



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**



**ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y PATRONES ELECTROFORÉTICOS
DE PROTEÍNA EN RELACIÓN CON LA CALIDAD FÍSICA Y
FISIOLÓGICA DE CINCO VARIEDADES DE CEBADA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PRESENTA:

MARLENE ORTIZ ORTEGA

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. LUCILA DEL CARMEN HERNÁNDEZ CORTÉS

DR. CÉSAR LEOBARDO AGUIRRE MANCILLA

TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO, MÉXICO. JUNIO DE 2014



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 2 de Junio de 2014

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval

Director ICAP

PRESENTE

Nos permitimos informar a usted, que después de haber revisado la versión final del trabajo de investigación intitulado “**Actividad proteolítica y patrones electroforéticos de proteína en relación con la calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada**” presentada por la pasante de Ingeniería Agroindustrial **Marlene Ortiz Ortega** con número de cuenta **145896**, consideramos que cumple con los elementos suficientes de contenido y forma de una Tesis de licenciatura, por lo que otorgamos nuestra aprobación para que esta sea impresa y defendida en examen recepcional correspondiente como requisito parcial para obtener el título de **Ingeniero Agroindustrial**.

H. Comité Revisor

Dr. César Leobardo Aguirre Mancilla

Dra. Lucila del Carmen Hernández Cortés

Dra. Irma Morales Rodríguez

Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana



EMPRESA
SOCIALMENTE
RESPONSABLE

Rancho Universitario. Av. Universidad Km. 1
Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32 CP 43600
Tulancingo de Bravo, Hgo. Tel. 01 771 71 7 2000



DEDICATORIA

A mi mamá

Este trabajo lo dedico a ti mamá, Celia Ortega López, con toda mi alma, mi amor, cariño, respeto y admiración que siento por ti, doy gracias a Dios por haberme dado el privilegio de ser tú quien me diera vida, quien cuidara de mí, quien guiara mis pasos, quien fuera padre y madre a la vez, quien trabajara todo el día para darme todo lo que necesitaba, quien aguantara tantos malos tratos y que a pesar de infinitos momentos difíciles nunca desistió, nunca me dejó sola y siguió luchando por mí.

Gracias mami porque siempre has dado la cara por mí, por tus consejos, por todo tu cariño y amor, por apoyar mis decisiones incondicionalmente, por cumplir mis caprichos y soportar mis travesuras a pesar de todo, por consolarme y decirme acertadas palabras de aliento cuando me sentía triste, por las constantes responsabilidades y obligaciones, por hacerme reír hasta llorar, por permanecer a mi lado y siempre estar ahí para mí aun en la distancia, pero más que nada agradezco inmensa y profundamente todos y cada uno de los sacrificios y el camino tan largo que tuviste que pasar para que yo pudiera llegar hasta aquí, por haberme dado el alimento quedándote con hambre y porque muchas veces te sentiste desfallecer y sin embargo te aguantaste por mí y seguiste trabajando, con nada podré pagar cada lágrima y esfuerzo, las palabras que mencione jamás podrán expresar todo lo que siento por ti y cuanto agradezco, mas sin embargo, se pueden centrar en tres palabras que de antemano desbordan su significado, ¡Muchas gracias mamá! ¡Gracias por ser mi mamá, eres mi ejemplo de vida y fortaleza!, ¡Agradezco a la vida y a Dios poder decirte ahora que TE AMO CON TODA MI ALMA Y CORAZÓN MAMI!

A mi hermana

Le dedico con todo mi amor y cariño este trabajo a mi familia, especialmente a mi hermana Martha Ortiz Ortega, a quien le agradezco infinitamente su total y completo apoyo durante toda mi vida. Muchas gracias por todos tus consejos, por tanto cariño, por centrar y aterrizar mis ideas, por guiar mi camino, por siempre estar al pendiente aún en la distancia, por las palabras de aliento cuando las necesité, pero sobre todo porque a pesar de estar lejos siempre me hiciste sentir que estabas ahí de corazón, al lado mío, compartiendo alegrías y tristezas, éxitos y adversidades, que a pesar de todo nunca estuve sola porque estabas tú detrás, a la distancia pero constantemente esforzándote porque yo pudiera salir adelante, !Te admiro muchísimo! La vida no me alcanzará para agradecer todo lo que has hecho por mí, desde lo más hondo de mi corazón te digo ¡Muchas gracias! ¡TE AMO INFINITAMENTE!

A mis amigos

Les dedico con mucho cariño este trabajo a todos mis amigos que con su comprensión, apoyo constante y palabras de aliento, a pesar de todo me ayudaron a seguir y afrontar los problemas nacientes con sus ánimos y constantes atenciones, que dichosa soy por haberlos conocido, ¡Gracias, los quiero mucho!

A mi papá

A ti papá con todo mi amor y cariño... algún día nuestras almas se encontrarán y estaremos juntos.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por los excelentes, buenos, malos y peores momentos de mi vida, por darme la fuerza, voluntad, comprensión, aceptación y la enseñanza de cada uno de ellos, pero sobre todo por siempre hacerme sentir su presencia cerca de mí y nunca dejarme sola. Le doy gracias a Dios por apoyarme brindándome una familia maravillosa, por mis amigos, compañeros y las personas adecuadas quienes contribuyeron de alguna u otra manera para llegar hasta donde estoy y formar parte de la persona que soy, ¡gracias!

