultivos conocidos más antiguos y ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la agricultura de diferentes civilizaciones. Se le considera un cereal clave para 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 estudios previos, 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 su mejoramiento. Los cambios encontrados parecen ser el resultado de una expresión diferencial a nivel traduccional y postraduccional durante el desarrollo de la semilla, o debidos a diferentes niveles de degradación de las proteínas.

En este proyecto se probó que una de las proteínas identificadas entre las variedades, podría utilizarse como marcador molecular para distinguir entre ellas. Esta proteína es la PDI1-1. o Proteína Disulfuro Isomerasa, que hasta dónde se conoce tiene como función ayudar al plegamiento adecuado de las proteínas de almacenamiento recién formadas participando en la formación de puentes disulfuro. Dos de las variedades mostraron niveles reducidos de esta proteína, en comparación con las otras tres variedades estudiadas. Esta característica se observó para diferentes condiciones de crecimiento, indicando que es variedad-dependiente y un buen marcador molecular. Además, en este trabajo se determinó que la proteína estudiada posee diferencias en su estado de glicosilación entre las variedades, haciéndonos pensar que este cambio postraduccional podría influir en su localización y/o funcionalidad en las diferentes variedades. Esto puede influir en el almacenamiento de proteínas de reserva y subsecuentemente en la calidad maltera de las variedades.

3. Introducción

La cebada (*Hordeum vulgare*) es el cuarto cereal más cultivado en el mundo después del trigo, arroz y maíz con una producción mundial aproximada de 136 millones de toneladas por año (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2007). Pertenece a la familia de las poáceas (gramíneas) al igual que el trigo y el centeno. Se le considera un cereal de invierno (aunque también existen variedades de primavera), que generalmente es 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 *Hordeum spontaneum* (Weiss et al 2004). La cebada es autógama, es decir se poliniza a sí misma, sin embargo la variación genética dentro de la especie es enorme. Mucho es de debido a que gran porcentaje de su genoma se compone por transposones. (Molina-Cano, 1989; Morrell et al., 2007).

Existen dos subespecies de cebada que pueden cruzarse entre sí; *Hordeum distichon* de dos hileras de grano, más popular para la elaboración de cerveza en la mayoría de las industrias y *Hordeum hexastichon* de seis hileras de semillas, utilizado 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*. El gen para el llenado de las semillas en dos hileras es dominante sobre el de seis hileras. Este último es producido por una mutación que permite el llenado de las espiguillas laterales que generalmente son estériles (Zohary et al., 2012, Kalinova – Jelezova, 2014, Komatsuda et al 2004, Komatsuda et al., 2007, Tanno et al., 2006; Sang et al., 2009).

El principal uso hoy en día de la cebada es para la obtención de cerveza. Es por eso que todos los cultivos de cebada buscan ser de variedades que no sólo tienen características favorables de crecimiento en campo y producción de grano (resistencia a plagas, mayores densidades de cultivo y un alto rendimiento en número de semillas), sino que también pasan a ser de gran importancia las características de la semilla que están estrechamente relacionadas a la producción misma de la cerveza y al proceso industrial que esto conlleva (Hornsey

et al., 2003]. La gran diversidad genética de la cebada permite la generación de nuevas variedades por métodos de cruces tradicionales, sin embargo para los productores de cerveza es importante la búsqueda de métodos rápidos y confiables para distinguir entre ellas y aún más importante, saber cuáles van a ser buenas variedades cerveceras (Willcox et al., 2004).

En el continente europeo, Estados Unidos y Canadá predomina el cultivo de cebada de dos hileras, que se utiliza para la producción de cerveza (Wilson et al., 1998). En México se cultiva exclusivamente la cebada de seis hileras, que no es particularmente favorable para la fabricación de cerveza debido a algunas de sus características; especialmente la cantidad y tipo de proteínas de almacenamiento que contienen sus granos. La cebada de dos hileras tiene un contenido proteico que va de 11-13% y la de seis de 12 a 13.5%. Si bien el porcentaje no parece muy diferente, si se ve reflejado en los procesos de producción. *Hordeum hexastichon* fue la subespecie que mejor se adaptó en las tierras de cultivo mexicanas y a pesar de que se intentó cultivar la de dos hileras, no se obtuvieron buenos rendimientos (Schwarz et al., 1995). Por lo anterior, México contribuye solamente con un 0.45% al cultivo de cebada a nivel mundial e importa al país grandes cantidades de malta de la variedad canadiense Metcalfe y otras variedades estadounidenses. Éstas se mezclan con la producción nacional para mejorar la calidad conjunta de maltas.

País/región	Promedio 1995/96-2004/05 (miles de toneladas)	Porcentaje
Unión Europea	54,629	38.6
Rusia	16,040	11.3
Canadá	12,505	8.3
Ucrania	8,043	5.7
Estados Unidos	6,719	4.7
Turquía	7,130	5.0
Australia	6,620	4.7
China	3,323	2.3
Kazakstán	2,057	1.4
Irán	2,095	1.5
Marruecos	1,787	1.3
India	1,510	1.1
México	638	0.45
Subtotal	123,095	86.91
Resto del mundo	18,538	13.09
Total mundial	141,633	100

Tabla 1. Producción mundial de cebada. México ha contribuido con el 0.45% anual aproximado de la cebada cultivada en el mundo entre los años 1995 y 2005. (Navarrete-Tabla, 2016, Galarza-Mercado, 2006).

Lugar	País	Volumen de producción (kL)	Participación en el mercado mundial (%)
1	China	44,933,300	23.5
2	Estados Unidos	22,547,400	11.8
3	Brasil	14,147,000	7.4
4	Alemania	9,560,000	5.0
5	México	8,200,000	4.3
6	Rusia	7,636,100	4.0
7	Japón	5,468,600	2.9
8	Reino Unido	4,120,400	2.2
9	Polonia	3,987,000	2.1
10	Vietnam	3,890,000	2.0
	Resto del mundo	66,508,300	
	Total	190,998,100	

Tabla 2. Producción mundial de cerveza por país en el año 2014. A pesar de que en México se cultiva un porcentaje muy bajo de cebada en comparación a otros países, en la tabla se observa que está entre los cinco principales productores y exportadores de cerveza. Esta diferencia entre materia prima y producto final se compensa importando grandes cantidades de cebada y malta de otros países. (Navarrete-Tabla, 2016, Kirin Beer University, 2015).

La cebada en México

A pesar de la baja producción nacional de cebada, México se ubica en el 5to lugar de los países con mayor producción y exportación de cerveza. Es por eso que hay una notable necesidad de estudiar y ayudar a la mejor selección de variedades nacionales, que no sólo disminuirían los gastos de importación de maltas del extranjero sino que impulsarían el desarrollo agrícola. (Fig. 1; Burger et al., 1985).

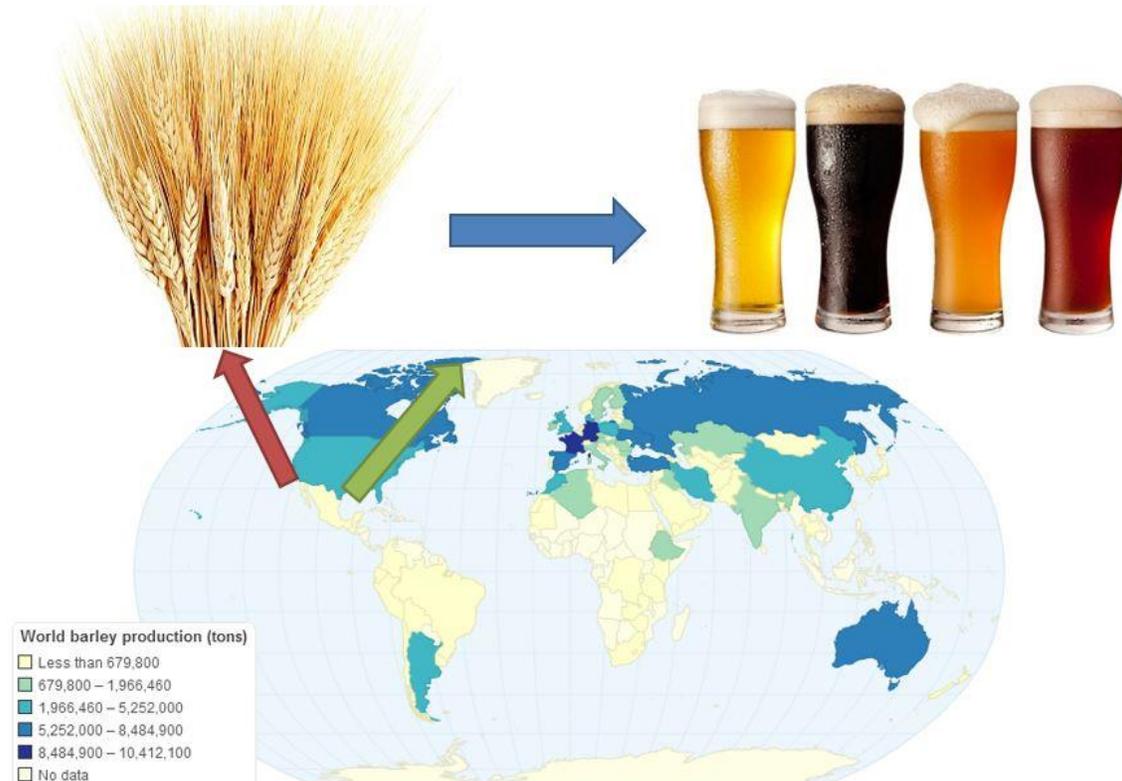




Fig. 1 (Arriba) Mapamundi que representa por colores la producción mundial media de cebada en el año 2010 publicado por la FAOSTAT. Se observa que a pesar de que México es un país líder en exportación de cerveza no se cultiva mucha cebada localmente y se importan grandes cantidades de variedades malteras del extranjero.

Fig. 2 (Izquierda) Distribución de la cebada de dos y seis hileras en México y Estados Unidos. En negro está indicada la de seis hileras, en naranja la de dos hileras y en azul los cultivos mixtos (Schwarz et al. 1995). El círculo azul sobre la República mexicana indica la región del Bajío, con el 25% de los cultivos en invierno con riego y en rojo la región de los Valles Altos con el 75% de cultivo en condiciones de temporal (Solano et al., 2006).

La cebada maltera se siembra en una superficie mayor a las 300 mil hectáreas en nuestro país. El 25% de estos son cultivos de riego en invierno, ubicados principalmente en la región del Bajío (Guanajuato, Michoacán, Jalisco, Querétaro) y al noroeste (Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Baja California Norte). El 75% restante son cultivos de temporal en verano (ver Fig. 2), ubicados en los Valles Altos de la Meseta Central (Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Zacatecas, Durango). Las variedades mexicanas fueron desarrolladas por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) y son cultivadas en las regiones antes mencionadas. Algunas de ellas 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 et al, 2006).

HV2007-18: Al igual que la variedad HV2007-23, fue liberada en el año 2006 al mercado a pesar de que tiene un menor rendimiento de grano que esta última. 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 cultivada 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 cultivadas.

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 et al., 2006).

Lo que se conoce sobre el uso de estas variedades en la industria cervecera es que la número 23 presenta problemas para producir buena malta por su alto o muy variable contenido de proteínas de reserva. Por su parte la variedad 04 es de las más utilizadas hoy en día en producción, ya que tiene menor variabilidad en características de malteo y en procesos de producción.

La mayor parte de malta importada a México pertenece a la variedad Metcalfe, que es una de las mejores para maltear y hacer cerveza a nivel mundial. Esta variedad canadiense de dos hileras fue desarrollada en 1986 a partir de la cruce de los cultivares Oxbow y Manley (Legge et al., 2003). Se caracteriza por ser

resistente a una gran cantidad de patógenos y también tiene la ventaja de poseer poca cantidad de proteínas en las semillas, cualidad buscada por las cerveceras.

En México, la selección de variedades se hace fundamentalmente con base a características morfológicas y conforme a la experiencia de los agricultores, por lo que este trabajo es parte de los primeros análisis de índole molecular en las variedades mexicanas. Es sumamente útil e importante estudiar las variedades y sus características desde un punto de vista biológico molecular, para establecer una correlación entre datos morfológicos y bioquímicos y tener una herramienta de identificación más adecuada.

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de DNA o proteínas que se relacionan con un carácter de interés, que permita distinguir entre individuos o poblaciones y que no sea 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 repetidas de DNA (satélites, minisatélites, microsátélites o SRTs, etc.). Con los marcadores se busca poder distinguir entre los genotipos de los individuos o poblaciones. Los marcadores moleculares, muchas veces no representan un gen diferencial en sí, sino secuencias que pueden estar ligadas a genes de interés muy cercanos. Nos dan información sobre una variación alélica en determinado locus. Sus usos son muy amplios, incluyendo pruebas de paternidad, identificación de enfermedades genéticas, aplicaciones forenses, filogenias y también 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 (Griffiths et al., 2002).

En cuanto a los marcadores de proteínas, generalmente representan enzimas o proteínas que se expresan diferencialmente o tienen diferentes isoformas. Los

procedimientos para el análisis de marcadores proteicos son fáciles de realizar. Generalmente se utiliza la separación de proteínas mediante geles de poliacrilamida de una o doble dimensión; en esta última, las proteínas primero se separan por su punto isoeléctrico en un focalizador y luego por su masa durante una electroforesis. De esta forma es posible separar incluso isoformas de la misma masa molecular. Posteriormente se les puede identificar por espectrometría de masas, mandando a analizar las manchas del gel. (Kalinova – Jelezova, 2014; Mohan et al., 1997; Schlötterer et al., 2004, Agrawal et al., 2013)

De cebada a cerveza

Un criterio para empezar esta búsqueda de marcadores diferenciales específicos es fijarnos en la cantidad y tipo de proteínas que posee el grano de determinada variedad. Analizando el proceso cervecero es claro que las proteínas se relacionan a los puntos críticos de su fabricación.

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 del grano, pues se van fabricando y almacenando proteínas y durante el malteado del grano pues muchas enzimas degradan carbohidratos y proteínas. (Briggs et al., 1998).

El primer paso para la producción de cerveza es el malteo del grano de cebada, que consiste en embeber las semillas en agua y dejar que empiecen a germinar para luego desecarlas. Esto tiene como propósito que las enzimas proteolíticas rompan los enlaces de las proteínas de almacenamiento y se utilicen los aminoácidos a los que dan lugar como fuente de nitrógeno y carbono para el embrión que está germinando. Posteriormente las amilasas, que se activan en la post germinación, una vez liberadas de la matriz proteica que las rodea, rompen el almidón acumulado en la célula y lo convierten en azúcares más pequeños (maltosas). Las maltosas pueden ser utilizadas por las levaduras durante la fermentación alcohólica. El color de la cerveza depende del paso de secado. Si el

grano se deja secando mucho tiempo se comienza a tostar y se vuelve más oscuro (Sigsworth et al., 1965).

Una vez obtenida la malta se va a moler y se le adicionarán granos de otros cereales para aumentar su densidad o darle otro sabor. A esta mezcla se le agrega agua y se va pasando por ciclos de varias temperaturas, provocando que diversas enzimas se activen. Dicho procedimiento da lugar a una mezcla denominada mosto. El mosto se filtra. Su filtrado se pone a hervir por algunas horas para eliminar bacterias y otras impurezas, así como para inactivar las enzimas que cortan los polisacáridos y proteínas en monómeros.

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 (Butcher et al., 1989; Eblinger et al., 2009; Moir et al., 2000; Verzele et al., 1986).

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. 3; Libkind et al., 2011).

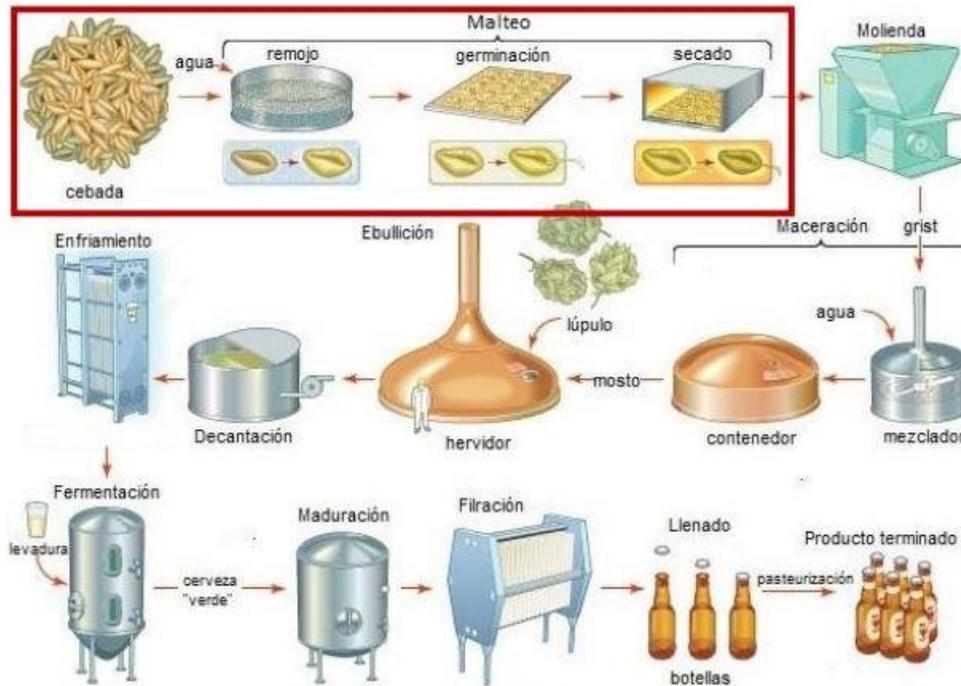


Fig. 3. Técnica de malteo de la cebada y producción de la cerveza. Están descritos todos los pasos desde el malteo de la cebada (proceso señalado en el recuadro rojo) hasta el empaquetamiento de la cerveza. (Tomado de Salgado-Albarrán, 2015).

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. La cantidad de proteínas de reserva depende de la expresión de sus genes durante la formación de la semilla de cebada.

Algunas variedades presentan altas concentraciones de proteína no procesada después del malteo, que puede representar problemas en la producción de cerveza. Las proteínas tapan 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 baja cantidad de proteínas de reserva.

Proteínas de reserva

Las proteínas de reserva en la cebada se denominan hordeínas. Las hordeínas representan aproximadamente el 50% de proteína total en la semilla, son pobres en algunos aminoácidos esenciales y ricas en prolina y glutamina. Cuentan con dominios estructurales y motivos de secuencias de aminoácidos repetidos (Shewry et al., 1995). A pesar de ello tienen una alta variabilidad intergenotípica por lo que su contenido y tipo es diferente entre variedades. Las hordeínas se separan en tres diferentes grupos dependiendo de su composición de aminoácidos y movilidad electroforética:

Hordeínas D. Son las de mayor masa molecular, aproximadamente 100 KDa y son poco abundantes.

Hordeínas C. Son pobres en Azufre. Estas no contienen residuos de cisteína por lo que no pueden formar oligómeros o polímeros, su masa molecular es de 75 KDa.

Hordeínas B y gamma. Son ricas en azufre. Representan el 80-90% de las proteínas de almacenamiento y pueden ser monoméricas o poliméricas, pues forman puentes disulfuro inter e intracatenarios. Son las de menor masa molecular entre 30 y 50 KDa.

Todas las hordeínas se encuentran codificadas en el brazo corto del cromosoma 5. Su expresión se regula principalmente a nivel transcripcional, siendo la cantidad de nitrógeno en el suelo uno de los estímulos para su expresión. Esto se ha observado principalmente para las hordeínas D (Howard et al., 1996). Las hordeínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso dónde son correctamente plegadas para luego ser acarreados a cuerpos proteicos de almacenamiento por proteínas chaperonas. Existe evidencia de que las hordeínas pueden ser almacenadas por dos vías; una en dónde permanecen en el retículo endoplásmico como en la variedad rusa Nevsky (Møgelvang et al., 1998) rodeadas de la membrana del mismo y otra, en dónde son exportadas a vacuolas de almacenamiento, pasando a través del Golgi. Sin embargo, a pesar de que se

han encontrado variedades con ambos tipos de almacenamiento de proteínas, tanto en trigo como en cebada, se desconocen los mecanismos por los que se decide la ubicación de las mismas (Shewry et al. 2002, Navarrete-Tabla, 2016). Al formar los cuerpos proteicos de almacenamiento se ha observado que las hordeínas B y C se condensan en su interior, mientras que las hordeínas gamma son las que se ubican en la parte externa de estos glóbulos proteicos (Shewry et al., 2002). También es sumamente interesante mencionar que solamente las hordeínas gamma están glicosiladas (Snegaroff et al., 2013). Se ha propuesto que las hordeínas gamma juegan un papel importante en el transporte y localización del resto de las hordeínas, pues se ha visto que en mutantes que carecen de ellas, hay una acumulación de hordeínas en el retículo endoplásmico en lugar de llevarlas a vacuolas de almacenamiento (Møgelvang et al., 1998). Tomando en cuenta que en la célula los gránulos ya formados de hordeínas se empaquetan alrededor de gránulos de almidón, su correcta degradación es necesaria para que las amilasas puedan acceder a él y permitir que las levaduras del proceso de fabricación de cerveza tengan acceso a azúcares para fermentar. Si estas proteínas forman puentes entre sí difíciles de romper, provocarán problemas en la producción de la bebida que implican costos y tiempo extra para resolverlos. Ahí radica la importancia de tener variedades con proteínas de almacenamiento fácilmente degradables por proceso al que serán sometidas.