Agradezco especial y profundamente a mi mamá Celia Ortega López por haberme apoyado incondicionalmente desde el principio y nunca dejarme sola aún en la distancia, por tolerarme y confiar en mí, por tantas alegrías y risas que llenaron mi corazón de dicha y amor, por acompañarme y aconsejarme en los momentos buenos y difíciles de mi vida, por sus palabras de aliento, por saberme guiar hasta el día de hoy y por tantas y tantas cosas más, no tengo palabras que puedan expresar mi sentir, sin embargo, de todo corazón ¡gracias!; le agradezco infinitamente a mi hermana Martha Ortiz Ortega por ayudarme a visualizar, luchar y lograr esta meta y todos los momentos de éxito durante todos estos años, gracias por creer en mí, por su apoyo absoluto y por todos sus consejos cuando los necesité, de todo corazón ¡gracias!

Agradezco intensa y sinceramente a mi familia, especialmente a la familia Cuautenco Ortega, a la familia Vargas Ortiz y a mi tío Vicente Ortega y familia por todas los momentos de alegrías brindadas y su inapreciable, incontable e incondicional apoyo a lo largo de mi vida, las palabras no alcanzan para demostrar lo que siento, más aun, de todo corazón les digo ¡gracias!

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) por permitirme ser parte de ella y mi gratitud al Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) por brindarme la oportunidad de seguir formando mi educación académica en su institución.

Agradezco al Instituto Tecnológico de Roque (ITR), especialmente a la División de Estudios de Posgrado e Investigación por permitirme utilizar sus instalaciones libremente en la ejecución del trabajo de investigación de tesis.

Al Programa de Movilidad Nacional del Consorcio de Universidades Mexicanas (CUMEX) por el apoyo brindado para la realización de la presente investigación.

Mi profunda y sincera gratitud al Dr. César Leobardo Aguirre Mancilla, por la orientación, tiempo dedicado, apoyo brindado, paciencia, confianza, su completa disposición para aclarar dudas y sobre todo por el conocimiento compartido para mi formación académica y personal durante la realización de la presente tesis, ¡gracias!

Agradezco a la Dra. Lucila del Carmen Hernández Cortés por el apoyo, paciencia, tiempo dedicado, colaboración y aporte brindado tanto en el presente trabajo como en mi formación académica durante la carrera, ¡gracias!; agradezco a la Dra. Irma Morales Rodríguez y a la Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana por su atención, apoyo, tiempo dedicado y asesoramiento tanto en la presente investigación como en mi formación académica durante la carrera, ¡gracias!

Al Ing. Guadalupe García por las observaciones, acertados comentarios para mejorar el presente trabajo y tiempo dedicado para su revisión; al M.C. Jorge Covarrubias Prieto por el apoyo y asesoramiento en la parte estadística del presente trabajo; al Dr. Juan Carlos Raya y al Dr. Juan Gabriel Pimentel por el apoyo y atenciones brindadas durante mi estancia en la ejecución de la presente investigación, ¡gracias!

A todos los profesores que durante la carrera me compartieron e inculcaron sus conocimientos, experiencia profesional y tiempo para prepararme de manera eficaz académicamente, ¡gracias!

A mis hermanas del alma María Angélica García Chávez (y familia) y Nancy Baños Cerón (y familia), mi eterna gratitud por tantos consejos, por su paciencia, por su apoyo total e ilimitado, por escucharme, por su confianza, por tantas alegrías y risas, por los momentos difíciles compartidos y tantas cosas más a lo largo de todos estos años de amistad, por su invaluable amistad, de todo corazón ¡gracias!

A mi hermana del alma Rosario Yarandín Godínez Galán, mil gracias no bastan para expresar la gratitud por tanto tiempo compartido, por aguantarme con tanta paciencia, por la confianza, las risas, lágrimas, alegrías, consejos, enojos, reconciliaciones y por apoyarme completamente durante la realización del presente trabajo pero sobre todo durante todo este tiempo de amistad, de todo corazón ¡gracias!

A todos los amigos que mi formación académica y la vida me dio el privilegio de poder conocer y contar con su apreciada amistad; gracias a Fabiola R. Olguín por sus palabras de aliento y apoyo durante la presente investigación, de corazón ¡gracias!

A mis compañeros de carrera: Abdías, Adriana, Antonio de Jesús, Carlos, Daniela, Diego, Humberto, Leticia, Lilian, Macario y Miguel Ángel, quienes por cuatro años y medio compartieron parte de su vida conmigo y a pesar de tantas cosas que pasamos como grupo o de manera personal me brindaron amablemente de una u otra manera su amistad y ayuda, a todos y cada uno de ellos ¡gracias!

A mis compañeros y amigos del ITR: Denisita, Cris, Dulcecita, Yoli, Pili, Lucecita, Aurorita, Edi, Sandi, Remy, Elba, Pau, Bryan, Lalo, Alonso, Alfredo y Arturo, por los momentos de alegría que hicieron muy ameno mi trabajo durante la estancia y por la confianza que depositaron en mí; a Uriel por su valioso apoyo para poder realizar el presente trabajo; a todos de corazón, ¡gracias!

Y por último, pero no menos importante, agradezco a todas aquellas personas que aunque no mencioné, se interesaron y/o colaboraron de algún modo en la facilitación y/o desarrollo de la presente investigación de tesis.

ÍNDICE GENERAL

índice de cuadros	xi
índice de figuras	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN	1
I. Introducción.....	2
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	7
II. Objetivos e hipótesis	8
2.1 Objetivo general	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
2.3 Hipótesis.....	8
REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
III. Revisión de literatura.....	10
3.1 Importancia de la cebada	10
3.2 Volumen de producción, importación y exportación de cebada.....	12
3.3 Variedades de cebada cultivadas en México.....	19
3.4 Origen del cultivo de cebada	22
3.5 Taxonomía, morfología y composición química del grano de cebada	24
3.6 Germinación de la semilla	26
3.6.1 Etapas de la germinación	27
3.6.2 Ciclo vegetativo de la cebada.....	29
3.6.3 Factores de interferencia en la germinación.....	32
3.6.4 Proteínas en la germinación	36
3.6.5 Patrones electroforéticos de proteína de cebada	38
3.6.6 Actividad proteolítica	41

3.7 Calidad de la semilla de cebada.....	44
3.7.1 Atributos de calidad de semilla de cebada	44
3.7.2 Calidad física.....	47
3.7.3 Calidad fisiológica.....	51
3.7.4 Calidad genética.....	55
3.7.5 Calidad sanitaria.....	59
 MATERIALES Y MÉTODOS	 62
IV. Materiales y métodos	63
4.1 Espacio de investigación	63
4.2 Material biológico a evaluar	64
4.3 Diagrama de flujo de actividades en la investigación	65
4.4 Diseño experimental.....	66
4.5 Evaluación de la calidad física.....	67
4.5.1 Peso de mil semillas.....	67
4.5.2 Peso hectolítrico	67
4.6 Evaluación de la calidad fisiológica	67
4.6.1 Germinación estándar	68
4.6.2 Prueba de vigor: Longitud de plúmula	71
4.7 Métodos bioquímicos de evaluación.....	73
4.7.1 Cuantificación de proteína de reserva en base a su solubilidad.....	73
4.7.2 Cuantificación de actividad proteolítica	78
4.7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida	83
4.8 Análisis estadístico	89
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 90
V. Resultados y discusión.....	91
5.1 Calidad física y fisiológica.....	91
5.1.1 Comparación entre variedades de cebada.....	91
5.1.2 Efecto de calendario de riego.....	97
5.1.3 Efecto de arreglo de siembra	98

5.2 Pruebas bioquímicas	101
5.2.1 Comparación de proteína de reserva entre variedades.....	101
5.2.2 Comparación de actividad proteolítica entre variedades	108
5.2.3 Patrones electroforéticos de las cinco variedades de cebada	111
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	119
VI. Conclusiones.....	120
VII. Recomendaciones.....	122
BIBLIOGRAFÍA	123
VIII. Bibliografía.....	124
ANEXOS	135
IX. Anexos	136
Anexo 1. Terminología empleada	136
Anexo 2. Estructura general de las gramíneas	138
Anexo 3. Fuentes de variación y grados de libertad para el análisis de varianza	139
Anexo 4. Modo de preparación del marcador estándar para electroforesis en geles de poliacrilamida	140
Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) de las pruebas de calidad física y fisiológica.....	141
Anexo 6. Análisis de varianza (ANOVA) en la cuantificación de proteínas de reserva.....	143
Anexo 7. Análisis de varianza (ANOVA) en la cuantificación de actividad proteolítica	145
Anexo 8. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en los patrones electroforéticos	147
Anexo 9. 1er Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Agropecuaria y 1er Simposium en Producción y Tecnología de Semillas	152
Anexo 10. Congreso Internacional de Investigación de Academia Journals	153

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
Cuadro 1. Principales productos cultivados en base a su producción en México durante 2012.	17
Cuadro 2. Principales estados de producción de cebada de grano, año agrícola, tanto riego como temporal hasta agosto de 2013.	18
Cuadro 3. Características generales de las principales variedades de cebada cultivadas en México.	21
Cuadro 4. Taxonomía de la cebada.	24
Cuadro 5. Composición química de un grano de cebada, en paja y cebada verde... 26	26
Cuadro 6. Características ideales en una variedad de cebada.	32
Cuadro 7. Láminas de riego óptimas para el cultivo de cebada de invierno y de primavera en año seco, medio y húmedo.	33
Cuadro 8. Genotipos evaluados y datos del cultivo.....	64
Cuadro 9. Diseño de tratamientos del experimento trifactorial de cinco variedades de cebada, dos calendarios de riego y dos arreglos de siembra.	66
Cuadro 10. Concentración de proteína (BSA*) usada para la curva estándar por el método de Bradford.....	74
Cuadro 11. Soluciones de extracción de proteínas de reserva.	75
Cuadro 12. Relación de reactivos para curva patrón de actividad proteolítica.	79
Cuadro 13. Soluciones para cuantificación de actividad proteolítica en cebada.	80
Cuadro 14. Soluciones para extracción de proteínas y para electroforesis.....	85
Cuadro 15. Soluciones para elaboración de gel de poliacrilamida.	85
Cuadro 16. Soluciones para tinción y corrida electroforesis en gel de poliacrilamida.	85
Cuadro 17. Relación de reactivos para geles de poliacrilamida y su concentración. 86	86
Cuadro 18. Calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	94