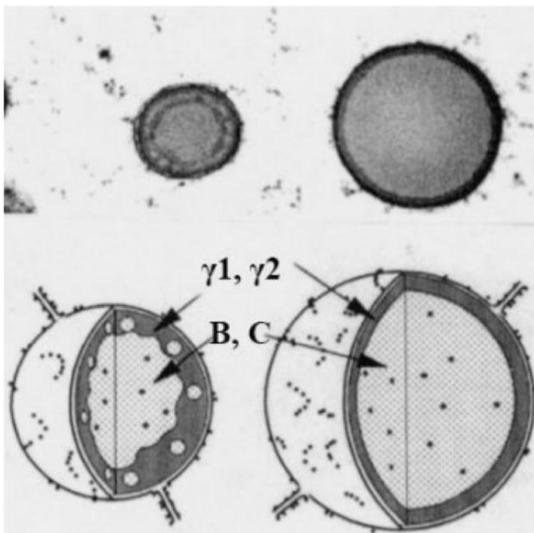


Fig. 4. Estructura de los glóbulos proteicos que forman las hordeínas. En la figura se puede observar un glóbulo proteico en formación temprana (izquierda) y un glóbulo proteico maduro (derecha). Arriba se muestran las fotografías microscópicas y abajo las representaciones de las mismas. En el centro de los glóbulos se acumulan polímeros de hordeínas B que forman puentes disulfuro entre ellas, en forma de red. En esa red se van quedando las hordeínas de mayor tamaño como las C y D que aparecen como puntos más oscuros en el centro de las esferas. En la parte externa se unen las hordeínas tipo gamma (1 y 2). Estos glóbulos proteicos se van almacenando en vacuolas, dónde muchas veces rodean glóbulos de almidón. Por lo mismo, las proteínas tienen que ser degradadas primero para que otras enzimas puedan acceder al almidón. (Shewry et al., 2002, Navarrete-Tabla, 2016).

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 et al., 1997; Borovkova 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. Anteriormente ya se han propuesto a las hordeínas (proteínas de almacenamiento de la cebada) como método para distinguir entre variedades, pues tienen patrones variables de acumulación, sin embargo a pesar de que tienen patrones diferentes, no se ha podido hacer una correlación directa entre estas y el buen rendimiento cervecero de la semilla para muchas variedades.

Antecedentes

Para determinar los patrones de proteínas almacenadas en el grano maduro de cebada, en el laboratorio se caracterizaron los extractos de hordeínas de las semillas provenientes de variedades mexicanas en geles SDS-PAGE de una dimensión, denotando diferencias en sus patrones como se esperaba.

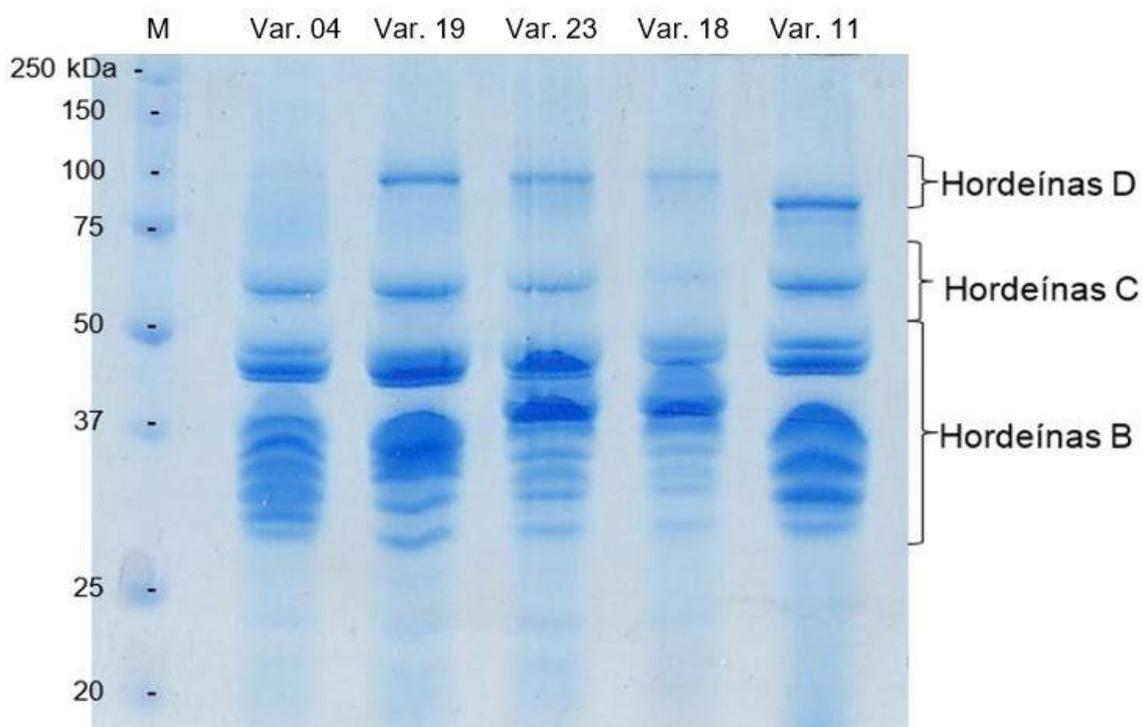


Fig. 5. Separación de un extracto de hordeínas de las variedades mexicanas (Var. 04, Var. 19, Var. 23, Var. 18 y Var. 11) mediante gel desnaturizante de poliacrilamida al 12%. Las hordeínas se enriquecieron posterior a la extracción de proteína total al solubilizarlas en soluciones de 70% de etanol, característica típica de este tipo de proteínas. M: marcador de peso molecular. Se muestra el intervalo de tamaño de cada grupo de hordeínas, incluyendo las hordeínas gamma dentro del asignado para hordeínas B. (Tomado de Salgado et al., 2015.)

Al realizar Western Blots, con anticuerpos anti-gliadinas comerciales (las gliadinas son el equivalente de las hordeínas pero en el trigo) se observaron diferencias en los niveles de las hordeínas más abundantes. Estos anticuerpos pueden utilizarse debido a que reconocen algunas regiones de la proteína que las hordeínas y las gliadinas comparten idénticas. Las variedades 23 y 18 mostraron mayores niveles de hordeínas, con migración ligeramente superior a los observados para las variedades 19 y 04 (Fig. 6).

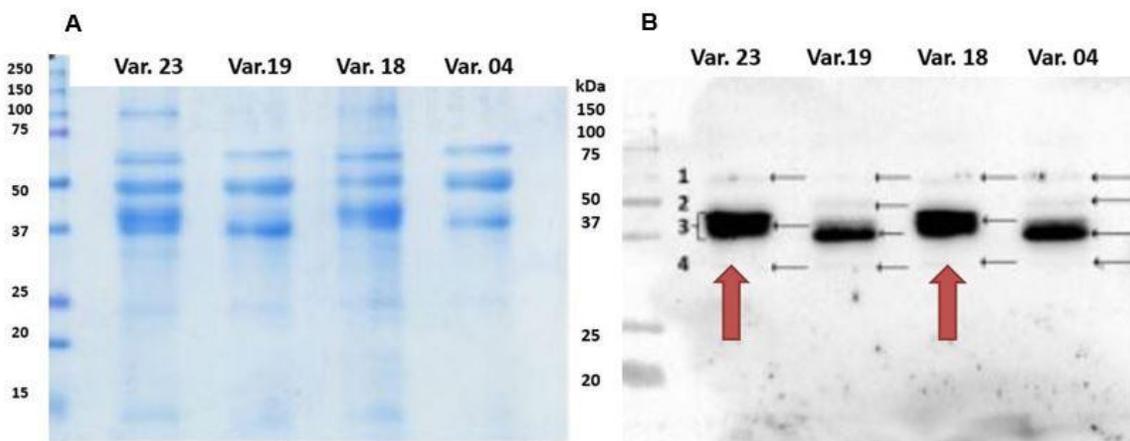


Fig. 6. A) Gel SDS-PAGE de extracto purificado de hordeínas de variedades de cebada mexicanas. B) Western Blot con anticuerpos contra gliadinas, proteínas ortólogas a las hordeínas en trigo que comparten regiones similares con estas. Las flechas rojas señalan a las variedades 23 y 18 que parecen tener un contenido mayor o diferente de hordeínas. Las variedades 19 y 04 que cuentan con un menor contenido coinciden con las más utilizadas por la industria debido a su adecuado rendimiento.

Otros experimentos se enfocaron a visualizar diferencias entre las proteínas totales por medio de un análisis proteómico de las variedades mexicanas.

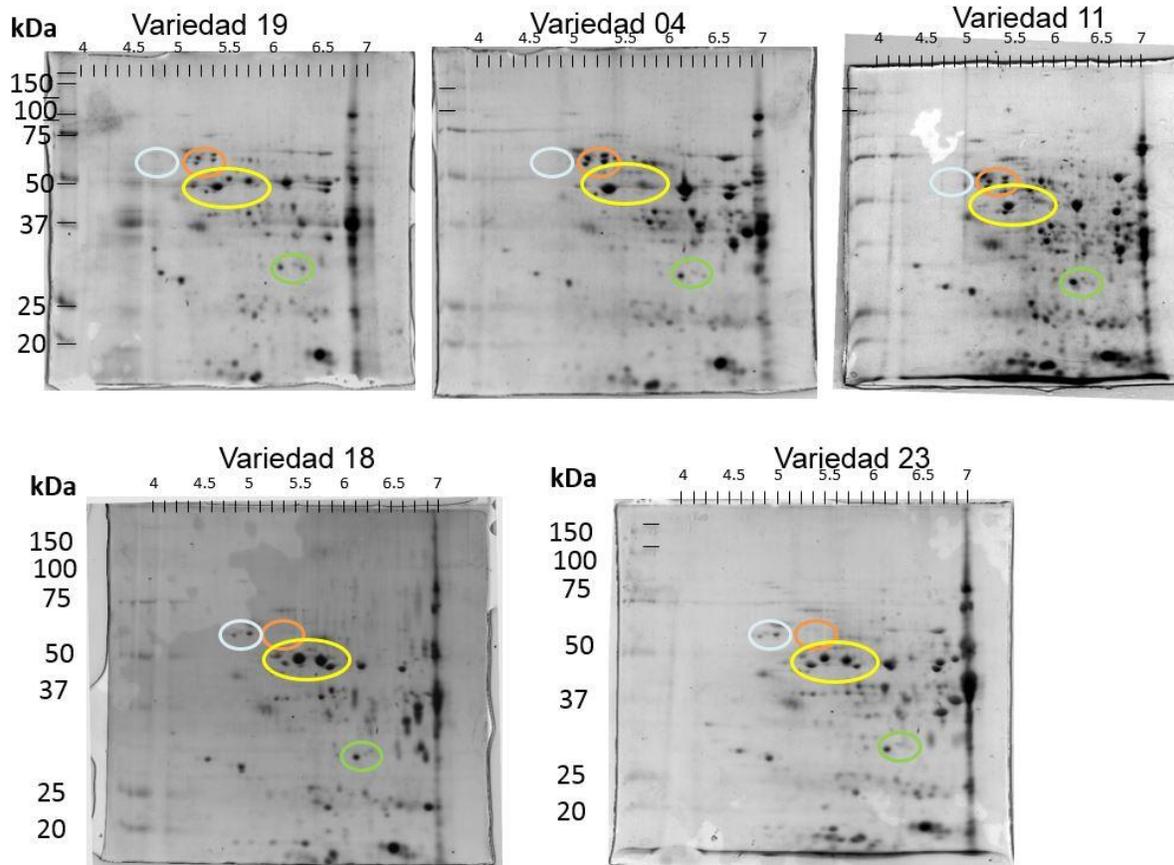


Fig. 7. Análisis proteómico de 5 variedades de cebada. Se resolvieron gels en doble dimensión de proteína total de las cinco variedades mexicanas de cebada. Se identificó la presencia de proteínas diferenciales entre las variedades, encerradas en la figura en círculos de diferentes colores. A partir de la detección de los cambios se seleccionaron estas proteínas y se procedió a su identificación por espectrometría de masas. En el círculo blanco para las variedades 18 y 23 se identificó PDI, al igual que en el círculo naranja para las variedades 19, 04 y 11, sugiriendo la presencia de isoformas. (Herrera-Díaz et al., en preparación).

Los patrones proteicos resueltos mediante electroforesis en 2D (punto isoeléctrico de 4 a 7 y masa molecular) de las 5 variedades mexicanas mencionadas mostraron diferencias en la composición de proteínas de semilla madura (ver Fig.7). Las proteínas diferencialmente abundantes se identificaron mediante espectrometría de masas y se propusieron como marcadores moleculares en la semilla madura. Entre estas, se identificó a la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI; Tabla 1).

Mancha	Var. 19		Var. 04		Var. 11		Var. 18		Var. 23	
	P.M.	P.I.								
1			57,55	5.4	57,55	5.2				
2							57	5.1	57	5.1
3	48	5.4	48	5.4						
4			30	6.1						

Tabla 1. Peso molecular y punto isoeléctrico aproximados de las manchas en dónde se detectó PDI.

Estos resultados sugieren la presencia de diferentes isoformas de la PDI entre las variedades de cebada.

Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI).

La PDI es una enzima presente en el retículo endoplásmico de los eucariotas que cataliza la formación y ruptura de puentes disulfuro entre las cisteínas, la cual tiene una masa molecular de 57 kDa. Esta proteína está 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 Fig. 8).

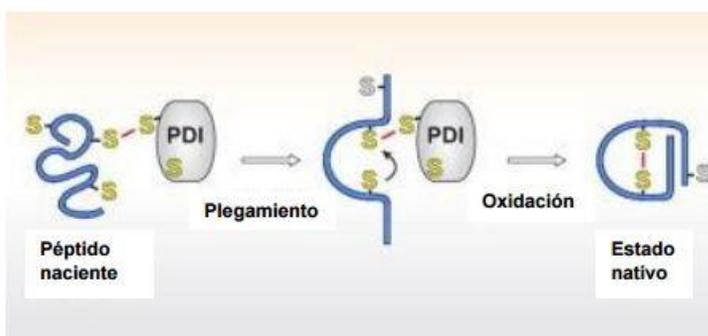


Fig. 8. Esquema de la formación de un puente disulfuro por medio de la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las cisteínas llevada a cabo por la PDI. Esta enzima puede formar o romper los enlaces, haciendo la reacción reversible (Modificado de Kosuri et al., 2012)

La familia de proteínas PDI se caracteriza por su localización en el RE y la presencia de uno o más dominios parecidos a tioredoxina, a pesar de que no todos ellos poseen actividad óxido-reductasa. Existen variantes de PDI que

cuentan con diferentes localizaciones celulares como el citoplasma, núcleo, y superficie celular, involucradas en diferentes procesos (Ciaffi et al., 2010). Sin embargo, estas chaperonas juegan un papel fundamental en el retículo endoplásmico, donde ejercen control sobre el plegamiento de las proteínas. Después de que el ribosoma traduce el mensajero, la proteína recién sintetizada entra al retículo endoplásmico. Ahí diferentes chaperonas se unen a ella y facilitan el plegamiento para obtener su estado nativo funcional. Si la proteína se pliega adecuadamente, esta puede ser exportada por medio de las vesículas COPII hacia el aparato de Golgi, donde las proteínas sufren cambios postraduccionales como glicosilaciones y finalmente son llevadas a las vacuolas y vesículas de almacenamiento de proteínas. Cuando una proteína no se pliega adecuadamente es acompañada por otras proteínas que la mantienen estable hasta llevarla a la ruta ERAD o degradación de proteínas asociada al RE. Una tercera posibilidad es que al no estar plegadas adecuadamente, las proteínas sintetizadas pueden formar agregados dentro del Retículo Endoplásmico (Kumamaru et al., 2007) (Fig. 9).

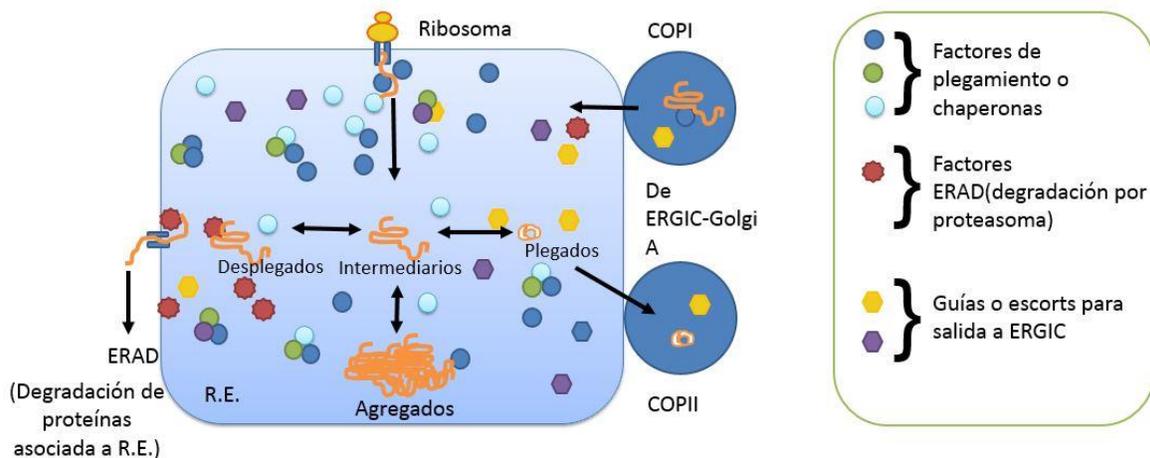


Fig. 9. Representación esquemática del plegamiento de proteínas recién sintetizadas por chaperonas en el R.E. y las posibles rutas alternas de este proceso. Si las chaperonas no pliegan adecuadamente las proteínas de almacenamiento para mandarlas al aparato de Golgi y a vesículas donde acumularlas, éstas se quedan en el R.E. formando agregados o son degradadas por la ruta de degradación de proteínas asociada a retículo Endoplásmico (Esquema modificado de J.L. Paz Ibarra, 2011).

La PDI canónica (Fig. 10) es una de estas chaperonas que 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 tiorredoxina, que contienen dos cisteínas y los otros dos; b y b' son sitios inactivos encargados de interactuar con los sustratos (Kim et al, 2012).

El plegamiento tipo tiorredoxina es un motivo estructural proteico característico que se encuentra en cinco clases diferentes de proteínas que tienen en común la propiedad de interactuar con sustratos ricos en cisteínas.

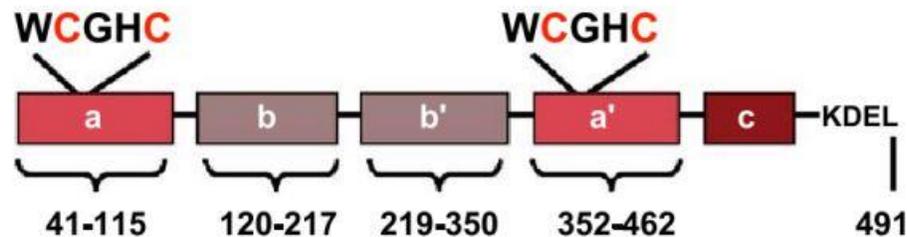


Fig. 10. Representación de los dominios de la PDI, a y a' son los dominios catalíticos de la proteína, b y b' se encargan de la unión a sus sustratos y en el dominio c se encuentra la secuencia KDEL, que le permite regresar a retículo endoplasmático. En rojo, arriba, están marcadas las cisteínas conservadas encargadas de la actividad catalítica.

La mayoría de los dominios catalíticos (a y a') en la familia de PDI contienen un motivo de aminoácidos conservado, CxxC, que comúnmente es CGHC (ver Fig. 10). La contribución de las actividades individuales de los dominios de tiorredoxina de la PDI se estudió utilizando deleciones y construcciones con rearrreglos de dominios para ver sus habilidades para oxidar, reducir e isomerizar proteínas que contienen puentes disulfuro con vías de plegamiento muy bien caracterizadas, específicamente el inhibidor de la tripsina pancreática de bovino (BPTI), lisozimas y ribonucleasas. Mientras que la oxidación del sustrato requiere solamente el dominio a o a', la isomerización requiere al dominio catalítico a o a' en combinación con b'. Las reacciones más complejas de isomerización que

requieren múltiples cambios conformacionales en el sustrato necesitan de todos los dominios de la PDI canónica, excepto el dominio c, sugiriendo que la PDI completa puede ser capaz de interactuar y estabilizar a sustratos parcialmente no plegados. Klappa y colaboradores demostraron en el 2002 que el dominio b' de PDI por sí sólo es capaz de unirse a péptidos pequeños, sin embargo la construcción b'a'c se requiere para unirse a péptidos más grandes, como los sustratos no nativos. Esto indica que el dominio b' actúa como el sitio principal de unión para los sustratos de PDI, pero que los otros dominios se requieren para unirse a sustratos más grandes. También se ha propuesto que la presencia de uno o dos sitios catalíticos va a modificar la eficiencia de la actividad de la PDI. Por otro lado, si se truncan los 51 aminoácidos del C-terminal, se inhibe toda actividad de chaperona, sugiriendo que en esa región existe un sitio de unión requerido para la actividad de chaperona localizado en la intercara de los dominios a' y c. Se cree que la PDI está fundamentalmente involucrada en reacciones de procesamiento postraduccionales, como ayudar al transporte y ensamblaje de proteínas en el retículo endoplásmico aunque también se le ha visto relacionada con la chaperona HSP70 (Hurkman W. J. et al., 1998).

Sin embargo, existen otras proteínas semejantes a la PDI, que conservan de uno a tres de los dominios tiorredoxina antes mencionados. A estas proteínas se les denomina PDIL o PDI like. Como hay muchos más tipos de éstas PDIL que de la PDI canónica muchas veces se denomina a toda la familia como PDIL, incluyendo a la canónica, denominándola PDI1-1 o PDIL1-1 (Ciaffi et al., 2010).

En el 2014, Yan y colaboradores hicieron la clasificación más reciente de familias de PDI en once especies de plantas (Fig. 11), ubicándolas por su semejanza de dominios en ocho grupos diferentes englobados en tres grandes clados. Estas PDIs tienen funciones y ubicaciones diferentes en la célula. Aunque no existen estudios de expresión de las PDIL en cebada, hay reportes para trigo y Arabidopsis, en los que se conoce más sobre sus dominios y posibles funciones (Zhu et. al., 2014).