Cuadro 19. Calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada en calendario de riego 1 (CR1) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	96
Cuadro 20. Calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada en calendario de riego 2 (CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	97
Cuadro 21. Variables de calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) y en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	98
Cuadro 22. Calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) y dos calendarios de riego (CR1 Y CR2).	99
Cuadro 23. Calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en el calendario de riego 1 (CR1).	100
Cuadro 24. Calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en el calendario de riego 2 (CR2).	100
Cuadro 25. Cuantificación de proteínas entre cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	102
Cuadro 26. Cuantificación de proteínas entre cinco variedades de semilla de cebada en el calendario de riego 1 (CR1) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	103
Cuadro 27. Cuantificación de proteínas entre cinco variedades de semilla de cebada en el calendario de riego 2 (CR2) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	104
Cuadro 28. Cuantificación de proteínas de cinco variedades de semilla de cebada entre calendarios de riego (CR1 y CR2) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	105
Cuadro 29. Cuantificación de proteínas entre los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) de cinco variedades de semilla de cebada.	106
Cuadro 30. Cuantificación de proteínas entre los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en dos calendarios de riego 1 (CR1) de cinco variedades de semilla de cebada. ..	107
Cuadro 31. Cuantificación de proteínas entre los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en dos calendarios de riego 2 (CR2) de cinco variedades de semilla de cebada. ..	107
Cuadro 32. Actividad proteolítica en cinco variedades de semilla de cebada durante el proceso de germinación.	109

Cuadro 33. Actividad proteolítica durante el tiempo del proceso de germinación en cinco variedades de semilla de cebada.....	109
Cuadro 34. Fuentes de variación y grados de libertad para el análisis de varianza, tipo de las pruebas físicas (peso de mil semillas y peso hectolítrico), fisiológicas (porcentaje de germinación estándar y longitud de plúmula) y para la cuantificación de proteínas de las cinco variedades de semilla de cebada con un diseño completamente al azar.....	139
Cuadro 35. Fuentes de variación y grados de libertad para el análisis de varianza, tipo de la cuantificación de actividad proteolítica ($\mu\text{mol pNA}/\text{min}$) de cinco variedades de semilla de cebada con un diseño completamente al azar.....	139
Cuadro 36. Amortiguador de muestra de amplio rango.....	140
Cuadro 37. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza conjunto en las pruebas de calidad física y fisiológica en semillas de cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).	141
Cuadro 38. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 1 (CR1) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las pruebas de calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada.	142
Cuadro 39. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 2 (CR2) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las pruebas de calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada.	143
Cuadro 40. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza conjunto de dos calendarios de riego (CR1 y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en la cuantificación de proteínas de semilla de cinco variedades de cebada.....	144
Cuadro 41. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 1 (CR1) y de dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en la cuantificación de proteínas de cinco variedades de cebada.	144

Cuadro 42. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 2 (CR2) de dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en la cuantificación de proteínas de reserva de cinco variedades de cebada.	145
Cuadro 43. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza, en la cuantificación de actividad proteolítica de semilla de cinco variedades de cebada.....	145
Cuadro 44. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Adabella	147
Cuadro 45. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Alina.	148
Cuadro 46. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Armida.	149
Cuadro 47. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Esmeralda.	150
Cuadro 48. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Esperanza.	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Mapa de distribución de producción de cebada a nivel mundial de 2012 ..	13
Figura 2. Principales países de producción de cebada (promedio 2012).....	14
Figura 3. Promedio de exportación, importación y producción de cebada en México (2008-2012).....	16
Figura 4. Principales regiones de producción de cebada en México.....	19
Figura 5. Partes del grano de cebada	25
Figura 6. Proceso de germinación de una semilla.....	28
Figura 7. Emergencia de la semilla de cebada.....	29
Figura 8. Ciclo vegetativo de cebada.	31
Figura 9. Fachada del Instituto Tecnológico de Roque	63
Figura 10. Esquema descriptivo de la prueba de germinación estándar	70
Figura 11. Esquema para determinar el vigor en la semilla de cebada: crecimiento de plúmula.....	72
Figura 12. Curva estándar de cuantificación de proteína por el método de Bradford	74
Figura 13. Esquema de preparación de muestra para medición de proteína por el método de Bradford.....	77
Figura 14. Curva patrón para cuantificación de actividad proteolítica	79
Figura 15. Esquema de la preparación de muestra para determinar actividad proteolítica.....	82
Figura 16. Esquema de la preparación de muestra para extracción de proteínas de reserva para patrones electroforéticos.	84
Figura 17. Esquema del proceso de electroforesis y tinción de gel de poliacrilamida.	88
Figura 18. Porcentaje de germinación de las cinco variedades de cebada.....	95
Figura 19. Velocidad de hidrólisis proteolítica de las cinco variedades de cebada .	110

Figura 20. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Adabella.....	112
Figura 21. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Alina.....	113
Figura 22. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Armida.....	115
Figura 23. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Esmeralda.....	116
Figura 24. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Esperanza.....	117
Figura 25. Comparación de medias de peso de mil semillas (g) y peso hectolítrico (kg/hl) entre las cinco variedades de cebada	141
Figura 26. Comparación de medias entre las cinco variedades de cebada en vigor (longitud de plúmula en cm)	142
Figura 27. Comparación de medias de cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina) de cada fracción proteica entre las cinco variedades de cebada.....	143
Figura 28. Comparación de medias de cuantificación de actividad proteolítica ($\mu\text{mol pNA /min}$) entre las cinco variedades de cebada	146
Figura 29. Comparación de medias de la velocidad de hidrólisis enzimática ($\mu\text{mol pNA/min/100,000}$) durante en proceso de germinación (120 horas) entre las cinco variedades de cebada.....	146

RESUMEN

En México la cebada, tiene una participación importante como materia prima para la industria cervecera (80% para malta) y el resto para otros usos; México es un significativo productor y exportador de cerveza en el mundo, con presencia en Estados Unidos de América, Europa y Japón. En el presente estudio, se utilizaron cinco variedades de cebada, de El Bajío: (Alina, Armida y Esperanza) mostraron mejores resultados en la mayoría de los parámetros físicos, fisiológicos y bioquímicos, comparados con las variedades de Valles Altos y Centro Norte del país (Adabella y Esmeralda). El contenido de proteína de las cinco variedades fue 50% para la fracción hordeína (prolamina), 20% para globulina, 16% para glutelina y 14% para albúmina. Todas las variedades fueron influenciadas por dos calendarios de riego y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en las pruebas de calidad física, fisiológica y bioquímica realizados, tanto en sus análisis estadísticos individuales como en conjunto. El calendario de riego 2 (0-60-106 días después de la siembra ó dds), estadísticamente fue mejor que el calendario de riego 1 (0-49-78 dds); en peso de mil semillas (45.32 g); en peso hectolítrico (67.28 kg/hl) y en la cuantificación de proteína de reserva, expresada en mg de Proteína por g de muestra, (mg P/g H), (4.89 mg P/g H de albúmina, 6.48 mg P/g H de globulina, 17.07 mg P/g H de hordeína y 5.47 mg P/g H de glutelina). El arreglo de siembra no afectó la calidad fisiológica, sin embargo la siembra a 2 hileras fue estadísticamente mejor en peso de mil semillas (44.53 g) y en cantidad de proteína en la fracción albúmina (4.79 mg P/g H) y glutelina (4.95 mg P/g H), en tanto la siembra a 3 hileras fue estadísticamente más alta en las fracciones de globulina (6.57 mg P/g H) y hordeína (16.76 mg P/g H). Para la región de El Bajío Esperanza presentó los valores más altos en peso de mil semillas con 47.82 g; el peso hectolítrico con 67.20 kilogramos por hectolitro (kg/hl) y longitud de plúmula con 4.31 cm, encontrándose estadísticamente superior en la cantidad de proteína en las fracciones de albúmina 4.99 mg P/g H (mg proteína/g harina); globulina 6.51 mg P/g H; glutelina 5.22 mg P/g H; en actividad proteolítica con 2.94 $\mu\text{mol pNA/min}$ (micro mol de para-nitro anilina/minuto) y su patrón electroforético mostró 9 bandas de proteína perceptibles hasta las 108 horas, esto

nos indica se adaptará mejor al medio ambiente y podrá germinar una planta más vigorosa que por ende produzca un grano de mayor calidad. Para la región de Valles Altos los resultados fueron similares en todas las pruebas ejecutadas.

Palabras clave: calidad física, calidad fisiológica, proteína de reserva, actividad proteolítica, electroforesis, cebada.

ABSTRACT

In Mexico, the barley, has an important role as raw material for the brewing industry (80% malt) and the rest for other uses; Mexico is a significant producer and exporter of beer in the world, with a presence in USA, Europe and Japan. In the present study, five varieties of barley, from El Bajío were used: (Alina, Armida and Esperanza) showed better results for most of the physical, physiological and biochemical parameters, compared with the varieties from Valles Altos and North Central Country (Adabella and Esmeralda). The protein content of five strains was 50% for the hordein fraction (prolamine), 20% for globulin, 16% to glutelin, and 14% for albumin. All varieties were influenced by two irrigation schedules and two planting arrangements (rows 2 and 3) on tests of physical, physiological and biochemical quality made both in their individual statistical analysis as a whole. The watering schedule two (0-60-106 days after sowing or das) was statistically better than watering schedule 1 (0-49-78 das); thousand seed weight (45.32 g); in test weight (67.28 kg / hl) and the reserve protein quantification, expressed as: milligrams of protein per gram of flour (harina) (mg P/g H) (4.89 mg P/g H albumin, 6.48 mg P/ g H globulin 17.07 mg P/g H hordein and 5.47 mg P/g H glutelin). The arrangement did not affect seed physiological quality, however planting 2 rows was statistically better in thousand seed weight (44.53 g) and amount of protein in the albumin fraction (4.79 mg P/g H) and glutelin (4.95 mg P/g H), while a 3-row planting was statistically higher in the globulin fractions (6.57 mg P/g H) and hordein (16.76 mg P/g H). For the El Bajío Esperanza variety presented the highest values in weight of a thousand seed 47.82 g; test weight with 67.20 kilograms per hectolitre (kg/hl) and plumule length to 4.31 cm, with statistically superior in the amount of protein in the fractions of albumin 4.99 mg P/g; globulin 6.51 mg P/g H; glutelin 5.22 mg P/g H; Proteolytic activity in 2.94 $\mu\text{mol pNA}/\text{min}$ (micro mol of para-nitro aniline/minute) and electrophoretic pattern showed detectable protein bands 9 to 108 hours indicates that better adapt to the environment and may germinate more vigorous plant thus produce a higher quality grain. For the region of Valles Altos results were similar in all tests performed.