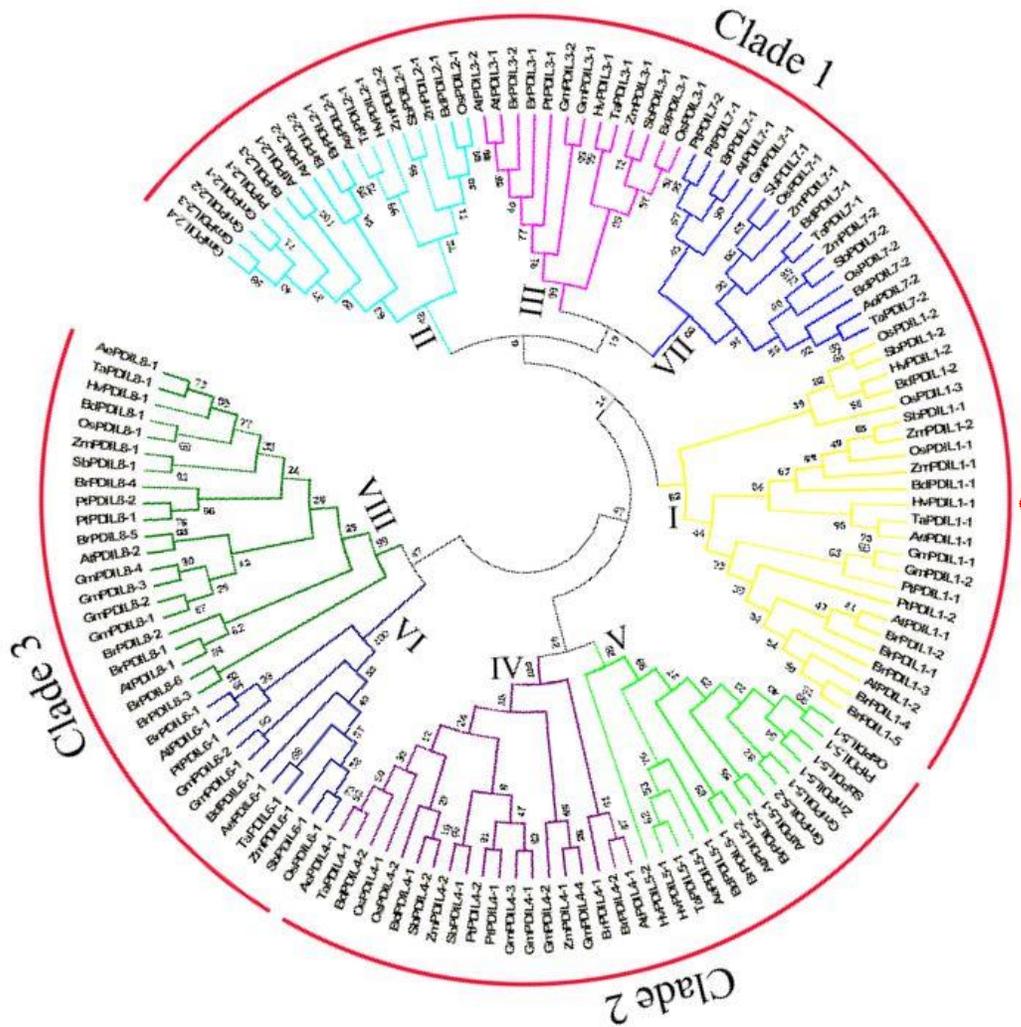


Fig. 11. Árbol filogenético de las proteínas PDIL de diferentes plantas. Se puede observar que Yan y colaboradores toman en cuenta 9 parálogos para trigo, pero sólo 7 para *Hordeum vulgare*. En el punto rojo del clado I está marcada la ubicación de la PDIL1-1 de cebada. (Yan et al., 2014).

En la Figura 12 se observa la expresión de diferentes isoformas de PDI en trigo, dónde la isoforma canónica, PDIL1-1, es la que tiene mayor expresión durante el llenado de semillas. Su transcrito aparece mayoritariamente entre los días 8 y 12 post-antésis, justo antes de que el grano comience a sintetizar sus proteínas de reserva (d'Aloisio et al., 2008).

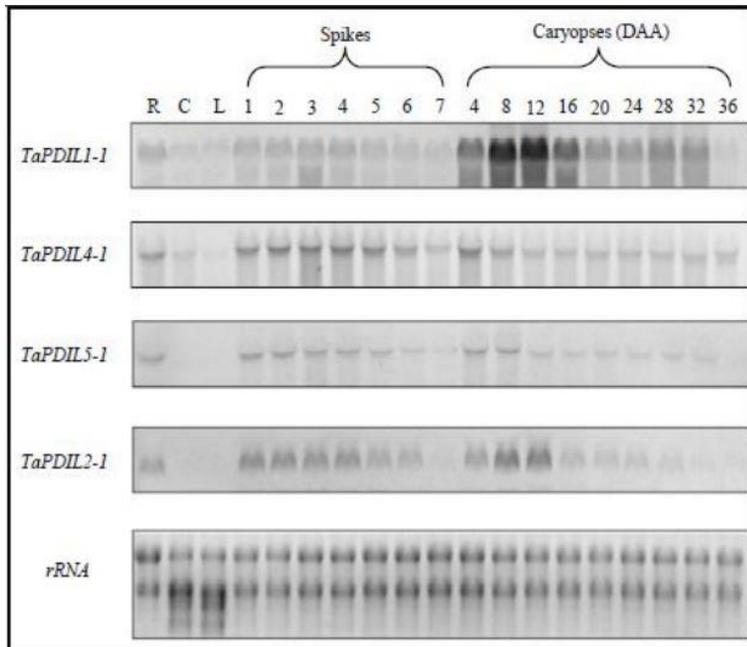


Fig. 12. Northern Blot de TaPDIL 1-1, TaPDIL 4-1, TaPDIL5-1 y TaPDIL2-1 en diferentes tejidos de trigo. R= raíces, C= coleptilo, L= hojas maduras, espigas a diferentes estadios de desarrollo y semillas recolectada a diferentes estadios de maduración. DAA, quiere decir días después de la antesis o florecimiento (d'Aloisio et al., 2008).

Por otra parte, en arroz se analizaron las proteínas almacenadas en grano de una mutante de PDIL1-1 observándose cambios importantes en la cantidad y calidad de proteínas (Fig. 13). En la mutante se apreció un visible aumento de proteínas de masa molecular intermedia a alta que podrían representar agregados de proteínas mal plegadas (Kim et al., 2012).

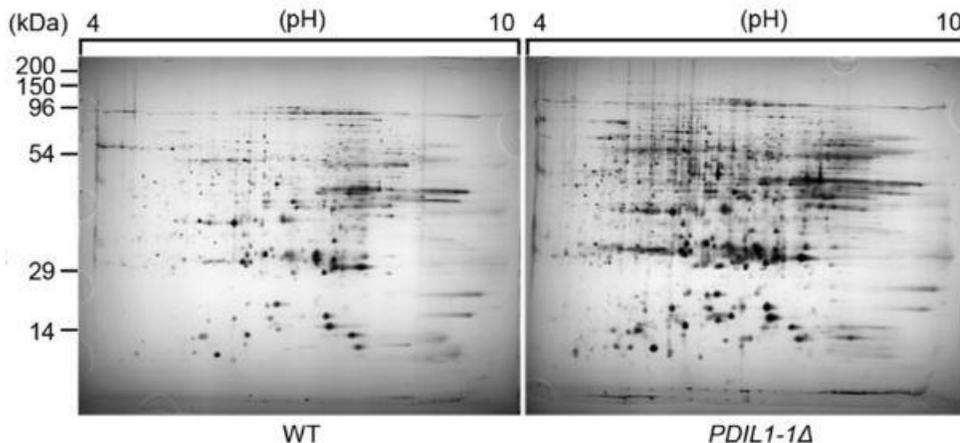


Fig. 13. Resolución de proteínas en doble dimensión. Comparación del contenido de proteínas entre un grano de arroz silvestre (WT) y uno mutante al que le falta el gen *PDI-Like* (*PDIL1-1*). Las mutantes que no tienen a este gen y por lo tanto a la proteína, acumulan mayor cantidad de proteínas de reserva que un grano de arroz normal. Kim et al (2012).

En los granos es dónde más acumulación de proteínas de reserva se da y por tanto donde la PDI tiene más actividad (Kim et al., 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 en cebada ha sido un aumento en los primeros días después de la fertilización (DAF), un pico aproximadamente al día 10 DAF y un posterior decremento de la transcripción de PDI (Hurkman et al., 1998). Algunos autores afirman que los niveles de transcritos de esta disulfuro isomerasa al día 30 ya son sumamente bajos en variedades de cebada consideradas buenas para el malteo como Karl cv. (ver Fig. 14; Kim et al., 2008). Todo lo anterior indica que una mayor cantidad de PDI1-1 es favorable para el adecuado plegamiento y acumulación de proteínas de reserva.

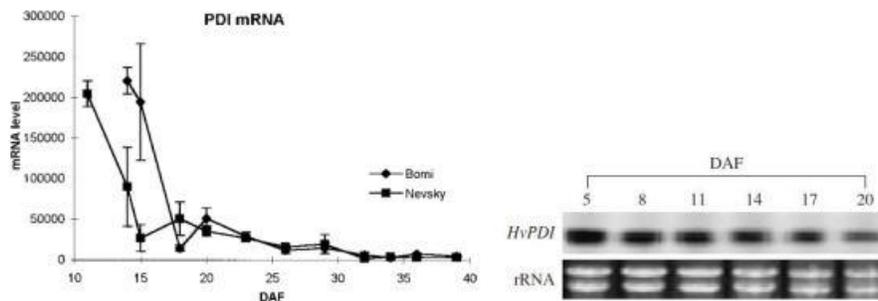


Fig. 14. Imagen de la izquierda, niveles de transcritos de la PDI a diferentes días de llenado de semillas después de la floración (DAF) entre dos variedades diferentes de cebada. Imagen de la derecha, Northern blot del gen PDI en cebada variedad Karl cv. a lo largo del llenado de semilla. El gel de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

Un ejemplo de otras PDIL que parecen interesantes pero no se han estudiado en cebada es la PDI-5. En *A. thaliana* se ha reportado que PDI-5 tiene funciones muy importantes en desarrollo correcto del embrión y muerte celular programada (PCD) en germinación o reabsorción del grano. La PDI-5 se localiza en retículo endoplásmico y cuenta con los dos dominios catalíticos CXXC y la secuencia

señal KDEL. La diferencia con la PDI canónica es que la PDI-5 es 91 aminoácidos más corta. La proteína es más abundante en flores y semillas inmaduras que el resto de tejidos. Por microscopía con inmunofluorescencia se detectó la presencia de PDI-5 en la capa de células endoteliales que recubren el embrión (Ondzighi et al., 2008). Su acumulación sufre un decremento conforme la semilla va madurando, alcanzando los niveles mínimos cuándo empieza la PCD, ya sea debido a la germinación del grano o su absorción. Estos procesos de muerte sirven para hacer uso del almidón y proteínas que están acumulados en las vacuolas de reserva en la capa de células que se encuentra junto al embrión, es decir, las células endoteliales.

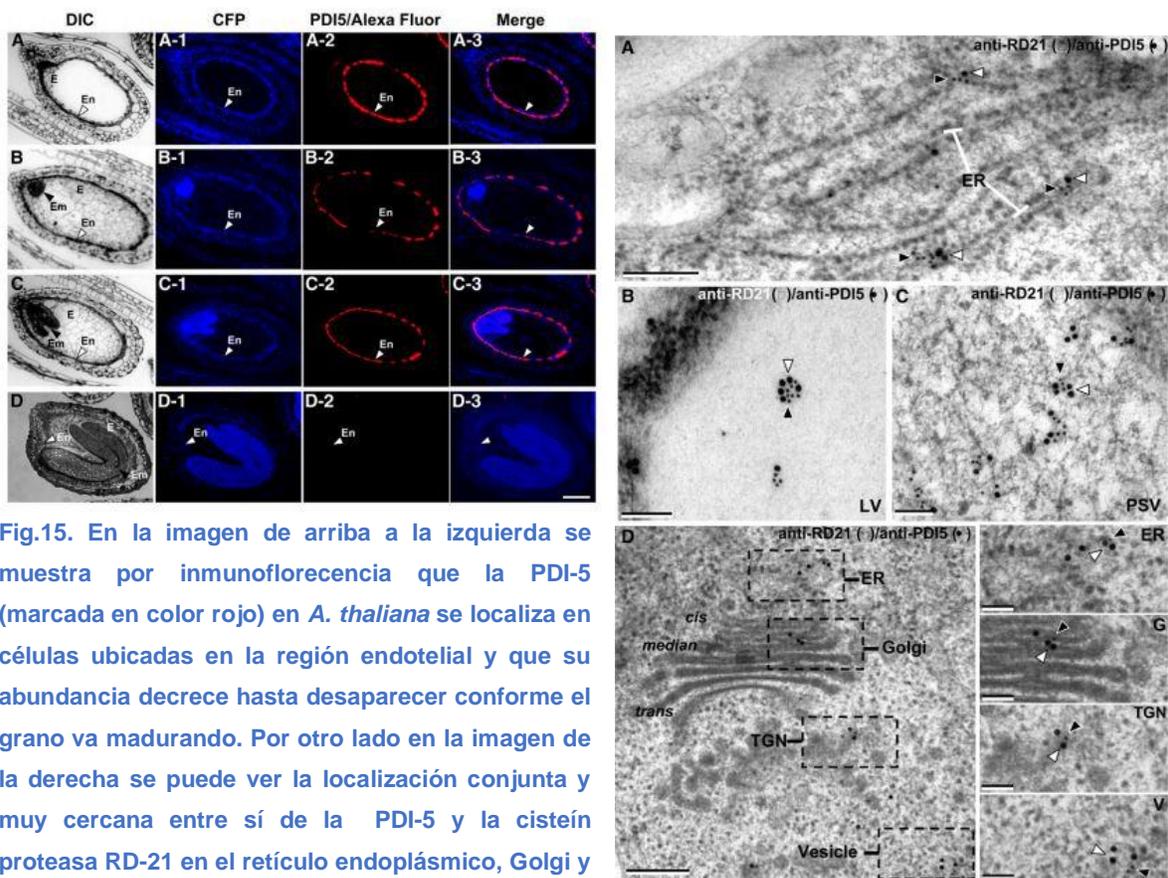


Fig.15. En la imagen de arriba a la izquierda se muestra por inmunofluorescencia que la PDI-5 (marcada en color rojo) en *A. thaliana* se localiza en células ubicadas en la región endotelial y que su abundancia decrece hasta desaparecer conforme el grano va madurando. Por otro lado en la imagen de la derecha se puede ver la localización conjunta y muy cercana entre sí de la PDI-5 y la cisteína proteasa RD-21 en el retículo endoplásmico, Golgi y vesículas de almacenamiento de proteínas y lípidos, sugiriendo un transporte conjunto. Las proteínas fueron marcadas con anticuerpos unidos a partículas de oro de diferentes tamaños. (Tomado de Ondzighi et al., 2008).

Ondzighi y colaboradores demostraron por ensayos de doble híbrido que la PDI-5 interacciona con 3 tipos de cisteín proteasas, entre ellas la RD-21. Al marcar anticuerpos anti-PDI-5 con partículas de oro se observó que su localización dentro de las células del endotelio estaba en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vacuolas tanto lítica como de almacén de proteínas. Sorprendentemente al marcar a la proteasa RD-21 se vio que aparecía en cúmulos en conjunto con la PDI-5 principalmente en ambos tipos de vacuolas. Al medir la actividad de RD-21 en presencia o ausencia de PDI-5 observaron que PDI inhibía la actividad de la proteasa. En ausencia de PDI-5 la muerte celular programada iniciaba más temprano y la semilla se abortaba, las vacuolas líticas y de acumulación se rompían. Esta información sustenta que PDI-5 tiene una función sumamente importante en el desarrollo adecuado del grano y establece tiempos para su germinación. Al parecer PDI-5 no sólo se puede encargar de acompañar proteínas de almacenamiento sino también las proteasas que las van a degradar y controlan los niveles de las mismas. En el artículo proponen que al haber mayores cantidades de PDI-5 cuando el embrión es joven, la chaperona inhibe la función de la cisteína proteasa RD-21, uniéndose a ella y transportándola hasta los cuerpos proteicos en las vacuolas de almacén. Al disminuir la expresión de PDI-5 con la maduración de la semilla, RD-21 se activa e induce la muerte celular programada en las células del endotelio que rodean el embrión, liberando las proteínas y almidón almacenados en las vacuolas para que sirvan de nutrientes para la planta que germinará. Esto es importante porque plantea otro tipo de interacción entre un tipo de PDI y las proteínas de almacenamiento, no sólo en su plegamiento y localización, sino también en sus tiempos de degradación.

El presente trabajo se enfocó en la PDI canónica relacionada con el plegamiento de proteínas de reserva, la PDI1-1. Esta proteína parece ser la encargada principal de plegar hordeínas a lo largo de desarrollo en cebada, sin embargo hay muy poca información al respecto. En la base de datos Ensembl Plants, para el genoma de cebada se proponen siete diferentes isoformas de PDI1-1 generadas por splicing alternativo que muestran tamaños y/o puntos isoeléctricos distintos

(Fig. 16). PDI – 201, PDI – 204, PDI – 203, PDI – 202, PDI – 205, PDI – 206 y PDI – 207.

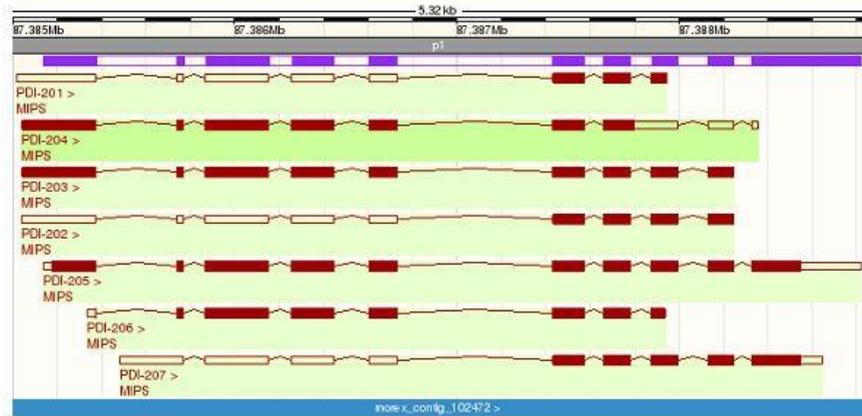


Fig.16. Las siete isoformas de PDI1-1 anotadas en Ensembl Plants (PDI-201, PDI-204, PDI-203, PDI-202, PDI-205, PDI-206 y PDI-207). Los rectángulos representan exones y las líneas intrones en el mensajero. Los rectángulos rellenos de rojo representan la parte que se traduce como parte de la proteína. Se puede ver que por lo mismo no todas las isoformas tienen los mismos dominios. La isoforma PDI-205 es la que codifica para la proteína completa, más abundante y hasta ahora la única identificada en su forma proteica.

En trabajos previos en el laboratorio se analizó la acumulación de los transcritos de la PDI1-1 a lo largo del desarrollo de las semillas de cinco variedades de cebada mexicana. Para esto, se sembraron semillas de cebada en el invernadero en diciembre del 2012 bajo condiciones de luz natural, temperatura no controlada y riego regular. Se comenzaron a obtener muestras de semillas en el mes de Febrero, 2013. El primer tiempo de recolección fue considerado cuando la espiga de cebada empieza a abrir, unos 10 días antes de la antesis o floración. A este se le considera el día 1. A partir de ahí se recolectaron muestras de semillas a los días 1, 5, 10, 15, 20 y 30. En la Figura 17 puede observarse la cinética de los transcritos de PDI a los días mencionados, normalizados por densitometría con un control de transcritos de 18 rRNA.

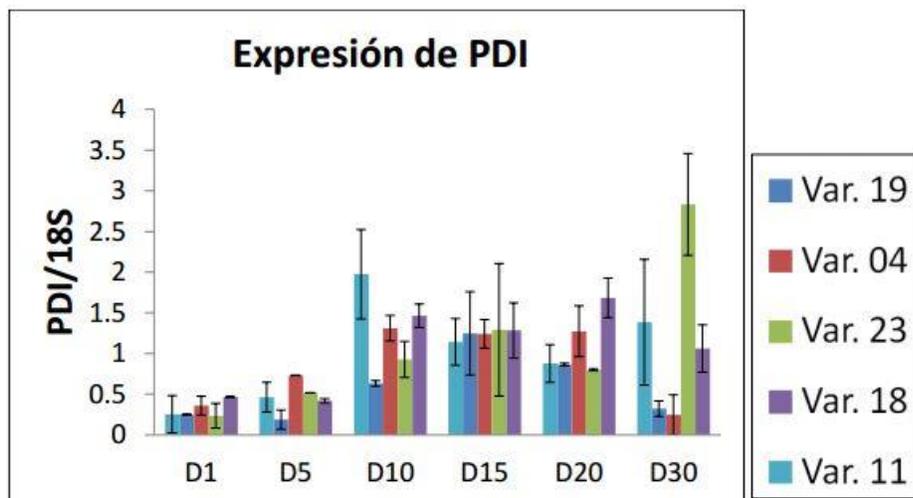


Fig. 17. Transcritos de PDI normalizados por densitometría con el control de rRNA 18S. Resultados obtenidos por PCR punto final. La desviación que se ve en las gráficas corresponde a réplicas técnicas de diferentes muestras obtenidas del mismo cultivo. Se observa que el pico general de transcripción se da entre los días 15 y 20 lo que corresponde a los días 5 y 10 después de la antesis. Kalinova-Jelezova, 2014.

La acumulación de transcritos de PDI para la variedad 11 ocurre a tiempos más tempranos que para las demás variedades. La variedad 23 presenta mayor acumulación de transcritos de PDI a tiempos más tardíos y las otras tres variedades, 18, 19 y 04 muestran cinéticas de acumulación de transcritos PDI similares durante el llenado de semilla. El pico de transcripción se da a los 15 días, y el de las hordeínas es al día 20, indicando que se necesita tener una mayor cantidad de PDI1-1 antes de empezar la síntesis de proteínas de reserva.