Keywords: physical quality, physiological quality, storage protein, proteolytic activity, electrophoresis, barley

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

El origen del grano de cebada ha sido explicado desde dos puntos de vista: el primero como cultivo monocéntrico, esto es, que tiene un centro de origen definido, el Creciente Fértil (incluye países como Turquía, Irán, Irak, Jordania, Siria e Israel), y uno o más centros de diversidad, donde fue domesticada hace unos 10,000 años a partir de una cebada silvestre de dos carreras con raquis frágil. Una segunda teoría apunta hacia un proceso continuo de diferentes etapas de la cebada (de *Hordeum spontaneum* a una última cultivada *Hordeum vulgare*). Marruecos y China han sido considerados como un centro de domesticación del cultivo (Moralejo, 1993).

Dentro de los 25 principales productos cosechados a nivel mundial la cebada ocupó el noveno lugar con 132'350,224.92 ton durante 2012, después de caña de azúcar, maíz, arroz-cáscara y trigo (FAOSTAT, 2012). En exportación a nivel mundial ocupó el octavo lugar con 26'077,133 ton durante 2011. Se mantuvo entre 25 y 26 millones de toneladas durante el periodo 2008-2011, siendo Francia el mayor exportador durante 2011 con 5'003,319 ton (FAOSTAT, 2012). Mientras que durante el 2011 fue el octavo lugar como producto principal de importación mundial con 24'260,294 ton. Se mantienen entre 24 y 25 millones de toneladas desde 2008 a 2011 siendo Arabia Saudita el mayor importador durante 2011 con 6'351,620 ton (FAOSTAT, 2012). En México en el año 2012 la cebada de grano se encontró en el 21° lugar, la cebada forrajera en verde ocupó el 40° lugar y la cebada en semilla el 138° puesto (SIACON, 2013). Los principales estados productores de cebada son Guanajuato (productor de semilla) con 435,091.97 ton, Hidalgo (productor de grano) con 237,773.05 ton, Tlaxcala con 163,679.20 ton, Puebla con 76,970.05 ton, México con 60,638.79 ton y Querétaro con 32,293.66 ton durante el 2012 (SIACON, 2013).

La cebada en México tiene una participación del 80% para malta como materia prima para la industria cervecera y el resto para alimentación de ganado, no obstante en mercados internacionales el 80% es para alimentación (como pienso o alimento para ganado) y 20% para malta (Fernández, 2013).

Por tal motivo nuestro país es un importante productor y exportador de cerveza en el mundo, con presencia principalmente en Estados Unidos de América, Europa y Japón, donde la industria aporta aproximadamente 20 mil millones de dólares según datos de la Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y de la Malta (Canicerm) (Mendoza, 2013).

El contenido de proteína del grano maltero resulta ser el principal parámetro de calidad, en cebada de 6 hileras el contenido total debe oscilar entre 10-12.5% y para cebada de 2 hileras entre 9.5-12% (en base seca), ya que valores mayores o menores no proporcionarían la misma calidad de malta (Fernández, 2013). La distinción entre la cebada maltera y forrajera estriba principalmente en el contenido de proteína, para la forrajera se requiere un porcentaje superior al 12% y para la producción de malta debe ser inferior (Prieto, Prieto, Román, & Acevedo, 2012).

De igual forma la cantidad de proteína tiene que ver en el proceso de germinación para el establecimiento de la planta en campo, es decir, la semilla debe contar con un buen aporte de proteína y cubrir las necesidades nutricionales del eje embrionario para que éste tenga éxito en su establecimiento. Las proteínas de reserva (por clasificación de Osborne (1924)), más importantes son las prolaminas (en cebada hordeínas, muy pobre en lisina con < 2%), constituyen la fracción de mayor porcentaje con respecto a las glutelinas, albúminas y globulinas (relativamente ricas en lisina así como en treonina) (Martínez, 1996).

Un vez en campo, el cultivo de cebada tiene ciertas ventajas ante otros cereales como: ciclo vegetativo corto, tolerante a bajas temperaturas, costo del cultivo menor porque ocupa poca mano de obra, fertilizantes y cantidad de agua (Olmos, 1990), rendimiento promedio nacional es de 3.0 ton/ha (Fernández, 2013) y se puede contar con asistencia técnica gratuita desde la siembra hasta la cosecha por empresas en el ramo como Impulsora Agrícola (Impulsora Agrícola, 2011).

La importancia del cultivo para los productores reside en la resistencia a enfermedades, rusticidad (habilidad de sobrevivir a condiciones adversas de crecimiento), rendimientos y alto peso hectolítrico principalmente (Ponce, 2005), por lo que las variedades que actualmente se cultivan más en México debido a su buena adaptación y rendimiento son: Adabella y Esmeralda en Valles Altos, principalmente Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Estado de México (90% del área se cultiva Esmeralda) y en el Centro Norte del país, especialmente Zacatecas, San Luis Potosí, Durango y Guanajuato, bajo condiciones de temporal en ciclo Primavera-Verano; mientras que Esperanza, Alina y Armida se cultivan en El Bajío, primordialmente Guanajuato, Querétaro, Jalisco y Michoacán, bajo condiciones de riego en ciclo Otoño-Invierno (Fernández, 2013).

Para que una semilla pueda adaptarse a diferentes condiciones de medio ambiente de una localidad se deben cumplir ciertos atributos de calidad, se pueden medir hablando de manera literal, con un grado de importancia dependiendo de la finalidad o uso del grano o semilla como: conservación de recursos genéticos, producción en vivero, siembra directa en tierra arable, o en bosque, o bien para producir alimentos. La calidad de semilla se define como el conjunto de atributos que involucran cuatro factores: físico, fisiológico, genético y fitosanitario (Bustamante, 2010).

La calidad física consiste en determinar el contenido de humedad, pureza (polvo o suciedad, piedras pequeñas, etc.), tamaño de la semilla, color (Bustamante, 2010) así como brillantez (Castañeda *et al.*, 2009), siendo las más destacadas el peso de mil semillas y peso volumétrico. El peso del grano depende fundamentalmente de la cantidad de asimilados disponibles para ser transportados hacia la espiga durante su formación y de la translocación de las reservas existentes en la planta hacia el tallo (Moralejo, 1993). El estrés durante el llenado de los granos produce disminuciones en el peso de los granos (Santoyo & Quiroz, 2004).

La densidad o peso volumétrico es la relación entre el peso y el volumen total de la masa del producto (Bustamante, 2010). Un elevado peso hectolítrico indica una mayor proporción de "materias extractivas", que es lo que busca el cervecero, ya que implica un mayor contenido en almidón (Bauzá, 2005); el peso hectolítrico es directamente proporcional al largo del período de fructificación, por el mayor aporte de almidón que recibe el grano (Ponce, 2005).

Se consideran semillas con calidad fisiológica aquellas que tiene alto porcentaje de germinación, vigor y viabilidad. Una de las pruebas más importantes en germinación es la prueba de germinación estándar, método seguro para determinar si las condiciones seleccionadas de almacenamiento mantienen la calidad de la semilla con el paso del tiempo (Bustamante, 2010). Castillo (2012) menciona que la velocidad de germinación disminuye si se incrementa el contenido de humedad, temperatura y periodo de almacenamiento. Otros estudios indican que un incremento en el índice de estrés hídrico en la etapa de acumulación de reservas disminuyó la germinación en 12% y las deficiencias de humedad acompañadas de altas temperaturas provocaron una alta proporción de semillas pequeñas con baja germinación y vigor en soya (Castañeda *et al.*, 2009).

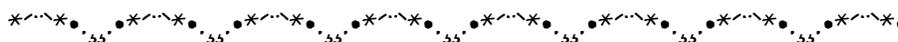
La calidad genética está inherente a la variedad y proporciona el potencial para un buen rendimiento, mejor calidad del grano y mayor tolerancia a estrés biótico y abiótico (Castillo, 2012). De igual forma la calidad sanitaria es la ausencia de todo agente que causa infección o infestación en las semillas, como pueden ser hongos, bacterias, virus, nemátodos, insectos, etc. (Castillo, 2012). Las enfermedades inicialmente presentes en la semilla pueden ocasionar efectos progresivos en su desarrollo en el campo y reducir el valor comercial del cultivo (FAO, 2011).

Por otro lado, es importante señalar que además de los parámetros antes mencionados, existen pruebas bioquímicas que indican ciertas características de la semilla durante la germinación, como son la cuantificación de la actividad proteolítica o la electroforesis en geles de poliacrilamida.

Dávila y Seidl (1992) refieren que durante la germinación en *Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua (judía o frijol) ocurre un aumento en la actividad proteolítica, sugiriendo que puede deberse a la presencia de una endopeptidasa, así mismo, Alquicira (2003), menciona que es una enzima que hidroliza los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos, por lo que cada variedad responde de diferente forma según su genotipo. En cuanto a la electroforesis, la separación de proteínas por este método se puede relacionar con la calidad de la malta mediante sus patrones electroforéticos; además, desde un punto de vista científico, permite profundizar en el conocimiento de uno de los factores que más influyen en la calidad maltera: contenido y tipo de proteína; la hordeína (prolamina), principal proteína de reserva del grano de cebada, ha sido intensamente estudiada a través de este método, permitiendo el análisis de los diferentes tipos de hordeínas (A, B, C y D) (Urbano, Barretto, & Vares, 1996).

Durante y después de la germinación de semillas de cebada, muchos de los biopolímeros presentes en ésta deben romperse en sus subunidades para ser usados como alimento del embrión y en el crecimiento de la planta. Uno de los procesos más importantes es la hidrólisis de proteínas en péptidos y aminoácidos, que es un paso crítico en el malteo y la industria cervecera, por lo que evaluar las diferencias bioquímicas durante el proceso de germinación y conocer la relación con los parámetros de la calidad física y fisiológica de la semilla, resulta de gran interés, debido a ello, en la presente investigación se determinó la cuantificación de proteína de reserva, actividad proteolítica sobre las proteínas de reserva, los patrones electroforéticos de dichas proteínas durante el proceso de germinación (hasta las 120 horas) y su calidad física (peso de mil semillas y peso hectolítrico) y fisiológica (porcentaje de germinación estándar y prueba de vigor: longitud de plúmula), en cinco variedades de cebada maltera, con el fin de compararlas entre sí y por lo tanto, establecer la variedad que pueda producir una planta con la mejor calidad.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS



II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Analizar la actividad proteolítica y los patrones electroforéticos de proteínas de reserva durante el proceso de germinación de cinco variedades de cebada y su relación con la calidad física y fisiológica de la semilla para determinar la variedad que pueda producir una planta con la mejor calidad, utilizando semilla obtenida de acuerdo a dos calendarios de riego y dos arreglos de siembra.