Los cebadores que fueron utilizados en este trabajo, podían detectar todas las isoformas posibles de la PDI 1-1 en cebada.

Otro dato que llamó mucho nuestra atención, fue la identificación de PDI1-1 en las manchas obtenidas por 2D con espectrometría de masas (Fig.18). Los péptidos que se comparan contra una base de datos en el sistema después de ser digeridos sugirieron que los cambios entre las variedades pueden ser de tipo post-traduccionales. En este sentido se encontró que en la variedad 23 no se detectaba la PDI 1-1 en la base de datos de Uniprot, pero si se detectaba en la base de datos de Uniprot de proteínas glicosiladas y con un puntaje muy alto. Para la variedad 19

no se vieron diferencias para la identificación entre las dos bases de datos. Esto nos lleva a la hipótesis de que la PDI de la variedad 23 podría presentar glicosilaciones diferentes a la variedad 19, haciéndola una isoforma post-traducciona, lo que a su vez podría influir en su localización en la semilla.



Variedad	PDI en la mancha	Score UNIPROT PROT NO GLIC	Score UNIPROT PROT GLIC
19	1	16479.1	16305.4
	2	16195.7	16195.7
	3	1009.56	1006.507
	4	920.68	920.68
23	14	-	16305.43
	15	-	-

Fig. 18. Manchas proteicas diferenciales que se analizaron por masas. Los recuadros I y II contienen los resultados obtenidos para PDI1-1 de las variedades contrastantes 19 y 23. Puede verse que para la variedad 19 se identifica PDI en las cuatro manchas identificadas en el gel, tanto en la base de datos de UNIPROT de proteínas glicosiladas como la de proteínas no Glicosiladas. En el caso de la variedad 23 se logra detectar PDI por masas sólo en la base de datos de proteínas glicosiladas en una de las manchas. Recuadro resumido de la Tabla 1 de los ANEXOS.

Con base a estos antecedentes nos planteamos la siguiente Hipótesis.

Hipótesis.

- Variedades mexicanas de cebada maltera que muestran una acumulación contrastante de proteínas de reserva en semillas, presentarán contenido diferencial de PDI o isoformas diferentes de esta proteína en el grano maduro.

Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar si la PDI1-1 se acumula diferencialmente o cuenta con isoformas entre las variedades mexicanas en semilla seca crecida bajo diferentes condiciones en campo y tiempos de llenado de semilla en invernadero para ser un potencial marcador molecular.

Objetivos particulares:

- Demostrar cuantitativamente la presencia diferencial de PDI1-1 entre variedades de cebada a nivel de proteína en semilla madura obtenida de las variedades de cebada crecidas en diferentes condiciones y épocas del año.
- Cuantificar la cantidad de la PDI1-1 durante diferentes etapas del desarrollo de semillas para las cinco variedades que se cultivan en México.
- Determinar si existen isoformas de la PDI1-1 diferenciales entre variedades de cebada mexicana y sus niveles de glicosilación.

Materiales y Métodos

Material biológico

Para este trabajo se utilizaron lotes de las cinco variedades crecidas en diferentes condiciones de campo e invernadero:

- 1) Semillas maduras de 5 variedades de cebada mexicana: HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11 provenientes del lote de campo de Mayo 2013, ya que estas fueron las semillas utilizadas en los experimentos previos de proteómica y de expresión de transcritos de PDI1-1.
- 2) Semillas provenientes de campo de las variedades HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11, todas sembradas en régimen de temporal, cosechadas en Mayo 2014.
- 3) Semillas provenientes de campo de las variedades HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11, todas sembradas en régimen de riego, cosechadas en el año 2015.
- 4) Semillas recolectadas en invernadero durante Febrero del 2013 a diferentes tiempos de maduración de la semilla, específicamente a los días 10, 20 y 30 después de que la espiga comienza a abrir. Son las mismas muestras con las que se realizó el estudio de transcritos de PDI1-1 de las variedades 19, 04, 11, 23 y 18, por lo que podría brindarnos una idea más amplia de cómo es el comportamiento de transcripción y traducción de la proteína. Se eligieron los anteriores tiempos de maduración del grano porque fueron en los que se detectó mayor expresión de transcrito de PDI1-1 y diferencias entre las variedades.
- 5) Semillas recolectadas en invernadero durante Julio del 2013 a diferentes tiempos de maduración de semilla (días 10, 20 y 30).



DÍA	SEMILLA							
1	3	5	10	15	20	30	40	SECA

Extracción de proteína total con el método de Fenol.

Para la obtención de proteína total, se utilizó un gramo de semillas maduras. A la muestra se le agregaron 5 ml de fenol saturado básico pH 8.8 y 5 ml de buffer de extracción consistente de 0.9 M de sacarosa, 10 mM de EDTA, 0.4% de 2-metamercaptoetanol (v/v), 100 mM de Tris-HCl, pH 8.8, inhibidores de proteasas-Complete TM (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, California, USA). La muestra se maceró con Politrón, se resuspendió y se centrifugó a 7000 rpm por 30 minutos para recuperar la fase fenólica en una Centrífuga refrigerada Sorvall ST-16R, rotor F15-6x50mL (Thermo Scientific). La proteína se precipitó con acetato de amonio 0.1 M en 100 mL de metanol absoluto, a - 80 °C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó por una hora a 7000 rpm para coleccionar el precipitado. Se lavó el precipitado 2 veces con 4 ml de Acetato de Amonio frío en metanol y luego 2 veces con 4ml de acetona al 80%. Posteriormente la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió el precipitado en buffer IEF (8 M de urea, 2 M de tiourea, 4 % CHAPS, 2% Triton X-100, 50 mM ditiotreitól, inhibidores de proteasas (CompleteTM, USA) y 1% v/v anfolitos ("IPG buffer" pH 4- 7, GE Healthcare) (Hajdúch et al., 2005).

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), usando una curva de concentración estándar de albúmina sérica de bovino (BSA).

Extracción de proteína citoplasmáticas.

Solución de extracción:

- HEPES 20 mM, pH 7.6
- KCl 20 mM
- EDTA 0.2 mM
- Glicerol 10%
- Triton 1%
- DTT 0.5 mM
- PMSF 2 mM
- Tableta de inhibidores de proteasas

La muestra se maceró en mortero con nitrógeno líquido, se resuspendió en la solución de extracción anterior y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos para recuperar la fase líquida.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), usando una curva de concentración estándar de albúmina sérica de bovino (BSA).

Electroforesis en una dimensión SDS-PAGE y transferencia.

En cada carril se colocaron 40 µg de las proteínas extraídas para cada variedad de cebada y se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de BIO-RAD modelo Mini-PROTEAN 3 cell, en tampón de corrida 1X (55 mM Tris, 431 mM glicina, 1% SDS) a 100 Volts, por aproximadamente 2 h. Las proteínas se transfirieron a una membrana para inmunoblot PVDF (Millipore), en buffer de transferencia (1X buffer de corrida y 20% de metanol) a 100 Volts, por 1 h.

Western Blot.

Las membranas se bloquearon durante una hora con leche al 5% en TBS -TT (68 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄.H₂O ,1 mM NaH₂PO₄.H₂O) y 10% tween 20 (BIO-RAD), seguido de una incubación toda la noche a 3°C con anticuerpos policlonales de suero de conejo dirigidos contra la proteína PDI a una dilución 1:5000. Al día siguiente, las membranas se incubaron por 1 hora con un segundo anticuerpo contra conejo a una dilución 1:10000 (New England Biolabs, USA). Entre cada incubación con el primer y segundo anticuerpo se realizaron 3 lavados con TBS y 10% tween 20, c/u por 15 minutos. La detección fue realizada con el sustrato quimioluminiscente Immobilon HRP (Millipore, USA) y registrada en el equipo ChemiDoc (BIO-RAD, México) con una exposición de 4.8 segundos. Se realizaron tres extracciones independientes de proteína a partir de semilla madura proveniente de campo del lote de mayo 2013 y tres extracciones de proteína de semilla madura de invernadero para el análisis por Western Blot con anticuerpos específicos contra la PDI1-1 obtenidos en conejo. Como control, para normalizar por la cantidad de proteína que se carga se utilizó la proteína Hsp70, para la que también contábamos con anticuerpos. Este anticuerpo detecta a una Hsp70 considerada constitutiva, por lo que es un buen control para los Western Blots realizados en nuestro laboratorio. Para la normalización, la densitometría de las bandas de PDI1-1 se dividió entre la de Hsp70.

Tinción con Coomassie coloidal.

Finalizada la electroforesis, se realizó un primer paso de fijación, incubando los geles en una solución 50 % v/v metanol durante al menos 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución de fijación y se incubaron los geles en solución de tinción (8 % p/v sulfato amónico, 2 % ácido fosfórico y 20 % metanol y 0.1 % de Azul de Coomassie G-250) durante, al menos, 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se destiñeron los geles con agua bidestilada, hasta alcanzar el contraste adecuado.

Tinción con Ponceau.

Se activó la membrana a transferir en metanol, se colocó en agua destilada y se sumergió unos 15 segundos a la solución de Ponceau. El exceso de colorante se lavó hasta que se distinguieron bien las bandas.

ELISA

a) Curva patrón.

Se diluyó el antígeno a una concentración final de 5 µg/mL en PBS 1X. Se colocaron en los pozos diluciones con las siguientes concentraciones del antígeno: 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3 µg/mL en los que la curva patrón es lineal. Esto se puede realizar añadiendo 100 µL de agua o PBS 1X en el pozo sin antígeno e ir aumentando la concentración de antígeno en los pozos tomando 20 µL del péptido y 80 de agua, 30 µL en 70 de agua, 40 µL en 60 de agua, 50 µL en 50 de agua y 60 µL en 40 de agua. Esto se realizó por triplicado en cada ensayo para determinar la curva patrón.

b) Para las muestras se tomó 1 µL de la extracción de proteínas y se diluyó en 1 mL de agua o PBS1X y de esta dilución se colocaron 100 µL por pozo.

La placa se selló con parafilm o su tapita y se dejó incubar toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó 3 veces con agua o PBS 1X.

Se agregaron 200 µL de buffer de bloqueo por pozo (PBS-Blotto o 1% leche en polvo, 1% BSA en 500 mL de PBS 1X) para evitar inespecificidades. Se dejó la placa bloqueando por media hora.

Se lavó nuevamente la placa 3 veces con agua o PBS 1X.

Se agregaron 100 µL del anticuerpo primario denominado 26 anti PDI en una dilución de 1: 4'000 en la solución de bloqueo. Se cubrió la placa con plástico adhesivo y se dejó incubando por 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavó la placa 3 veces con agua o PBS 1X.

Se agregaron 100 μL del anticuerpo anticonejo conjugado a Fosfatasa Alcalina en una concentración de 1: 10'000 diluido en la solución de bloqueo preparado justo antes de ser utilizado. Se cubrió la placa con un plástico adhesivo y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavó cada pozo con 200 μL de agua o PBS 1X 3 veces.

Se escurrieron bien los pozos y se agregaron 75 μL del sustrato (p-nitrofenilfosfato) por cada pozo lo más rápido posible. Se selló la placa con plástico. Se envolvió la placa con papel aluminio pues el sustrato es sensible a la luz y se dejó incubando por una hora a temperatura ambiente. Al cabo de una hora se leyó la placa a 405 nm.

Electroforesis en 2D

I. Primera dimensión: isoelectroenfoque, método ajustado del protocolo propuesto por Agrawal & Thelen (2009).

- 1) Se calculó el volumen de cada muestra necesario para cargar 200 μg de proteína y éste fue depositado en un tubo de microfuga de 1.5 mL.
- 2) Cada volumen se llevó a 185 μL con solución IEF, se añadieron 3.7 μL de anfotericina (Thermo) y se mezclaron bien con una micropipeta.
- 3) A continuación se centrifugaron por 15 minutos a 15,000 rpm.
- 4) El sobrenadante se distribuyó a lo largo del carril correspondiente en la bandeja de isoelectroenfoque.
- 5) Se tomaron tiras de gel de poliacrilamida de 7 cm con un gradiente inmovilizador de pH (IPG) en un intervalo lineal de 4-7 (Immobiline Dry Strip, BIORAD™), se separaron de su protector y se colocaron boca abajo sobre cada muestra en la bandeja evitando la formación de burbujas y asegurando que queden en contacto con los electrodos localizados en los extremos de cada carril.

- 6) Se colocó 1 mL de aceite mineral sobre cada tira para evitar deshidratación y encima las barras de seguridad.
- 7) La bandeja se transfirió a la unidad de isoelectroenfoque Protean i12 IEF Cell (BIORAD™).
- 8) Se programó una rehidratación activa (12 h, 20°C, a 50V), seguida del protocolo pre-cargado en el focalizador (BioRad Protocols, 07cm, 4-7 G) que consiste en 5 pasos de focalización: 500 V por 30 min (rápida), 1000 V por 1h (gradiente), 3000 V por 1h (gradiente), 5000 V por 2 h (gradiente) y 8,000V (rápida) por 3h, hasta un voltaje acumulado de 30-35 kVh.
- 9) Al terminar el isoelectroenfoque las tiras IPG se removieron de la charola y se les retiró el exceso de aceite mineral.
- 10) Posteriormente a cada tira se le aplicaron dos lavados, cada uno con 1.0 mL de ditiotreitól al 2% m/v en buffer de equilibrio SDS por 10 minutos para reducir los puentes disulfuro.
- 11) Finalmente, se les aplicó otro par de lavados, cada uno con 1.0 mL de solución de yodoacetamida al 2.5% m/v en buffer de equilibrio SDS a resguardo de la luz por 10 minutos para alquilar las cisteínas y evitar la regeneración de los puentes disulfuro.
- 12) Las tiras se mantuvieron en la última solución de los lavados hasta colocarlas en los geles polimerizados para la separación en segunda dimensión.

II. Segunda dimensión: Resolución por tamaño en gel SDS-PAGE.

- 13) Se cargaron con 3 µL de marcador de masa molecular y se colocó la tira sobre geles de poliacrilamida al 10%. Se selló con Agarosa al 1% en buffer de corrida teñida con buffer de carga.
- 14) La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de BIO-RAD modelo Mini-PROTEAN 3 cell, en tampón de corrida 1X (55 mM de Tris, 431 mM de glicina, 1% de SDS) a 100 Volts, por aproximadamente 2 h.

Tinción de glicoproteínas.

La tinción de glicoproteínas se llevó a cabo con el Kit de Pierce Pro-Q Emerald 300.

Preparación de las soluciones a utilizar:

- 1.1 Solución de reserva de Pro-Q Emerald 300. Se agregaron 6 mL de DMF (N, N, - dimetilformamida) al vial que contiene el reactivo Pro-Q Emerald 300 y se mezclaron suavemente hasta disolver el contenido. Alternativamente pueden usarse 6 mL de DMSO (dimetil sulfóxido) en vez de DMF, sin embargo el fondo del gel puede verse más intenso con el DMSO. Se resguardó la solución de reserva a una temperatura menor o igual a -20°C .
- 1.2 Solución de Fijación. Se preparó la solución de fijación con 50% metanol y 5% ácido acético en agua destilada. Un gel de 8 cm x 10 cm requerirá aprox. 200 mL de la solución de Fijación. Una membrana pre-transferida por Western Blot requerirá aprox. 50 mL de la solución de fijación. Un gel de 20 cm x 20 cm requerirá 2L de la solución de fijación.
- 1.3 Solución de Lavado. Se preparó una solución de 3% de ácido acético glacial en agua destilada. Un gel de 8cm x 10 cm requerirá 1 L de solución de lavado, una membrana 500 mL y un gel de 2D aprox. 8L. Un volumen adicional de 250 mL de 3% de ácido acético se utilizará en el paso 1.4.
- 1.4 Solución de Oxidación. Se agregaron 250 mL de la solución de 3% de ácido acético al bote del kit que contiene el ácido periódico y se mezclaron hasta que este se disolvió completamente.
- 1.5 Marcadores de masa CandyCane diluidos en buffer de carga. Para los estándares de glicosilación en un gel de 8 cm x 10 cm se diluyeron 0.5 μL de los estándares de CandyCane en 7.5 μL de buffer de carga y se mezclaron con Vortex. Esto resultará en aprox. 250 ng de cada proteína en el carril,

cantidad suficiente para la detección de las proteínas glicosiladas por la tinción con Pro-Q Emerald 300.

Tinción:

Esta tinción está optimizada para teñir geles de 8 cm x 10 cm de 0.5 a 1.0 mm de grosor o membranas de Western Blot. Teñir geles más grandes requiere más cantidad de reactivos y tiempos más largos de fijación y lavado.

- 2.1 Realizar la SDS-PAGE. Se separaron las proteínas por una SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de poliacrilamida) estándar. Generalmente las muestras se diluyen a 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer de carga y 5 -10 μL de la muestra diluida es cargada por carril en un gel de 8cm x 10 cm.
- 2.2 Transferir las muestras a una membrana (opcional). Las proteínas del gel separadas ya por su masa molecular pueden ser transferidas a una membrana PVDF utilizando los métodos estándar de electroblotting o transferencia. Esto no es un paso necesario, se pueden teñir las glicoproteínas en gel o membrana.
- 2.3 Fijar el gel. Se sumergió el gel en 100 mL de solución de fijación y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave por 45 min. Se repitió el paso de fijación para asegurarse de que el SDS está completamente lavado del gel.
- 2.4 Lavados. Se incubó el gel en 100 ml de solución de lavado (hecha en el paso 1.3) con agitación suave por 10-20 min. Se repitió este paso una vez más.
- 2.5 Oxidación de los carbohidratos. Se incubó el gel con 25 mL de solución de oxidación (hecha en el paso 1.4) con agitación suave por 30 minutos.

- 2.6 Lavados. Se incubó el gel en 100 mL de solución de Lavado con agitación suave por 10-20 minutos. Se repitió este paso dos veces más.
- 2.7 Preparar Solución de Tinción Pro-Q Emerald fresca. Se diluyó la solución de reserva Pro-Q Emerald 50 veces en el buffer de tinción Pro-Q Emerald 300. Por ejemplo, se diluyen 500 μ L de la solución de reserva Pro-Q Emerald 300 (hecha en el paso 1.1) en 25 mL del buffer de tinción para hacer suficiente mezcla para teñir un gel de 8 cm x 10cm.
- 2.8 Tinción de un gel. Se incubó el gel en oscuridad en 25 ml de solución de tinción de Pro-Q Emerald 300 (del paso 2.7) en agitación lenta por 90 - 120 minutos. La señal puede detectarse después de 20 minutos y la sensibilidad máxima puede ser detectada a los 120 min aproximadamente. No se dejó toda la noche.
- 2.9 Lavados. Se incubó el gel en 100 ml de solución de lavado a temperatura ambiente por 15-20 minutos. Se repitió este paso una vez más para un total de dos lavados.

Detección de la señal.

Pro-Q Emerald tiene un máximo de excitación a 280 nm y un máximo de emisión a 530 nm. Lo geles teñidos se pueden visualizar utilizando un transiluminador UV a 300 nm o el programa Pro-Q Emerald del fotodocumentador ChemiDoc de BIORAD.

Resultados

En la base de datos de Ensembl Plants se encontró que a partir del gen que codifica para PDI1-1 de cebada se podrían generar 7 isoformas posibles por splicing alternativo. En la Tabla 2 se resumen las características de las posibles isoformas de PDI1-1, así como la posibilidad de detección con los anticuerpos disponibles para esta proteína.

ISOFORMA	N° a.a.	P.M.	P.I.	KDEL	DOMINIO TIOREDOX	Ac1	Ac2
PDI-201	107	12,04	4.67	✘	0	✘	✘
PDI-202	162	18,04	4.71	✘	1	✘	✘
PDI-203	484	53,45	6.28	✘	2	✓	✘
PDI-204	411	45,38	6.58	✘	1	✓	✘
PDI-205	318	35,60	5.06	✘	0	✓	✘
PDI-206	513	56,42	4.73	✓	2	✓	✓
PDI-207	236	25,96	4.43	✓	1	✘	✓

Tabla 2. Características de las 7 isoformas propuestas para PDI1-1 de cebada en Ensembl Plants. En las columnas están indicados el número de aminoácidos, la masa molecular, presencia o ausencia de la secuencia KDEL, número de dominios catalíticos a, a' y la posibilidad de que estas isoformas se reconozcan por los anticuerpos Ac1 y Ac2 contra PDI que diseñamos.

Al analizar las secuencias de aminoácidos de las siete isoformas es notorio que cinco de ellas no cuentan con los dos dominios catalíticos a y a'. Esto nos lleva a pensar que las isoformas con menos dominios catalíticos podrían ser formas que pueden oxidar o reducir pero no isomerizar las proteínas blanco o bien que sean productos truncos, no funcionales de la proteína sugiriendo al splicing alternativo, en caso de darse, como una forma de regulación post-transcripcional. Por otro lado, las isoformas 201 y 205 no cuentan con dominios catalíticos de tiorredoxina. Al tener dominios de b' podrían unir pequeños péptidos y actuar más como chaperonas. En eucariontes se han encontrado proteínas sin dominios de tiorredoxina agrupadas en la familia de las PDI.

Sólo dos de las isoformas; 206 y 207 presentan la secuencia señal KDEL requerida para reingresar a retículo endoplásmico. Existen secuencias similares a KDEL que sirven para la misma función, sin embargo, en estas isoformas no se

han detectado dichas secuencias. Las características anteriores podrían ayudarnos a definir si alguno de los dominios es más o menos importante para la acumulación de proteínas de almacenamiento y si alguna de ellas se expresa más en variedades buenas o malas para malteo.

Al contar con anticuerpos que deberían de identificar estas isoformas como proteínas se procedió a hacer ensayos tipo Western Blot. A partir de los Western Blots de geles SDS-PAGE en una dimensión de proteína total se vio que ambos anticuerpos anti PDI lograban identificar solamente una banda. Esta banda correspondía al peso de la PDI1-1 canónica que contiene todos los dominios y la secuencia señal de KDEL. Los experimentos se hicieron por triplicado en las dos réplicas biológicas con las que contábamos (Semilla madura crecida en campo y en invernadero de diferentes lotes) y seguían sin identificarse isoformas proteicas de la PDI 1-1. Observamos, sin embargo, que había diferencias en la acumulación de PDI para cada variedad.

En la figura 19 se muestran los niveles de PDI1-1 en la semilla madura obtenida de campo (lote mayo 2013) normalizada con Hsp70 por densitometría de las bandas de Western Blot. Debajo de la gráfica se muestra un ejemplo representativo de las señales correspondientes a PDI1-1 y al control Hsp70. El gráfico de barras representa el promedio de las tres réplicas de extracción y se indica la desviación estándar para cada variedad.

Para el patrón de abundancia de la PDI en campo puede observarse que las variedades 19 y 11 son las que parecen contener más PDI1-1 en la semilla seca. La variedad 04 es la que les sigue en acumulación de la proteína y por último, las variedades 23 y 18 son las que menos PDI parecen tener. Se normalizó el valor de la variedad 19 como 1, para comparar los valores de las demás variedades respecto a ella.

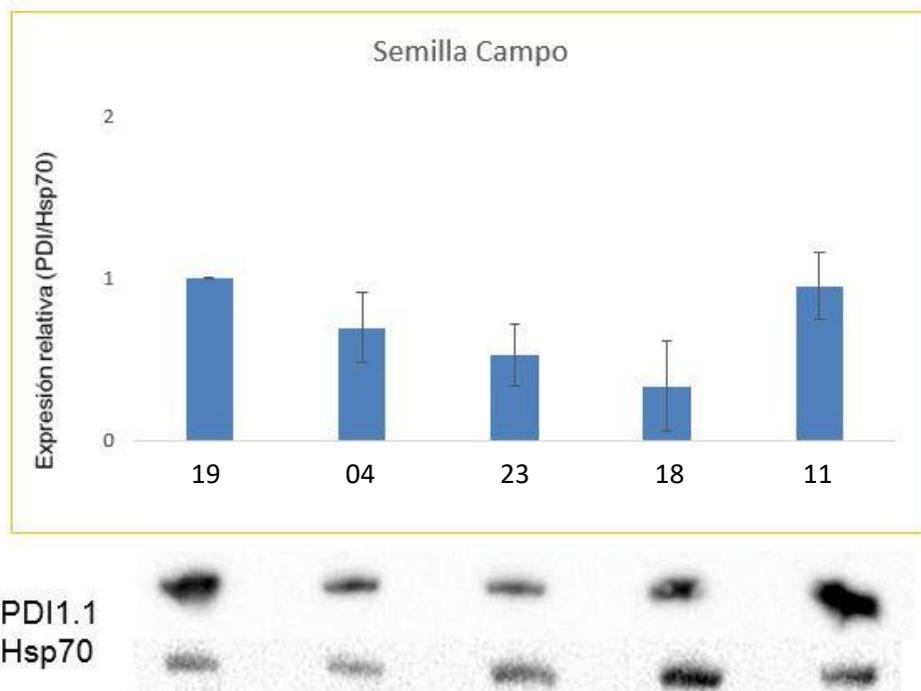


Fig. 19. Abundancia relativa de PDI1-1 con respecto a Hsp-70 en semillas maduras de diferentes variedades de cebada (19, 04, 23, 18 y 11) obtenidas de campo (lote Mayo 2013). La gráfica muestra el promedio de tres réplicas técnicas. Abajo se muestran los WB de una de las réplicas.

En la Figura 20 se muestra el patrón de contenido de PDI1-1 en semillas maduras a partir de plantas crecidas en condiciones de invernadero (Lote Febrero 2013, las plantas sembradas provenían de semillas de campo, lote Febrero 2012). Puede observarse que las variedades 19 y 11 son las que presentaron mayores niveles de PDI1-1, seguidas de 04 y 18, mientras que la variedad 23 es la que contenía menor cantidad de PDI1-1.

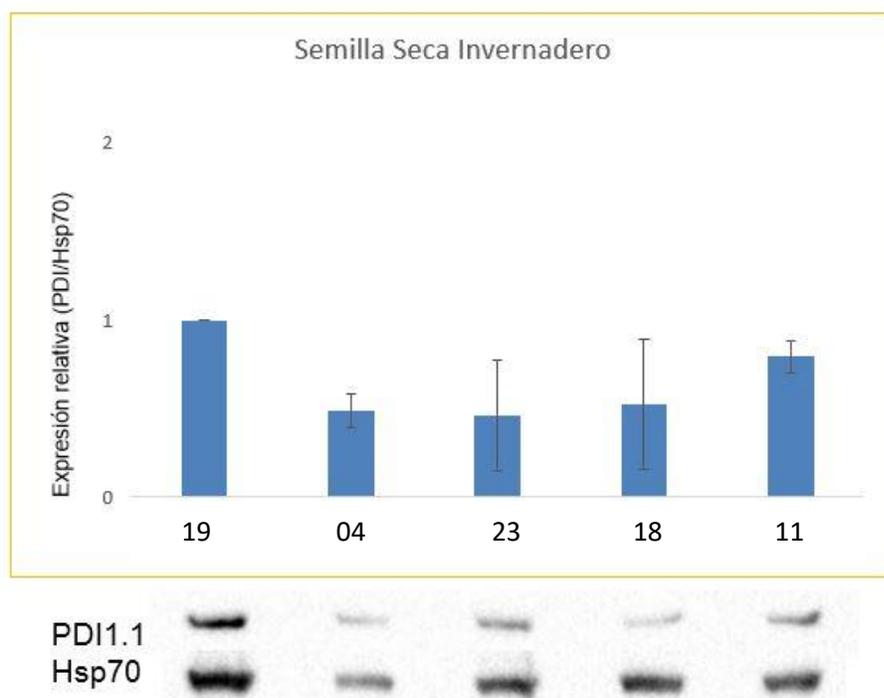


Fig. 20. Abundancia relativa de PDI1-1 con respecto a Hsp-70 en semillas maduras de diferentes variedades de cebada (19, 04, 23, 18 y 11) obtenidas en invernadero (lote Febrero 2013). La gráfica muestra el promedio de tres réplicas técnicas. Abajo se muestran los WB de una de las réplicas.

Dado que el análisis de proteínas mediante Western Blot es una herramienta semi-cuantitativa se decidió estandarizar un protocolo de ELISA para determinar de manera cuantitativa el contenido de PDI1-1 en las semillas maduras de cada variedad. Los resultados de los ELISAs son cuantitativos, ya que se compara el valor obtenido en las muestras contra una curva patrón estandarizada con los péptidos de la proteína contra los que se desarrollaron los anticuerpos cuya concentración se conoce.

Por ELISA para PDI1-1 se evaluaron muestras de semilla madura de las cinco variedades mexicanas 19, 04, 23, 18 y 11 obtenidas en condiciones de campo donde normalmente son sembradas. Es decir, las variedades 19, 23 y 18 crecieron en régimen de riego en el Bajío, mientras que las variedades 04 y 11 crecieron en régimen de temporal en la región de los Valles Altos. Los resultados para estas condiciones de siembra pueden observarse en la primer gráfica de la Figura 21,

que lleva por título campo mixto. Por ELISA se pudo observar más marcadamente que las variedades 23 y 18 tenían un menor contenido de PDI, en comparación con las variedades 19, 04 y 11. A diferencia de lo que veíamos en los Western Blots, dónde la variedad 04 parecía tener un contenido intermedio, en los ELISAs 04 muestra niveles similares a 19 y 11, definiéndose dentro del grupo de variedades que expresan mayor cantidad de PDI. La división en estos dos grupos; A) las variedades 23 y 18 con menor cantidad de PDI y B) las variedades 19, 04 y 11 con mayor cantidad de PDI se conserva. En réplicas en las que se contaba con la variedad Matcalfe, crecida en las mismas condiciones que las otras 5 variedades, se evaluó también su contenido de PDI. Se observó una menor cantidad de PDI en esta variedad, sin embargo, no es un dato que podamos comparar con los demás, ya que esta variedad es de dos hileras y no de seis, como es el caso de las otras variedades estudiadas. Habría que comprar su contenido de PDI contra otras variedades de cebada de dos hileras cuyo rendimiento maltero se conoce.

Para ver cuánta influencia ejercía el tipo de régimen de riego y en general las condiciones ambientales en las que se siembran las variedades, se utilizaron semillas de todas las variedades obtenidas de plantas sembradas bajo las mismas condiciones, ya sea todas sembradas en temporal o todas sembradas en riego. También se analizaron por ELISA muestras de semillas obtenidas a partir de plantas crecidas en condiciones de invernadero (gráficas correspondientes en la Figura 21). Los resultados indicaron que a pesar de los cambios ambientales el patrón diferencial de expresión de PDI entre variedades se conserva.

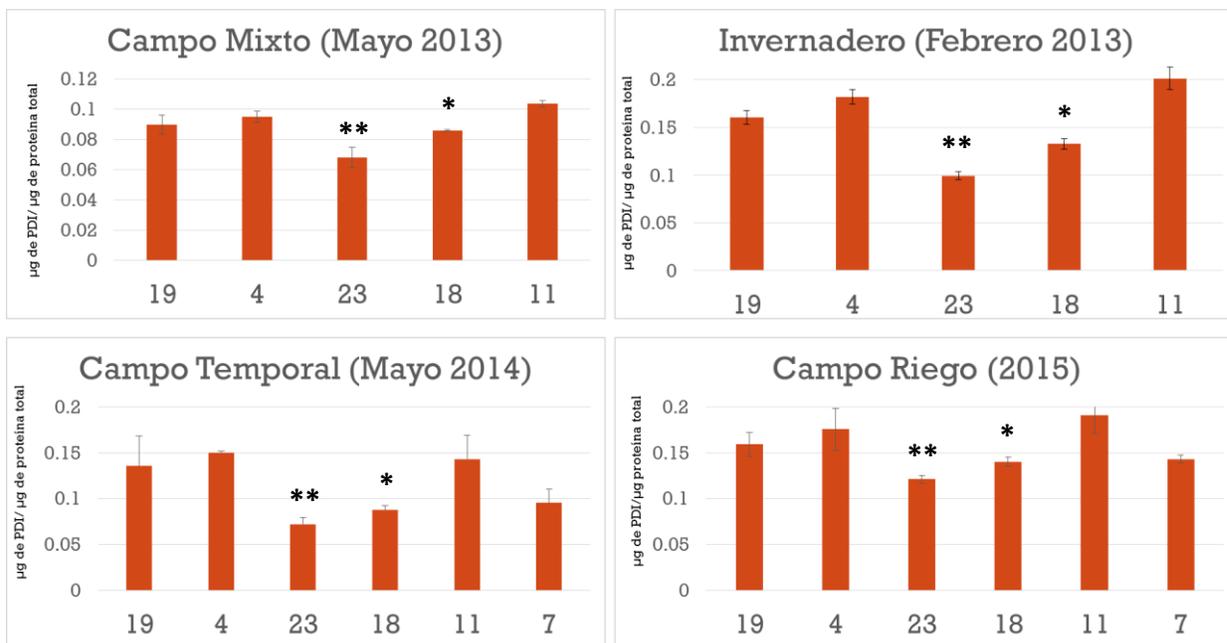
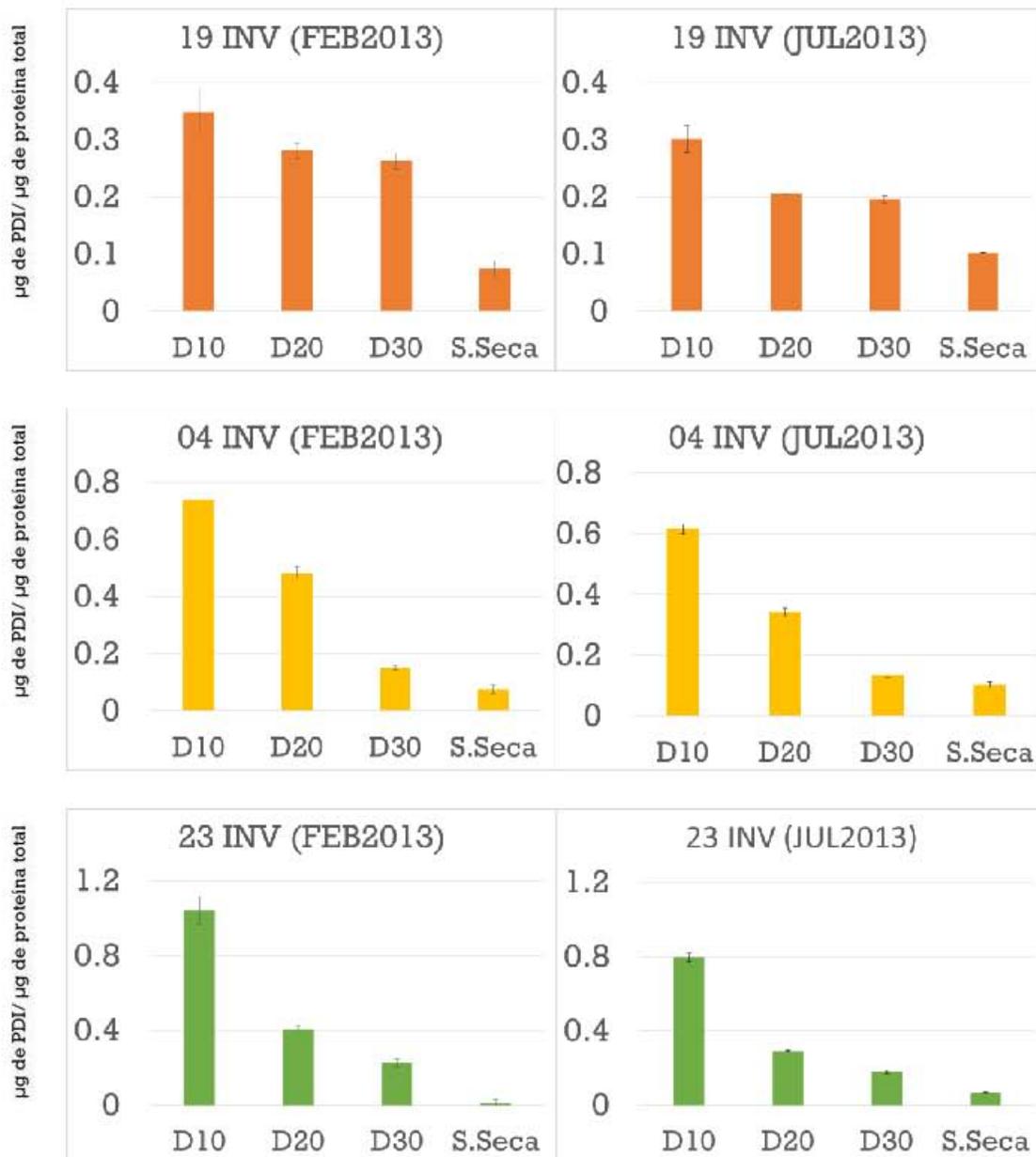


Fig. 21. Resultados de ELISA para el contenido de µg de PDI1-1 por µg de proteína total en las variedades mexicanas estudiadas (19, 04, 23, 18 y 11), así como la variedad Metcalfe (07) sembrada en México. La gráfica a la izquierda arriba muestra la cantidad de PDI1-1 por cantidad de proteína total en las condiciones en las que normalmente estas variedades son cultivadas. Arriba a la derecha se muestra la acumulación de PDI1-1 en muestras de semilla madura obtenida en condiciones de invernadero. Las dos gráficas de abajo representan a las 5 variedades en estudio y la variedad 07, crecidas todas bajo las mismas condiciones en temporal (izquierda) o riego (derecha). Puede verse que el patrón de abundancia de PDI se mantiene en todas las condiciones estudiadas. Los asteriscos sobre las variedades 23 y 18 denotan que son estadísticamente diferentes. Al hacer un análisis ANOVA con pruebas de Tukey y Dunnett se vio que la diferencia entre la variedad 23 y las demás es significativa con una $p < 0.01$ y que la variedad 18 es diferente con una $p < 0.05$. Ver la Fig. 2 de ANEXOS.

Dado que el contenido de PDI1-1 en semilla madura representa los niveles adquiridos durante el desarrollo y posible degradación durante secado, resultaba interesante conocer si a etapas tempranas en el llenado de grano las variedades también presentaban diferencias en la expresión de PDI1-1. Para ello se realizaron ensayos de ELISA durante el llenado de grano en condiciones de invernadero. Se eligieron los días 10, 20 y 30 posteriores al espigado, ya que representan las etapas iniciales, intermedias y finales de la maduración antes del secado de la semilla. En el análisis se incluyó la semilla madura obtenida de ese mismo lote de invernadero (Febrero 2013).

En la Figura 22 están representados los resultados del análisis de abundancia de PDI1-1 para dos lotes diferentes (réplicas biológicas) de plantas crecidas en

invernadero en diferentes épocas del año (cosechas Febrero 2013 y Julio 2013). Cada análisis cuenta con tres réplicas técnicas y su desviación estándar. Nuevamente vemos que se observa reproducibilidad en los contenidos de PDI1-1 por variedad a lo largo del desarrollo entre las réplicas biológicas.



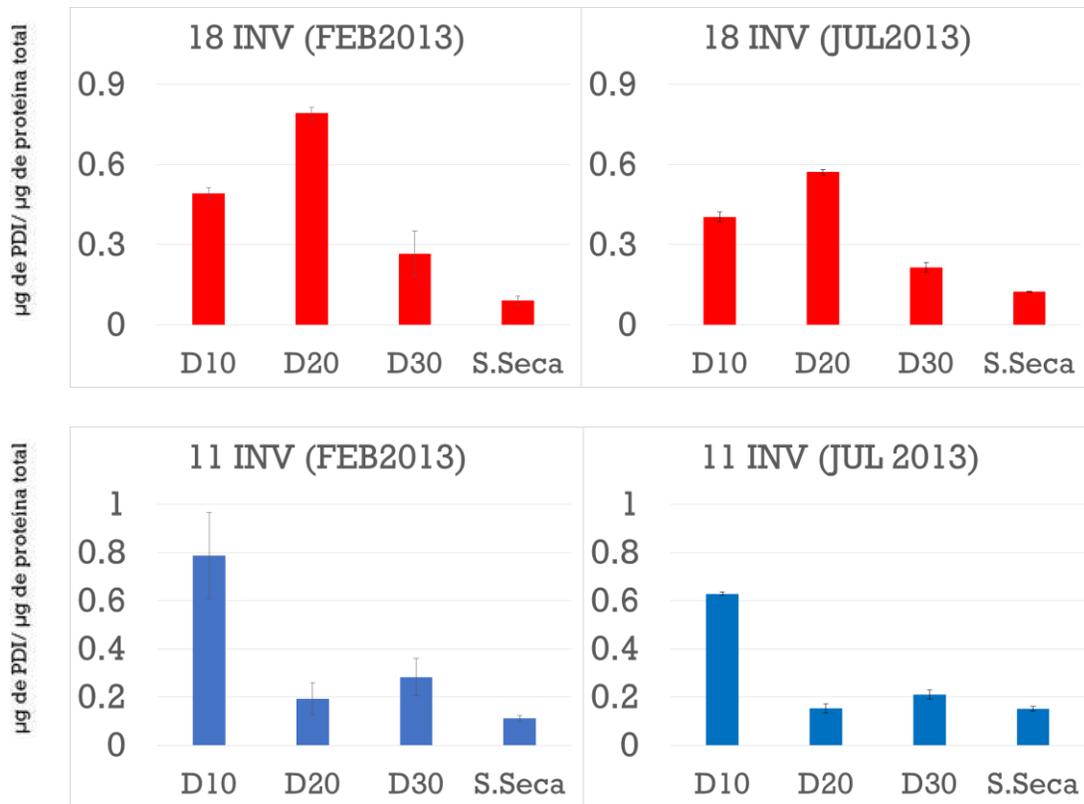


Fig. 22. Comparación de la abundancia de PDI1-1 a lo largo del llenado de grano entre las cinco variedades mexicanas (19 – naranja, 04 - amarillo, 23 – verde, 18 – rojo y 11 – azul) entre dos diferentes lotes obtenidos en invernadero en diferentes épocas del año. Puede observarse que los patrones de acumulación se conservan entre las dos réplicas biológicas y suelen presentar una disminución en el contenido de PDI1-1 a medida que avanza la maduración, con excepción de la variedad 18, dónde el pico de abundancia de PDI1-1 es al día 20.

Como en experimentos previos se contaba con el perfil de expresión de transcritos de PDI1-1 a lo largo del llenado de grano para las mismas muestras, se decidió comparar los comportamientos de transcritos vs. proteína, tomando como referencia al día 10 para ambos (valor de 1). En la Figura 23 se observa que para la mayoría de las variedades existe una relación entre niveles de transcrito (gráfica de la izquierda) y de proteína (gráfica de la derecha), excepto para la variedad 23 al día 30 (flecha rosa).

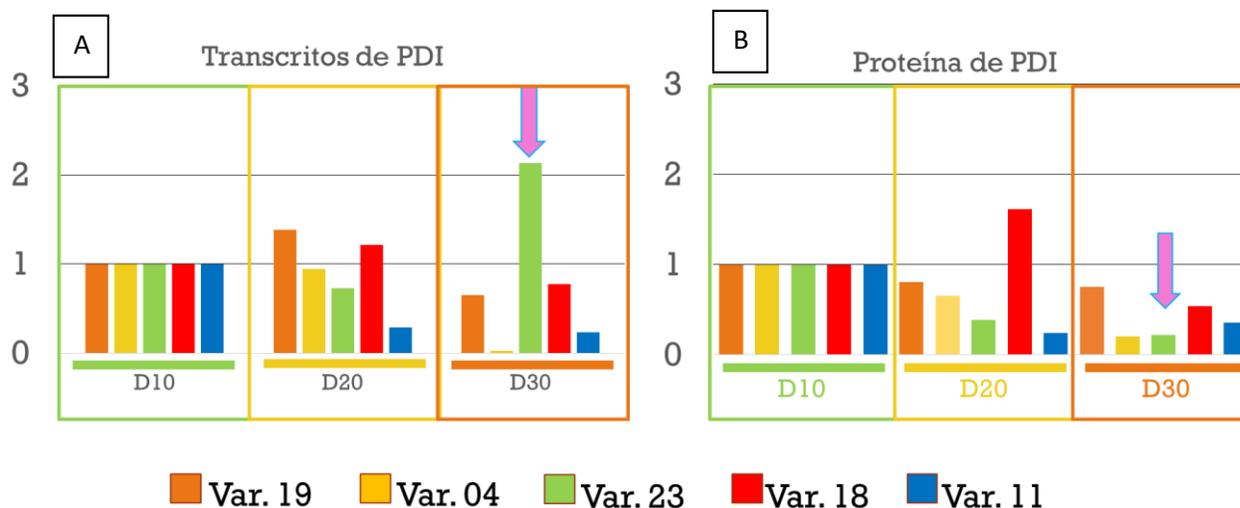


Fig. 23. Comparación entre los niveles de transcritos y la abundancia de proteína para PDI1-1 a lo largo del llenado de grano en cinco variedades mexicanas de cebada. A) Cinéticas de expresión de los transcritos de PDI1-1 a lo largo del llenado de grano (D10, D20, D30) para el lote de invernadero (Febrero 2013). B) Cinética de abundancia de la proteína a partir de las mismas muestras que en A.

En el análisis inicial de proteómica realizado para las cinco variedades, donde se identificó por espectrometría de masas la presencia de PDI en diferentes manchas del gel, podíamos dividir a las variedades en dos grupos: 19, 04 y 11 con cuatro manchas representativas para la proteína con puntos isoeléctricos entre 5 y 5.5 y las variedades 23 y 18 con dos manchas en los geles con pI entre 4.5 y 5. Este comportamiento de las cinco variedades en dos grupos correlaciona con el contenido de PDI1-1 encontrado por ELISA de la siguiente manera: Las variedades 19, 04 y 11 muestran mayor contenido de PDI1-1 en la semilla madura, mientras que 23 y 18 presentan menor contenido.

Dado que en la resolución obtenida para PDI1-1 en SDS-PAGE de una dimensión, nunca fue posible distinguir más de una banda correspondiente a la proteína, se decidió realizar un Western Blot, en geles de dos dimensiones para tratar de identificar con anticuerpos la ubicación diferencial de las isoformas de PDI1-1 entre variedades. Al probar lo anterior se visualizaron diferencias en la localización de la señal del Western Blot, indicando que la señal para 04, 19 y 11 se ubica entre pI 5 y 5.5, mientras que para 23 y 18, la señal se encontró entre pI 4.6 y 5.1. Sin embargo, debido a la elevada sensibilidad del anticuerpo contra PDI1-1 que

daba señales muy saturadas a los tiempos mínimos de exposición a pesar de variar su concentración, no fue posible distinguir las cuatro diferentes manchas para las variedades que se observan en los geles de 2D. Por otro lado, la sensibilidad del anticuerpo permitió distinguir señal en otros puntos de la membrana, a masas moleculares más pequeñas que la correspondiente a PDI1-1 canónica. Estos puntos no tienen una correspondencia con las isoformas proteicas que esperaríamos obtener a partir de los transcritos anotados en Ensembl Plants y a pesar de que no se descarta la posibilidad de que si sean isoformas de proteínas no completas, también podría tratarse de PDIs atrapadas en cúmulos con otro tipo de proteínas o formas degradadas de la proteína canónica.

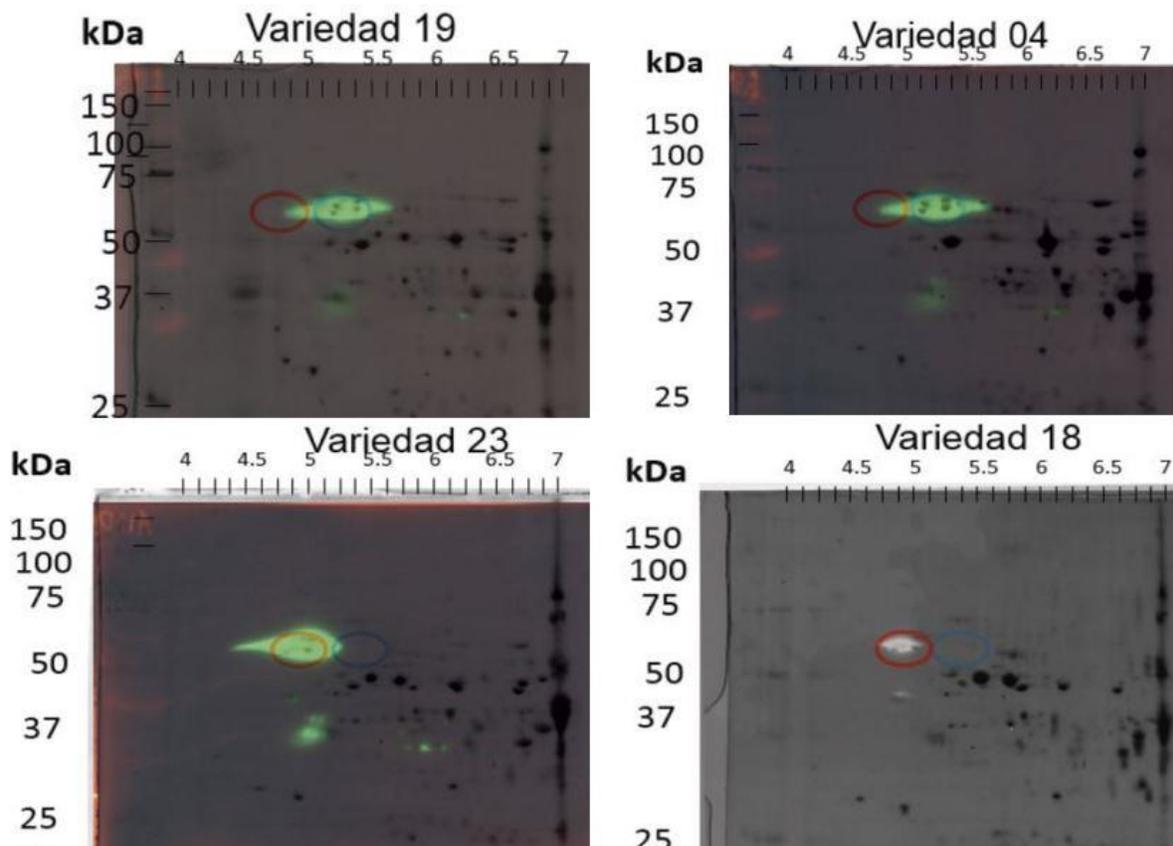


Fig. 24. Análisis de PDI1-1 por Western Blot en geles 2D separados primero por punto isoeléctrico en un intervalo de pH 4 a 7 y luego por masa molecular. Puede observarse que las variedades 19 y 04 muestran señal en una región más básica que las variedades 23 y 18 cuya señal se encuentra en una región más ácida con respecto a las anteriores. Estas últimas presentan señales adicionales a masas moleculares por debajo de la correspondiente a PDI1-1 canónica.

Los datos obtenidos por espectrometría de masas nos arrojaron otros resultados muy llamativos; las cuatro manchas para la variedad 19 que contienen PDI1-1 se identificaron en la base de datos de Uniprot para proteínas no glicosiladas y glicosiladas, en contraste, para las manchas de la variedad 23 sólo una de ellas dio resultado positivo para PDI1-1 y únicamente en la base de datos para proteínas glicosiladas. Esto nos pareció una razón importante para buscar diferencias entre las PDI1-1 de las variedades a nivel de glicosilación. Este tipo de cambios post-traduccionales podrían explicar cambios en la masa molecular o el punto isoeléctrico entre variedades.

Para comprobar la glicosilación de PDI1-1 era necesario tratar de purificarla de los extractos totales de proteínas. Se decidió intentar inmunoprecipitarla, dado que contábamos con el anticuerpo. Por el método de extracción con fenol las proteínas resuspendidas en buffer IEF o Urea 6M, no funcionarían para realizar una inmunoprecipitación adecuada. Tomando en cuenta este problema se utilizó un nuevo método de extracción de proteínas sin el uso de fenol. Este método es normalmente utilizado para obtener extractos de proteínas citoplasmáticas. En la Figura 25 se muestra una comparación entre la resolución de proteínas extraídas por los dos métodos (fenol vs. extractos citoplasmáticos). Se puede observar que existen amplias diferencias en cuanto a patrones y cantidades de proteínas en las extracciones. La nueva extracción enriquece más a proteínas citoplasmáticas, en cambio la de fenol, extrae de mejor manera proteínas localizadas dentro de compartimentos membranosos como es el retículo endoplásmico. En el caso de la PDI1-1, al ubicarse en el retículo endoplásmico, es más conveniente utilizar la extracción con fenol, sin embargo la extracción sin fenol resultaría útil para inmunoprecipitar la proteína. Se verificó que la PDI1-1 se detectaba mediante Western Blot, así que a pesar de las diferencias que se observaron en la tinción de proteínas con Coomassie se encontró que, por el nuevo método, también se extrae la PDI1-1.

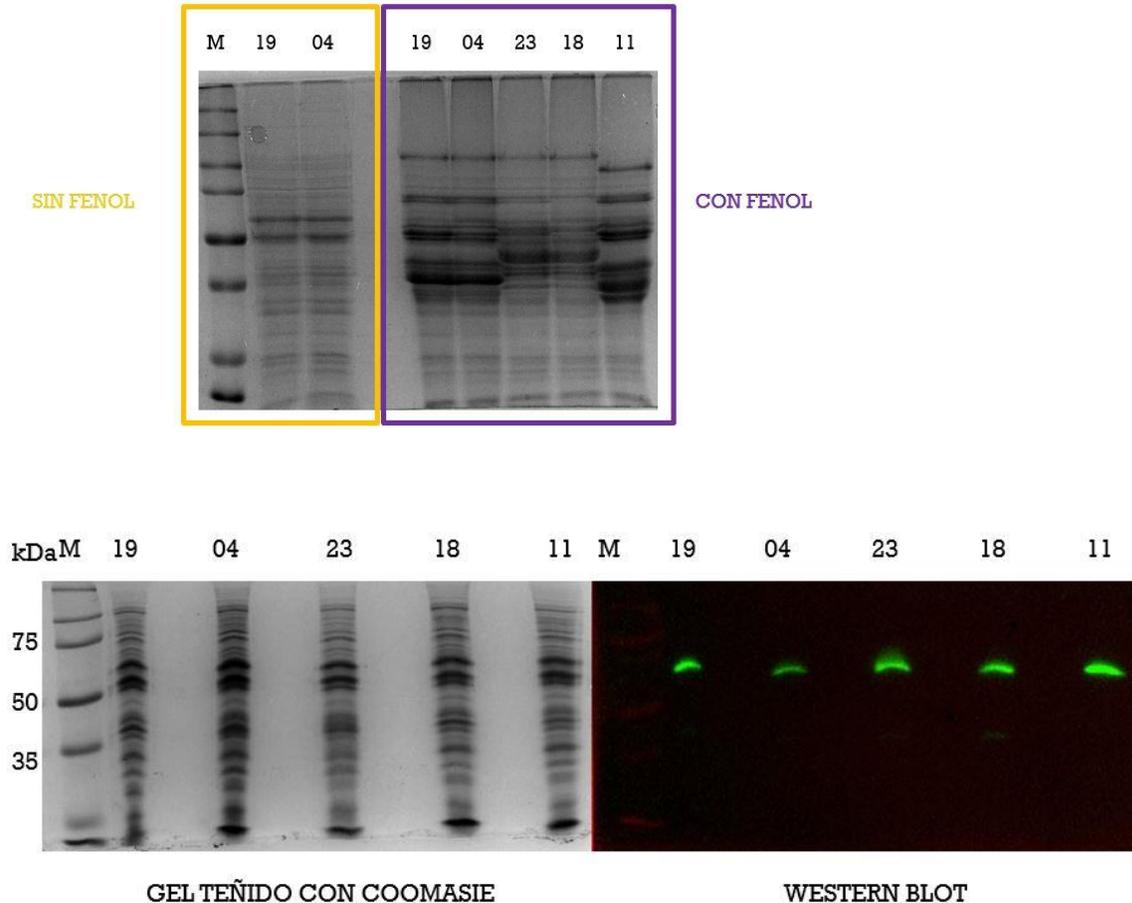


Fig. 25. Extracción de PDI1-1 sin fenol. Los Geles superiores representan la extracción de proteínas con y sin fenol, resueltas en SDS-PAGE y teñidas con Coomassie. Se observan diferencias entre la cantidad y patrones de proteína extraída por un método y por el otro. La imagen inferior muestra la detección de PDI1-1 en los extractos de proteína sin fenol mediante Western Blot.

Teniendo el extracto de proteínas sin fenol se prosiguió a inmunoprecipitar la PDI. En los geles de la Figura 26 pueden observarse en el Western Blot las bandas de PDI entre los 75 y 50 kDaltones, las bandas de la cadena pesada de los anticuerpos a una altura de 50 KDa y las bandas ligeras de los mismos entre los 35 y 25 kDa. Se utilizó suero pre-inmune como control negativo, dónde es posible observar las bandas correspondientes a las cadenas pesada (50 kDa) y ligera (20 kDa) de los anticuerpos, pero no la banda de la PDI. Puede observarse que la proteína deseada se inmunoprecipitó ya que la banda observada en el extracto después de la IP (Inmunoprecipitación) y la del extracto crudo, que es el control

positivo, coinciden en masa molecular. Sin embargo la cantidad inmunoprecipitada de PDI era muy poca.

Variedad 19

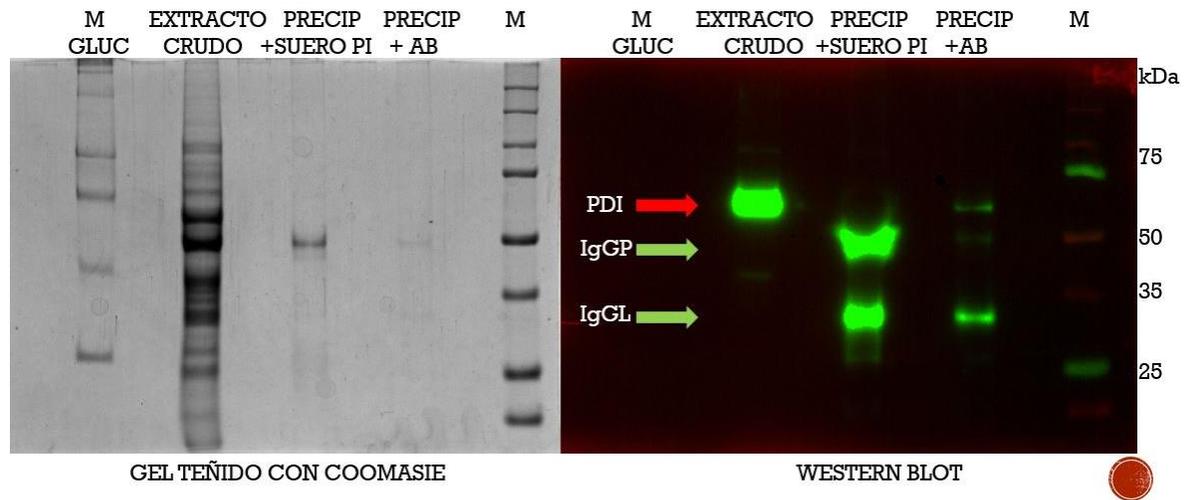


Fig. 26. Inmunoprecipitación de PDI1-1. Para la variedad 19 se muestran el gel de proteína total (extracto crudo), inmunoprecipitación con suero pre-inmune (PI) y con anticuerpo anti-PDI1-1 (AB) tenido con Coomassie (izquierda) y el Western Blot para PDI1-1 correspondiente (derecha). Se observa que el extracto crudo de proteína total presenta una sola banda del tamaño correspondiente a PDI1-1, la inmunoprecipitación utilizando suero PI muestra dos bandas correspondientes a las cadenas pesada y ligera de las IgGs generadas por el conejo. En el carril del suero PI no se observa la señal de PDI1-1 (control negativo). Por último, en el carril del precipitado + AB, se visualiza la banda de la PDI1-1, seguida de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos. M es el marcador de peso y M GLUC otro marcador de peso con proteínas glicosiladas.

Para ver el estado de glicosilación de PDI1-1. en las 5 variedades con el Kit Pro-Q Emerald 300 se probó primero con extractos de proteína total por el método sin fenol. Se pudo ubicar la banda de PDI glicosilada al sobreponer las imágenes con su identificación en Western Blot.

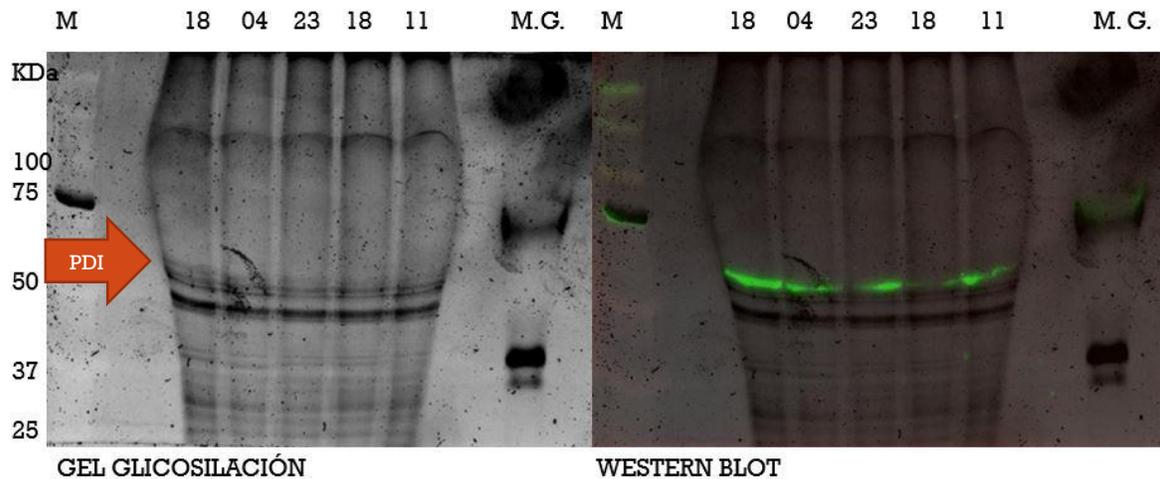


Fig. 27. Glicosilación de PDI1-1. En el gel de la izquierda se muestra el estado de glicosilación de las proteínas totales extraídas sin fenol. A la derecha se muestra el Western Blot de las muestras, revelando la banda correspondiente a PDI.

Para estar seguros de que se trata de la PDI1-1, la mejor manera es ver el estado de glicosilación de la proteína inmunoprecipitada y dado que el anticuerpo es específico, se deberían observar tres bandas, la correspondiente a PDI y las correspondientes a las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos dado que las IgGs se encuentran glicosiladas. Esto es lo que se observa en la Figura 28, encontrándose la señal de glicosilación para la banda correspondiente a la masa molecular de PDI1-1 en las 5 variedades de cebada, así como en las bandas correspondientes a las cadenas pesada (~50 kDa) y ligera (~20 kDa). Sin embargo, la señal es muy tenue para analizar las diferencias entre las variedades de cebada.

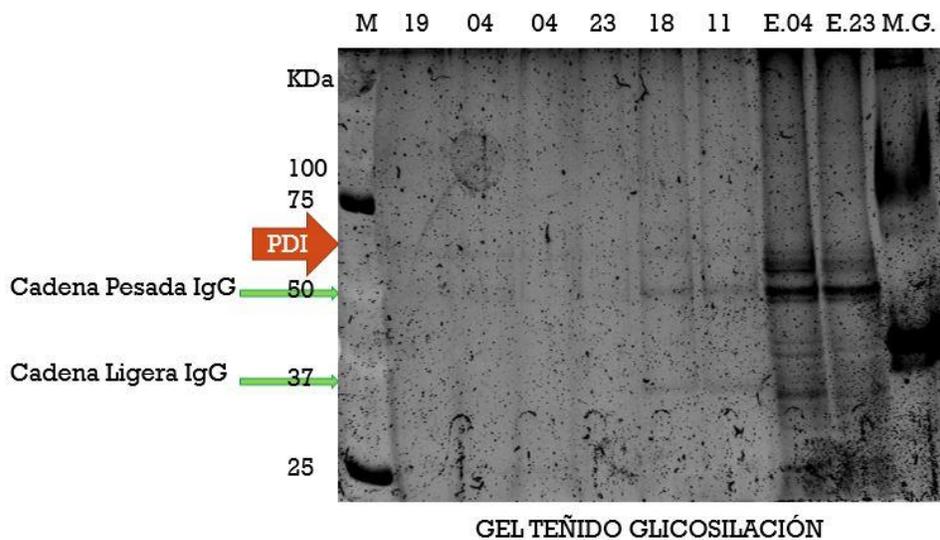


Fig. 28. Identificación de la glicosilación de PDI1-1 en inmunoprecipitados. En el gel se muestra el estado de glicosilación de las inmunoprecipitaciones en las cinco variedades a partir de proteína total extraída sin fenol. La banda más alta, señalada con la flecha naranja indica la posición de PDI1-1, en verde se indican las bandas correspondientes a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo respectivamente. Las muestras que tienen una E. indicada antes de la variedad se refiere a que se cargó extracto crudo de proteína total a partir de la que se hicieron las inmunoprecipitaciones. M.G. se refiere al marcador de glicosilación.

A continuación, en la figura 29 se detectó la glicosilación de PDI en extracto de proteína total extraída por el método con fenol (ver Métodos). En estos extractos, fue posible observar una mayor cantidad de proteínas glicosiladas incluyendo la PDI1-1 que fue reconocida con el anticuerpo específico mediante Western Blot y se indica con una flecha en la imagen de superposición entre la detección mediante Pro-Q Emerald 300 y el Western Blot. En este tipo de extractos se observó que existe una diferencia en la cantidad de PDI entre variedades, consistente con los resultados previos, así como en la intensidad de bandas de proteínas glicosiladas entre las variedades.

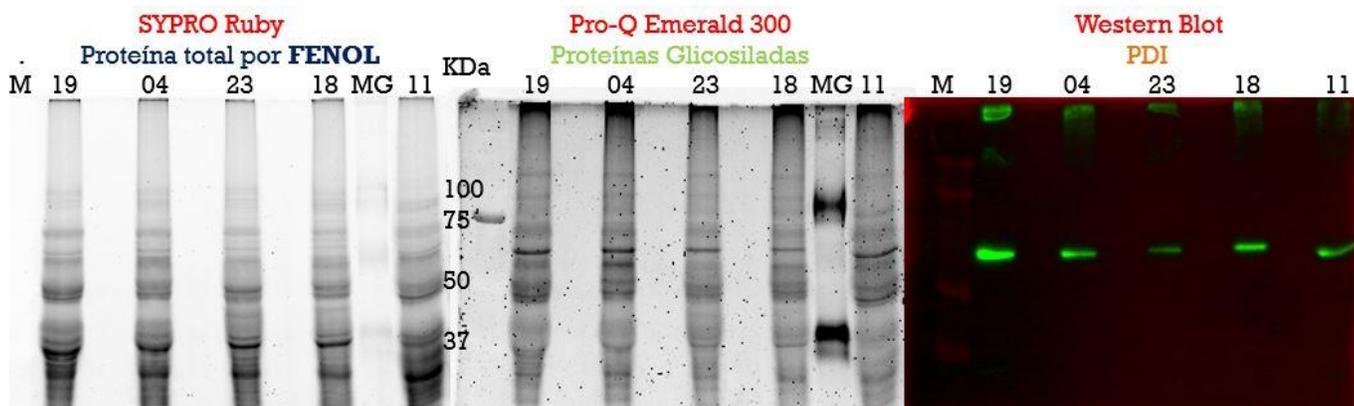
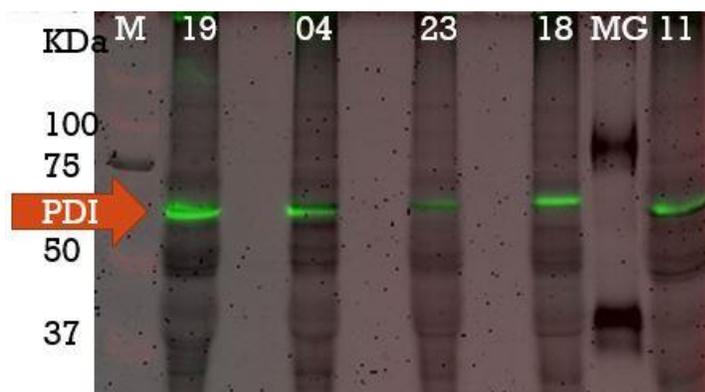


Fig. 29. Niveles de glicosilación de PDI1-1 en extractos de proteína con fenol. En las tres fotos de arriba se muestran las bandas de proteína total extraída por fenol, el patrón de glicosilación de proteína total y el Western Blot de PDI para las 5 variedades. En la figura de abajo las imágenes están superpuestas, confirmando que la banda que se ve más intensamente entre las bandas de masa de 50 y 75 kDa es la PDI. También puede observarse que existe diferencia en el patrón de glicosilación entre variedades mexicanas de cebada.



Para averiguar si había diferencias en la glicosilación de PDI1-1 para cada variedad, se hizo un análisis semi-cuantitativo de densitometría para el gel de glicosilación y el Western Blot correspondiente. En el análisis se compararon los datos de la intensidad de la banda glicosilada, identificada como PDI1-1, con la intensidad de la señal de PDI1-1 identificada por Western Blot. Estos resultados fueron normalizados por la densitometría de proteína total para estar seguros de que los cambios observados no se deban a diferencias en la proteína cargada en cada carril. Además, se realizaron varias réplicas para este experimento observándose mayor glicosilación para la PDI1-1 de la variedad 23 que para el resto de las variedades. En la figura 30 se muestran los resultados obtenidos a partir de tres réplicas técnicas del análisis de glicosilación de PDI1-1 entre las cinco variedades estudiadas.

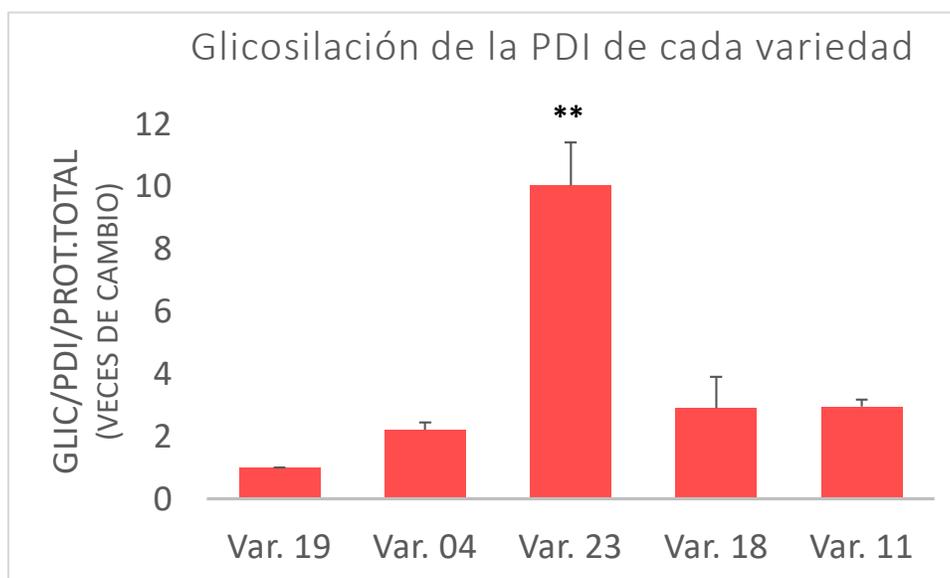


Fig. 30. Comparación de los niveles de glicosilación de PDI1-1 entre variedades. Gráfica obtenida del promedio y desviación estándar de tres réplicas técnicas del análisis de glicosilación de PDI1-1 de cada variedad en semilla madura obtenida de campo. Se ha considerado para la variedad 19 el valor de 1 para observar las veces de cambio de las demás variedades con respecto a esta. Se observa que existe una diferencia muy significativa en el nivel de glicosilación de PDI1-1 de la variedad 23 al compararla con el resto de las variedades. Los asteriscos indican que la variedad 23 tiene diferencia significativa en comparación a las otras variedades al someterla a un análisis ANOVA con una $p < 0.0001$.

Discusión

Los análisis de abundancia de PDI1-1 en semilla madura obtenidas de plantas crecidas en campo o invernadero por medio de Western Blot nos llevaron a un primer acercamiento al patrón de acumulación de esta proteína en las diferentes variedades. A pesar de que con este método existe una variación mucho mayor entre réplicas y los resultados son semi-cuantitativos pudimos distinguir la distribución de variedades en dos grupos principales de abundancia mayor o menor de PDI1-1 y sospechar que estos cambios podrían conservarse independientemente de las condiciones de cultivo. Los experimentos de ELISA no sólo confirmaron estas suposiciones sino que al ser un método cuantitativo nos permitieron obtener el patrón exacto y reproducible para cuantificar los niveles de PDI1-1 en las variedades. Dicho patrón se conserva de manera independiente de los lotes de semilla, ambientes de cultivo y épocas de siembra. Nos interesaba ver cómo se afectaba el contenido de PDI1-1 en las variedades que normalmente crecen en condiciones de riego cultivadas en un ambiente de temporal y otra localización geográfica, así que se analizaron muestras en las que todas las variedades crecieron bajo las mismas condiciones. El resultado obtenido es claramente reproducible. Solamente en el lote de campo (Mayo, 2013) de muestras analizadas se repitió el patrón de comportamiento pero con valores reducidos de PDI para todas las variedades. Esto puede deberse al contenido de proteína total cuantificado por Bradford, pues al dividir los μg de PDI entre la proteína total, se modifica no sólo el patrón sino también las veces de cambio. Podría hacerse una nueva extracción de este lote para comprobar si se trata de un error técnico o de que en esta cosecha el contenido de PDI1-1 para todas las variedades fue ligeramente menor. Sin embargo, esto no modificó la diferencia observada entre las variedades manteniéndose la división en dos grupos de baja y de alta PDI1-1.

Estos resultados son relevantes, ya que a pesar de provenir de condiciones de crecimiento completamente diferentes, las variedades siempre despliegan el mismo patrón de contenido de PDI1-1. En las cuatro réplicas biológicas analizadas

puede verse que las variedades 04, 19, y 11 presentan mayor contenido de PDI1-1 por proteína total (extracción con fenol), mientras que las variedades 18 y 23 tienen menos PDI1-1. La diferencia estadística entre las variedades se confirmó por un análisis ANOVA, en donde las variedades 18 y 23 resultan ser diferentes de las variedades 19, 04 y 11, a pesar de que solamente la variedad 23 es significativamente diferente del resto del grupo. En el caso de la variedad 18, se diferencia lo suficiente de 19, 04 y 11 como para pertenecer al grupo de la 23, pero tampoco se puede distinguir significativamente de ellas. Esto nos indica que las variedades 23 y 18 tienen características en común, como un nivel menor de PDI, pero también existen diferencias entre ellas (Ver Fig. 2 de los ANEXOS).

El hecho de que el patrón de acumulación de PDI1-1 no se afecta por diferentes condiciones ambientales, sugiere al contenido de PDI1-1 como un buen marcador molecular para distinguir variedades mexicanas de cebada. La expresión de PDI1-1 es variedad-dependiente, ya que también sus patrones de expresión durante el desarrollo en dos réplicas biológicas independientes de invernadero mostraron reproducibilidad y consistencia para cada variedad.

Como antecedentes podemos clasificar a las cinco variedades por su lugar y condiciones de siembra: temporal o riego. Las variedades 19, 18 y 23 son cultivadas en la región del Bajío en condiciones de riego. Las variedades 04 y 11 son cultivadas en la región de los Valles Altos en condiciones de temporal. En este trabajo, para la condición de riego se observó que dos de las variedades son de bajo contenido de PDI1-1 (18 y 23) y una es de alto (19). En el caso de temporal, ambas variedades son de alto contenido de PDI1-1. Creemos que el contenido de PDI1-1 en semilla madura puede ser utilizado para clasificar en un futuro nuevas variedades de cebada con uso en la producción de malta, independientemente de la región de siembra.

Si ahora revisamos el segundo antecedente que tenemos, sobre la presencia de isoformas diferenciales en las manchas de los geles de doble dimensión, podemos ver que existe una correlación entre las posiciones de punto isoeléctrico y la señal de Western Blot identificada como PDI1-1 en los dos grupos de variedades. Las

variedades 19, 04 y 11 que contienen más PDI1-1 a nivel de proteína, presentan un punto isoeléctrico alrededor de 5.4. En cambio, las variedades con el menor contenido de PDI1-1, 18 y 23, presentan un punto isoeléctrico más bajo, alrededor de 5. La masa molecular donde se ubica la señal de PDI1-1 no parece variar, por lo que es probable que se trate de la misma PDI1-1 en todas las variedades pero que cuente con diferentes modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones. Esto indica que la abundancia de PDI1-1 es variedad dependiente, así como la presencia de isoformas post-traduccionales que pueden presentar diferentes localizaciones o actividades entre las variedades.

En trabajos previos en el laboratorio, Navarrete-Tabla (2016) (ver Figura 6) encontró que las variedades 23 y 18 poseen un mayor contenido de hordeínas, no sólo como intensidad de la banda del Western Blot, sino también de tamaños diferentes. Sus resultados completan y respaldan la separación de las variedades mexicanas en dos grupos: variedades con mayor contenido de hordeínas y variedades con menor contenido de hordeínas. Esto nos indica que sin duda hay una diferencia en el proceso de producción y almacenamiento de proteínas de reserva. Siendo las variedades que contienen menos PDI1-1 (23 y 18) las de mayor contenido de hordeínas existe concordancia con los resultados la mutante de PDI de Kim et al., 2012. Las variedades 04 y 19 que poseen niveles más altos de PDI1-1 muestran menores niveles de hordeínas en las semillas maduras. Sería necesario hacer más estudios en cuanto a productividad de las maltas de esas variedades en la industria, pero por los datos que tenemos hasta el momento, parece haber una correlación entre el contenido de PDI, el contenido de hordeínas y por lo tanto, la calidad del grano.

El hecho de que la variedad 23 tenga una alta cantidad de proteínas de reserva, pero exprese poco PDI1-1 puede estar relacionado a que PDI1-1 también actúa como chaperona y ayuda al plegamiento adecuado o degradación de proteínas mal plegadas. Este ejemplo ya se ha mencionado en la introducción, en el caso de las mutantes de PDIL1-1 en arroz (Figura 13) que presentaban un fenotipo de

grano más compacto y con mayor contenido de proteínas, sin embargo lo más probable es que estas proteínas no estén plegadas adecuadamente o formen cuerpos proteicos de agregación que a falta de chaperonas eficientes no se disgreguen. Si se llega a establecer una relación directa entre el contenido de PDI1-1 y el estado de las proteínas de almacenamiento en cebada, este marcador molecular podría servir como parámetro para la calidad de malteo en las variedades a introducir a futuro. El haber estandarizado la técnica de ELISA, que nos da resultados reproducibles sobre contenido de PDI1-1 en variedades de cebada malteras, brinda la oportunidad de utilizar esta herramienta por la industria en el análisis de nuevas variedades. Se necesitaría aplicar la prueba a un mayor número de variedades utilizadas en la producción de maltas para ver su correlación con la calidad de la malta que se obtiene a partir de ellas.

Es interesante ver que la acumulación de PDI1-1 se conserva tanto en cinética, como en cantidades en los tiempos de llenado de semillas obtenidas de siembras en años y temporadas diferentes. Estos datos prueban ser también reproducibles entre variedades. Por otro lado, la mayor acumulación de PDI1-1 en semillas en los días 10 y 20 correlaciona con los tiempos de mayor síntesis de hordeínas. Es decir, parece ser factible que la semilla se prepara para la producción y almacenamiento de hordeínas, acumulando a las chaperonas previamente a su síntesis. Sería deseable poder analizar con Western Blots la cantidad de hordeínas que se van expresando en estos tiempos y ver si se relacionan con los cambios que observamos de PDI1-1 en las variedades a lo largo del desarrollo.

Lo anterior también podría tener relación con el artículo de Ondzighi (Ondzighi et al., 2008) en el que la PDIL5 estudiada en *A. thaliana* también sufre un decremento con la maduración de la semilla. Es posible que la PDI1-1 en cebada tenga funciones parecidas y sea capaz de acarrear proteasas a los cuerpos proteicos por igual, regulando su degradación en la germinación, importante para el malteo y la degradación de las proteínas de reserva. También puede ser que las diferencias de PDI1-1 entre variedades residan en su capacidad de unirse a cisteín proteasas para llevarlas a los cuerpos proteicos al final de la maduración.

Las cinéticas de acumulación de PDI en desarrollo muestran que en el efecto hay una cantidad menor de la proteína a medida que el grano madura.

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que en efecto existen isoformas diferenciales de PDI1-1 entre las variedades. Sin embargo, más que isoformas por splicing alternativo, nuestros resultados indican que son debidas a cambios postraduccionales diferentes entre variedades para la PDI1-1 canónica.

Entre algunas posibilidades, exploramos los niveles de glicosilación, encontrando que la variedad 23, además de ser la que tiene menor cantidad de PDI1-1, es la que muestra mayores niveles de glicosilación. Se sabe que los niveles y ramas de glicosilación en las proteínas determinan su localización celular (Lodish et al., 2000). Además, algunas proteínas ya descritas como clave en la movilización de hordeínas están glicosiladas. Las hordeínas B y C no presentan O- y N-glicosilaciones, excepto por la hordeína gamma3. Al parecer esta pequeña hordeína juega un papel importante en el transporte de las demás hacia vesículas de almacenamiento. Como se mencionó en la introducción, la mutante nula para gamma 3 no puede exportar las proteínas del retículo endoplásmico y éstas se almacenan en él (Møgelsvang et al., 1998). Al ser la glicosilación una marca que puede cambiar la localización de la proteína, también puede afectar los estados oxido-redox de PDI1-1 y por lo tanto su función, pues los diferentes organelos tienen diferente pH.

Así pues, en el caso de la variedad 23 que parece sólo contar con PDI1-1 glicosilada puede que esta se quede en un organelo dónde no se rasuran sus glicosilos, dígase, nunca sale del retículo endoplásmico. Es por eso que, un experimento muy recomendable de realizar en trabajos posteriores sería ver la inmunolocalización *in situ* de PDI1-1 dentro de la semilla seca. También podría verse a lo largo del desarrollo pues se ha visto que su cantidad fluctúa y se reduce conforme el grano madura. Puede que tenga funciones parecidas a la PDI-5 descrita en *A. thaliana*, la cual funciona como inhibidor que acompaña a las proteasas a los gránulos protéicos, permitiendo su activación al disminuir su acumulación.

La información obtenida a partir de la identificación por espectrometría de masas, sugiere que la PDI1-1 de la semilla madura de cebada se encuentra acompañada siempre de amilasas y serpinas, pues se identifican en las mismas manchas. Las amilasas suelen encontrarse más en semillas post-germinadas, pues desdoblan los gránulos de almidón para que el embrión los utilice como fuente de carbono y azúcares para empezar su desarrollo. Puede que interactúe con esta proteína de manera similar, activándola. Las serpinas por su parte son proteínas muy resistentes a calor y proteasas. Se ha visto que impiden que los gránulos de proteínas se deshagan fácilmente y muchas veces aparecen en los precipitados que taponan los filtros en la industria cervecera. Así que es importante estudiar cómo interactúa la PDI1-1 con ellas, si es que lo hace.

Para estudiar la glicosilación de la PDI1-1 se consideró que la mejor manera era utilizando inmunoprecipitaciones. Para ello se utilizó un método de extracción de proteínas más suave, sin presencia de fenol. El cambio de método implicó el enriquecimiento de diferentes tipos de proteínas. Sin fenol, se extraen fundamentalmente proteínas citoplasmáticas, mientras que con fenol, se enriquecen en general todas las proteínas celulares, incluyendo aquellas que podrían encontrarse al interior de complejos membranales (Hajdúch et al., 2005). Este es justamente el caso de la PDI1-1, que se localiza mayoritariamente en el Retículo endoplásmico (RE). A pesar de que la extracción por fenol se considera la más óptima para nuestra proteína, pudo extraerse también por el otro método, lo cual confirmamos por medio de Western Blot. Una vez extraída también se logró inmunoprecipitar. Al empezar los primeros intentos de detección de glicosilación tuvimos algunas problemáticas. Sin fenol, se extraían muchas menos proteínas glicosiladas, o su señal era muy débil. Esto es lógico, considerando que muchas de las proteínas glicosiladas se encuentran justamente en la ruta de RE y Golgi.

La PDI1-1, identificada como tal al sobreponer los geles de glicosilación y Western Blot, resultó estar glicosilada en las cinco variedades, lo cual no es muy sorprendente, nuevamente dada su localización en la célula.

Evaluando la glicosilación de PDI1-1 en extractos obtenidos por el método con fenol (sin las inmunoprecipitaciones), se encontró que la PDI1-1 de la variedad 23 parece estar significativamente mucho más glicosilada que las otras variedades. Por el análisis de ANOVA esta variedad es completamente diferente en sus niveles de glicosilación de PDI con una $p < 0.0001$ (ver Fig. 3 de los ANEXOS).

Al parecer, a pesar de que las variedades 18 y 23 cuentan con una menor cantidad de PDI1-1, hay diferencias entre estas proteínas, puesto que la PDI de la variedad 23 está mucho más glicosilada que la PDI de la variedad 18. Puede que la PDI de la variedad 18 cuente con otro tipo de modificación post-traducciona que modifique su localización en los geles de 2D, y que por lo mismo no pertenezca completamente ni al grupo de la variedad 23 ni al grupo de variedades que contienen altos niveles de PDI1-1; 19, 04 y 11.

Si se quisiera ver el porcentaje de glicosilación cuantitativo de la PDI1-1 de cada variedad, creemos que es necesario realizar purificación específica de proteínas glicosiladas y posteriormente someterlas al ensayo de ELISA cuantitativo estandarizado para PDI1-1 en esta tesis y así determinar con mayor certeza las cantidades de PDI glicosilada que tiene cada variedad.

Por otra parte, no sabemos si la PDI1-1 de cada variedad puede presentar diferentes ramas de azúcares, lo cual sería importante para conocer la localización de la proteína. El kit utilizado para analizar la glicosilación de la PDI1-1 detecta azúcares en general y no alguno en específico. El reactivo oxidante, en este caso ácido periódico rompe los enlaces entre hidroxilos vecinales (1,2 dioles) sobre residuos de azúcar mediante la formación de un éster cíclico de peryodato, formando un grupo carbonilo de aldehído o cetona. El reactivo Pro-Q™ Emerald contiene una amina primaria que se une directamente al aldehído / cetona, formando así un enlace covalente entre el residuo de azúcar y la molécula de colorante. En trabajos posteriores podría intentarse discernir el tipo de azúcar específico de cada variedad y ver si hay diferencias, pues muchas veces, los azúcares pueden ser por si mismos también marcadores moleculares (Chen et al., 2014).

La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más importantes y comunes en las proteínas de células eucariontes, donde pueden ser de tipo N-glicosilación, O- glicosilación o un glicosil fosfatil inositol unido a lípidos. La N-glicosilación es la que llevan a cabo las proteínas secretadas al retículo endoplasmático, es decir, la glicosilación más común (Song et al., 2013; Galili et al., 1995). En los eucariontes los N-glicanos se relacionan con el plegamiento adecuado de proteínas, localización y estabilidad de proteínas, unión a ligandos, endocitosis, reconocimiento en procesos inmunes como la inflamación y patogenicidad así como señalización general en la célula. En mamíferos, mutantes de proteínas glicosiladas presentan fenotipos muy marcados, en cambio en plantas, no se han encontrado diferencias fenotípicas notables, por lo que se sabe mucho menos de la glicosilación en plantas y sus funciones que en mamíferos (Song et al., 2013).

Este trabajo propone que dada la acumulación diferencial variedad-dependiente de PDI1-1 en la cebada mexicana, que correlaciona inversamente proporcional a la cantidad de hordeínas (especialmente tipo B) podría utilizarse como marcador molecular para distinguir entre tipos de variedades. Creemos esto debido a que PDI1-1 cuenta con isoformas post-traduccionales de glicosilación, que si bien deben de seguirse estudiando, aquí se plantea que existe una marcada diferencia especialmente para la variedad 23 en contraste con las demás. Este fue el primer acercamiento al desarrollo y utilización de PDI1-1 como marcador molecular y creemos que en un futuro, con un estudio más detallado del tipo de isoformas post-traduccionales, esta proteína podría ser un auxiliar muy útil en la caracterización de variedades mexicanas, más si se relaciona a su productividad como malta.

Conclusiones:

- Se determinó que existen diferencias reproducibles en la acumulación de PDI1-1 entre las 5 variedades de cebada mexicana, dividiéndolas en dos grupos: 1) las variedades 23 y 18 que acumulan poca PDI1-1 en semilla madura y las variedades 19, 04 y 11 que presentan casi el doble de PDI1-1 en semilla madura que las anteriores.
- El comportamiento de acumulación de PDI1-1 es reproducible para todas las variedades analizadas, en condiciones de crecimiento y temporadas de siembra muy diferentes. Esto confirma la utilidad de PDI1-1 como un marcador molecular confiable para ser evaluado en nuevas variedades de cebada y explorar su relación con las diferentes características de malteo de las variedades mexicanas.
- Se identificaron isoformas de PDI1-1 con diferente punto isoeléctrico para los grupos de variedades 1) 23 y 18 y 2) 19, 04 y 11 mediante separación en 2D y Western Blot, aunque no fue posible distinguir todas las manchas observadas en tinciones con Coomassie e identificadas como PDI por espectrometría de masas.
- PDI1-1 es una proteína glicosilada en las cinco variedades mexicanas, siendo la variedad 23 la que posee una PDI1-1 significativamente más glicosilada.

Perspectivas para siguientes trabajos:

- 1) Determinar la localización de PDI1-1 mediante inmunodetección en semilla madura y a lo largo de diferentes etapas del desarrollo para entender mejor su relevancia en la acumulación de cuerpos protéicos de reserva en las diferentes variedades mexicanas de cebada.
- 2) Determinar el tipo de azúcar que se une a la PDI1-1 en cada variedad.
- 3) Relacionar los niveles de PDI1-1 con los patrones de acumulación de hordeínas durante el desarrollo de la semilla en diferentes variedades y las características de malteo que estas presentan.

Bibliografía:

1. Agrawal, G. K., Timperio A. M., Zolla L., Rakwal R., (2013). Biomarker discovery and applications for food and beverages: Proteomics to nanoproteomics. *Journal of Proteomics*(93), 74-92. doi:10.1016/j.jprot.2013.04.014
2. Borovkova I. G., Steffenson B.J., Jin Y., Rasmussen J.B., Kilian A., Kleinhofs A., Rossnagel B.G., Kao K. N., (1995) Identification of Molecular Markers Linked to the Stem Rust Resistance Gene *rpg4* in Barley. Vol. 85, No. 2. *The American Phytopathological Society.*
3. Burger W.C., Laberge D.E., Malting and Brewing Quality in Barley, D.C. Rasmusson, Ed. (*American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1985*), pp. 367-401.
4. Butcher D. A. (1989). Ale & beer: a curious history. *McClelland & Stewart: pp. 10.*
5. Chen C., Su W., Huang B., Chen Y., Tai H., Obena R. P., (2014) Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment. *Royal Society of Chemistry. Analyst*, 139, 688. DOI: 10.1039/c3an01813j
6. Ciaffi M., d'Aloisio E., Paolacci A.R., Dhanapal A.P., Tanzarella O., Porceddu E., (2010) The Protein Disulfide Isomerase gene family in bread wheat (*T. aestivum* L.) *BMC Plant Biology* 2010, **10**:101
7. d'Aloisio, E., Ciaffi M., Paolacci A.R., Dhanapal A.P., Tanzarella O., Porceddu E., (2008) The PDI (Protein Disulfide Isomerase) gene family in wheat. In: *Appels R. et al. (eds). Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium. (Brisbane, Australia 24-29 August 2008)* 1-3.
8. Eblinger H.M.,(2009) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp.779.*
9. Galarza-Mercado, J. M. (2006) Recuperado el 25 de enero de 2016, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Cebada1995-2007.pdf
10. Galili G., Shimoni Y., Zhu X. Levanony H., Segal G., (1995) Purification, Characterization, and Intracellular Localization of Glycosylated Protein Disulfide Isomerase from Wheat Grains. *Plant Physiol.* 108: 327-335.

11. García Ruiz, J. L. (2003). LID. ed. Cervezas Mahou 1890-1998, un siglo de tradición e innovación. *Constanza Laguna Roldán (Primera edición). Madrid.*
12. Griffiths, J.F. A., Miller HJ, Susuki DT, Lew WM (2002). Genética. *McGraw-Hill Interamericana.*
13. Hajduch, M.; Ganapathy, A.; Stein, J. W.; Thelen, J. J., (2005). A Systematic Proteomic Study of Seed-Filling in Soybean: Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. *Plant Physiol.* 2005, 137, 1397-1419.
14. Hornsey, I.S., (2003). A history of beer and brewing. *Royal Society of Chemistry paperbacks, pp.742.*
15. Howard K. A., Gayler K.R., Eagles H.A., Halloran G.M., (1996) The Relationship Between D Hordein and Malting Quality in Barley. *Journal of Cereal science. Volume 24, Issue 1, July 1996, Pages 47-53*
16. Hurkman W. J., DuPont F.M., Tanaka C.K., Chan R., (1998) BiP, HSP70, NDK and PDI in wheat endosperm. I. Accumulation of mRNA and protein during grain development. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM 103: pp.70 – 79.*
17. Kalinova-Jelezova, M. (2014). Expresión de marcadores moleculares para mejoramiento de cebada maltera durante el desarrollo de semilla (Tesis de licenciatura). *Facultad de Química. Ciudad de México: UNAM.*
18. Kim, J. Y., Lee, M.S., Jang, C.S., Russ J., (2008) Molecular Characterization of a cDNA Encoding Disulfide Isomerase during Barley Kernel Development. *Russian Journal of Plant Physiology, 2008. Vol. 55, No. 5. Pages: 676-686.*
19. Kim J.Y., Yeu S.Y., Park B.S., Koh H.J., Song J.T., Seo H.S.(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, September, 2012. Vol. 7, No. 9. e44493.*
20. Kirin. (10 de Agosto de 2015). Recuperado el 25 de Noviembre de 2015, de Kirin Beer University Report: Global Beer Production by Country in 2014: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/0810_01.html

21. Klappa P., Freedman R.B., Ruddock L.W. (2002) Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains, *EMBO reports*. Vol 31, num. 2.
22. Komatsuda, T., Maxim P., Senthil N., Mano Y., (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.
23. Komatsuda, T., Pourkheirandish M., He C, Azhaguvel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T. , Tagiri A., Lundqvist U., Fujimura T., Matsuoka M., Matsumoto T., Yano M. (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. 41424-1429.
24. Kosuri P., Alegre-Cebollada J., Feng J., Kaplan A., Inglés-Prieto A., Badilla C.L., Stockwell B.R., Sanchez-Ruiz J.M., Holmgren A., Fernández J.M., (2012) Protein Folding Drives Disulfide Formation, *Cell*, Volume 151, Issue 4, p794-806, 9 November 2012.
25. Kumamaru, T., Ogawa M., Satoh H., Okita T.W., (2007) Protein Body Biogenesis in Cereal Endosperms, *Plant Cell Monogr* (8) DOI 10.1007/7089_2007_115. April, 2007.
26. 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.
27. Libkind, D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P. and Sampaio J.P., (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.
28. Lodish Harvey, Berk, S.A. Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J. (2000) Molecular Cell Biology, 4th edition, Section 17.7 Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex, New York: W. H. Freeman; 2000. ISBN-10: 0-7167-3136-3
29. Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* Vol. 3 pp.87-103.

30. Moir, M. (2000). Hops: A millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (4): pp. 131-146.
31. Molina-Cano, J. L. (1989). Taxonomía. Citología. Origen filogenético. La cebada (págs. 19-23). Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
32. 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
33. Møgelvang, Søren and Simpson, D.J. (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: 541-552, 1998. Pages: 541- 552.
34. Navarrete - Tabla, M. A. (2016). Identificación de hordeínas para evaluar su potencial como marcadores moleculares en variedades mexicanas de cebada (Tesis de licenciatura). Facultad de Química. Ciudad de México: UNAM.
35. Ondzighi A., Christopher D., Cho E., Chang S., Staehelin L., (2008) Arabidopsis Protein Disulfide Isomerase-5 Inhibits Cysteine Proteases during Trafficking to Vacuoles before Programmed Cell Death of the Endothelium in Developing Seeds. *The Plant Cell*, Vol. 20: 2205–2220
36. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2007). Recuperado el 24 de enero de 2016, de INPhO: Información sobre operaciones de poscosecha: [http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cerealsgrains/es/?page=2&ipp=7&no_cache=1&tx_dynalist_pi1\[par\]=YToxOntzOjE6lkwiO3M6MT oiMil7fQ==](http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cerealsgrains/es/?page=2&ipp=7&no_cache=1&tx_dynalist_pi1[par]=YToxOntzOjE6lkwiO3M6MT oiMil7fQ==)
37. SAGARPA. (2014). Recuperado el 26 de Enero de 2016, de Mejora INIFAP variedad de cebada malteada tolerante a la roya y con mayor rendimiento.: <http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B006.aspx>

38. Salgado-Albarrán, M. (2015). Análisis de hordeínas en semilla y malta de diferentes variedades de cebada. *Tesis de licenciatura. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.*
39. Salgado-Albarrán, M., Herrera-Díaz, J., & Dinkova, T. D. (2015). Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1), 43-51.
40. Sang, T. (2009) Genes and Mutations Underlying Domestication Transitions in Grasses. *Plant Physiology* 149. pp. 63-70
41. Schlötterer C. (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 5, pp. 63-69.
42. 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 (1995)
43. Shewry P.R., Napier J.A., Tatham A.S., (1995) Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, Vol. 7, 945-956. July 1995.
44. Shewry, P. R., and Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 947-958.
45. Sigsworth, E. M. (1965). Science and the Brewing Industry, 1850-1900. *The Economic History Review* 17 (3): pp. 536-550.
46. Snegaroff, J., Bouchez-Mahiout, I., Smaali, M., Pecquet, C., Raison-Peyron, N., Jolivet, P., Laurière, M. (2013). Barley gamma 3-hordein: Glycosylation at an atypical site, disulfide bridge analysis, and reactivity with IgE from patients allergic to wheat. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834 (1), 395 - 403. DOI : 10.1016/j.bbapap.2012.07.016
47. 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).
48. Song W., Mentink R.A., Henquet M.G., Cordewener J.H, van Dijk A.D., Bosch D., America A.H., van der Krol A.R., (2013) N-glycan occupancy of Arabidopsis N-glycoproteins. *Journal of proteomics* 93, Págs; 343-355.

49. Tanno, K. y Willcox, G. (2006) How Fast Was Wild Wheat Domesticated? *Science: Vol. 311. No. 5769, pp.1886*
50. 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.
51. Weiss, E., Wetterstrom W., Nadel D., Bar-Yosef O., (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.
52. 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.*
53. Wilson G.R. (1998). The Dynamics of the International Brewing Industry Since 1800 (Primera edición). *Routledge (History). Ed.*
54. Yan Y., Zhu C., Luo N., Chen G., Zhu J., Yin G., Li X., Hu Y., Li J., (2014) Molecular Characterization and Expression Profiling of the Protein Disulfide Isomerase Gene Family in *Brachypodium distachyon* L., *PLoS ONE*, 9(4): e94704
55. Zhu C., Luo N., He M., Chen G., Zhu J., Yin G., (2014) Molecular Characterization and Expression Profiling of the Protein Disulfide Isomerase Gene Family in *Brachypodium distachyon* L. *PLoS ONE* 9(4): e94704.
56. Zohary D, Hopf M, Weiss E. (2012). Domestication of plants in the Old World, 4th edn. *Oxford: Oxford University Press.*

ANEXOS

OT399_ESP-1_UNIPROT								OT399_ESP-1_UNIPROT+GLICO+RUP			
Accession	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical P	Coverage (%)	Accession	PLGS Score	Peptides	
PDI_HORVU	Protein disulfi	56427	4.8354	16479.1	114	47	52.2417	PDI_HORVU	16305.43	113	
AMYB_HORVU	Beta amylase	59609	5.499	1705.464	20	41	28.0374	AMYB_HORVU	1705.464	20	
SPZ4_HORVU	Serpin Z4 OS f	43249	5.6631	340.6656	2	28	7.0175	SPZ4_HORVU	340.6656	2	
BSZ7_HORVU	Serpin Z7 OS f	42794	5.3276	253.9077	4	24	13.0982	BSZ7_HORVU	253.9077	4	
OT400_ESP2_UNIPROT								OT400_ESP2_UNIPROT+GLICO+RUP			
Accession	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical P	Coverage (%)	Accession	PLGS Score	Peptides	
PDI_HORVU	Protein disulfi	56427	4.8354	16195.73	116	47	47.5634	PDI_HORVU	16195.73	116	
SPZ4_HORVU	Serpin Z4 OS f	43249	5.6631	2313.387	7	28	12.782	SPZ4_HORVU	2313.387	7	
BSZ7_HORVU	Serpin Z7 OS f	42794	5.3276	1656.81	11	24	21.1587	BSZ7_HORVU	1656.81	11	
AMYB_HORVU	Beta amylase	59601	5.5928	976.4216	17	41	30.6542	AMYB_HORVU	976.4216	18	
OT401_ESP-3_UNIPROT								OT401_ESP-3_UNIPROT+GLICO			
Accession	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical P	Coverage (%)	Accession	PLGS Score	Peptides	
AMYB_HORVU	Beta amylase	59609	5.499	4956.051	45	41	49.7196	AMYB_HORVU	4955.185	46	
AMYB_HORVU	Beta amylase	59601	5.5928	4801.248	44	41	51.215	AMYB_HORVU	4800.381	45	
PDI_HORVU	Protein disulfi	56427	4.8354	1009.56	16	47	33.9181	SPZ4_HORVU	1008.523	5	
SPZ4_HORVU	Serpin Z4 OS f	43249	5.6631	1008.523	5	28	9.2732	PDI_HORVU	1006.507	15	
OT402_ESP-4_UNIPROT								OT402_ESP-4_UNIPROT+GLICO			
Accession	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical P	Coverage (%)	Accession	PLGS Score	Peptides	
AMYB_HORVU	Beta amylase	59609	5.499	3937.804	27	41	34.7664	AMYB_HORVU	3937.804	27	
AMYB_HORVU	Beta amylase	59601	5.5928	3896.429	26	41	31.5888	AMYB_HORVU	3896.429	26	
PDI_HORVU	Protein disulfi	56427	4.8354	920.6861	16	47	36.4522	PDI_HORVU	920.6861	16	
OT403_ALI1_UNIPROT								OT403_ALI1_UNIPROT+GLICO+RUP			
Accession	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical P	Coverage (%)	Accession	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
AMYB_HORVU	Beta amylase	59609	5.499	1451.901	18	41	31.5888	PDI_HORVU	16305.43	115	53.6062
								AMYB_HORVU	1681.274	20	28.0374
								SPZ4_HORVU	340.6656	2	7.0175
								BSZ7_HORVU	253.9203	4	13.0982
OT404_ALI2_UNIPROT								OT404_ALI2_UNIPROT+GLICO+RUP			
Accession	Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical P	Coverage (%)	Accession	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
AMYB_HORVU	Beta amylase	59609	5.499	2760.585	28	41	37.9439	AMYB_HORVU	2781.787	28	
RUBA_WHEA	RuBisCO large	57485	4.6377	445.1684	7	45	10.1289	RUBA_WHEA	479.9883	9	

Fig. 1 ANEXOS. Tabla de resultados obtenidos a partir del análisis por espectrometría de masas de las manchas diferenciales entre variedades. A la derecha de la tabla están los resultados obtenidos al comparar las masas de péptidos con la base de datos de Uniprot y a la derecha con la base de datos de Uniprot para proteínas glicosiladas. Se puede ver que en las 4 manchas de la variedad 19 se identifica PDI, además de una amilasa y serpinas, que probablemente migran juntas al estar en los mismos cúmulos protéicos. Sin embargo, al ver las dos últimas secciones de la tabla correspondientes a las manchas 14 y 15 para la variedad 23, puede observarse que a pesar de que no se identificó PDI1-1 en la base de datos de proteínas Uniprot, si se identificó la PDI1-1 y con un puntaje sumamente alto al compararla con la base de datos de proteínas glicosiladas. En la mancha 15 no se detectó PDI1-1 en ninguna de las dos bases de datos.

Coefficientes estandarizados (CONCENTRACIÓN PDI):

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
19-4	0.000	0.000				
19-11	-0.035	0.148	-0.233	0.816	-0.331	0.262
19-18	-0.362	0.148	-2.448	0.018	-0.658	-0.066
19-19	0.005	0.146	0.031	0.975	-0.289	0.298
19-23	-0.478	0.148	-3.234	0.002	-0.774	-0.182

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
19 vs 23	0.060	3.194	2.822	0.019	Sí
19 vs 18	0.046	2.426	2.822	0.124	No
19 vs 11	0.005	0.259	2.822	0.999	No
19 vs 4	0.001	0.031	2.822	1.000	No
4 vs 23	0.060	3.234	2.822	0.017	Sí
4 vs 18	0.045	2.448	2.822	0.118	No
4 vs 11	0.004	0.233	2.822	0.999	No
11 vs 23	0.055	3.000	2.822	0.032	Sí
11 vs 18	0.041	2.215	2.822	0.190	No
18 vs 23	0.014	0.785	2.822	0.934	No

Valor crítico del d de Tukey: 3.991

Categoría	Medias LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
19	0.141	0.014	0.114	0.168	A
4	0.141	0.013	0.115	0.167	A
11	0.136	0.013	0.110	0.162	A
18	0.096	0.013	0.069	0.122	A B
23	0.081	0.013	0.055	0.107	B

Fig. 2. ANEXOS. Prueba ANOVA de los datos obtenidos por ELISA entre variedades. Restricciones: $\alpha=0$ Intervalo de confianza (%): 95 Tolerancia: 0.0001 Utilizar medias LS: Sí. En la primera tabla los valores en negritas indican que existe diferencia en la concentración de PDI para las variedades 18 y 23. En la segunda tabla se muestra la prueba de Tukey. Indica que a nivel de $p < 0.01$, solamente la diferencia de la variedad 23 es estadísticamente significativa en comparación a las variedades 19, 04 y 11, pero no con la 18. En la tercera tabla se resume la prueba de Tukey en dónde ubica a las variedades 19, 04 y 11 en el grupo A y la variedad 23 en el grupo B. La variedad 18 podría ubicarse en ambos grupos, ya que es diferente a las variedades del grupo A, pero a un nivel de $p < 0.05$.

Coefficientes estandarizados (GLICOSILACIÓN):

Fuente	Valor	Error estándar	t	Pr > t	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
VAR-4	0.000	0.000				
VAR-11	0.092	0.077	1.188	0.262	-0.081	0.265
VAR-18	0.084	0.077	1.087	0.303	-0.088	0.257
VAR-19	-0.150	0.077	-1.935	0.082	-0.322	0.023
VAR-23	0.963	0.077	12.439	< 0.0001	0.791	1.136

Contraste	Diferencia		Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
	Diferencia	estandarizada			
23 vs 19	9.037	14.375	3.291	< 0.0001	Sí
23 vs 4	7.820	12.439	3.291	< 0.0001	Sí
23 vs 18	7.137	11.352	3.291	< 0.0001	Sí
23 vs 11	7.073	11.252	3.291	< 0.0001	Sí
11 vs 19	1.963	3.123	3.291	0.065	No
11 vs 4	0.747	1.188	3.291	0.758	No
11 vs 18	0.063	0.101	3.291	1.000	No
18 vs 19	1.900	3.022	3.291	0.076	No
18 vs 4	0.683	1.087	3.291	0.809	No
4 vs 19	1.217	1.935	3.291	0.360	No
Valor crítico del d de Tukey:			4.654		

Categoría	Medias LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
23	10.037	0.445	9.046	11.027	A
11	2.963	0.445	1.973	3.954	B
18	2.900	0.445	1.910	3.890	B
4	2.217	0.445	1.226	3.207	B
19	1.000	0.445	0.010	1.990	B

Fig. 3. ANEXOS. Prueba ANOVA de los datos obtenidos por ELISA entre variedades. Restricciones: $\alpha=0$ Intervalo de confianza (%): 95 Tolerancia: 0.0001 Utilizar medias LS: Sí. En la primera gráfica se muestra en negritas que la variedad 23 tiene un nivel de glicosilación de PDI muy diferente al resto de variedades, con un $p < 0.0001$, que tiene alta significancia. En la segunda gráfica la prueba de Tukey confirma que la variedad 23 es significativamente diferente a las variedades 19, 04, 18 y 11. En la tercera gráfica ubica a las variedades 11, 18, 04 y 19 en el grupo B con una glicosilación de PDI estándar y a la variedad 23 en el grupo A, con una mucho mayor glicosilación de la PDI1-1.