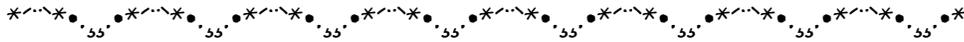
2.2 Objetivos específicos

- Determinar la calidad física de cinco variedades de semilla de cebada mediante el peso de mil semillas y peso hectolítrico, así como la calidad fisiológica utilizando pruebas de viabilidad como germinación estándar y prueba de vigor como longitud de plúmula, para identificar diferencias entre variedades y relacionarlas con las pruebas bioquímicas.
- Realizar las pruebas bioquímicas, cuantificando la proteína de reserva, la actividad proteolítica y sus patrones electroforéticos durante la germinación de cinco variedades de cebada, con el fin de establecer la variedad que pueda producir una planta de mayor calidad.

2.3 Hipótesis

Existen diferencias bioquímicas durante el proceso de germinación de cinco variedades de cebada, utilizando semilla obtenida de acuerdo a dos calendarios de riego y dos arreglos de siembra, que se relacionen con los parámetros de la calidad física y fisiológica de la semilla.

REVISIÓN DE LITERATURA



III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Importancia de la cebada

El cultivo de cebada se produce en casi todo el mundo, el destino de la producción en los mercados internacionales es de 80% para alimentación (para ganado) y 20% para malta (Fernández, 2013). La malta es empleada para la elaboración de diversos alimentos y bebidas en el mundo, entre los que se encuentra el café de malta, dulces, bísquets, productos de panadería de malta, extractos de malta, cereales para el desayuno, vinagres, whisky y cerveza (Fundación Guanajuato Produce, 2004). Sin embargo, existen países que destinan la mayor parte de producción de cebada a la producción de malta para elaboración de cerveza como lo es Argentina (Bragachini & Peiretti, 2009).

México es uno de los países que destina mayormente la producción del cultivo de cebada como materia prima para la industria cervecera con el 80% para malta y el resto para alimentación de ganado (Fernández, 2013) como cerdos y caballos (Inkaplus, 2013). Otros usos de la cebada (con diferente preparación y acompañamiento de otros ingredientes), son como remedio para diferentes malestares del cuerpo, por ejemplo retención de líquidos y úlceras crónicas de las amígdalas (Inkaplus, 2013).

Dentro de la industria cervecera mexicana, se tenía una estructura integrada por el Grupo Modelo y FEMSA (Grupo de Fomento Económico Mexicano, S.A., integrado por Cuauhtémoc-Moctezuma). El primero con siete fábricas de cerveza y dos de malta, y el segundo, seis cerveceras y dos malteras (Aguilar & Schwentesius, 2004). La venta del total de Grupo Modelo (50%) a la belga-brasileña-estadunidense Anheuser Busch InBev (AB InBev) dejó, finalmente, a la industria cervecera mexicana en manos de empresas extranjeras por 20 mil 100 millones de dólares, luego de que en 2010 la holandesa Heineken se hiciera del control de Cuauhtémoc-Moctezuma por 7.3 mil millones de dólares (Milenio, 2012).

A pesar de que la industria cervecera mexicana tenga dueños extranjeros, se precisó que la cebada maltera representa en promedio 300 mil hectáreas de siembra a nivel nacional (incorpora alrededor de 50 mil jornales), integrados más de 20 mil productores, lo que se traduce en 600 mil toneladas al año que se comercializa al 100 por ciento, bajo contrato con la industria, con una derrama económica de 2 mil 500 millones de pesos (SAGARPA, 2012); conjuntamente la llegada de la bebida al consumidor involucra a más de 130,500 empresas (de beneficio de otros granos; malteado; fabricación de vidrio, hojalatas, láminas, aluminio, envases, cartón, corcholatas, maquinaria y equipo, y de transporte) y establecimientos comerciales (al mayoreo, comercio al por menor, supermercados, etcétera), que generan empleos directos e indirectos (Aguilar & Schwentesius, 2004).

El Diario Oficial de la Federación indica que México es un importante productor y exportador de cerveza en el mundo, con presencia en los mercados de los Estados Unidos de América, Europa y Japón principalmente, teniendo un mercado potencial de consumidores con perspectivas de crecimiento continuo (Mendoza, 2013); además es el sexto consumidor de cerveza en el mundo con 62 litros por persona anualmente; después de la República Checa, 189 litros; Alemania, 131 litros; Inglaterra, 103 litros; Estados Unidos, 85 litros; y España, 66 litros (Mendoza, 2013). Sin embargo, los productores de cebada que abastecen a la industria maltera han restringido su capacidad productiva no sólo por la producción nacional, sino que también por importaciones (Flores, 2007). La Secretaría de Economía destaca la necesidad de complementar la producción nacional con importaciones de cebada y malta, sin alterar de manera significativa los costos de producción en el país, ya que la demanda se ha incrementado por el paulatino crecimiento de consumo de cerveza. Subraya que la creciente demanda de granos para consumos humano e industrial, sobre todo de economías como China e India, y la baja en la producción mundial de granos por los efectos climáticos adversos, son factores que presionan al alza los precios internacionales de granos, como la cebada (EL Universal, 2013).

Por otro lado las exigencias del mercado nacional en cuanto a calidad de cebada para malta consisten en presentar buenas condiciones físicas y fisiológicas, sin plagas, con una germinación mínima de 85%, humedad igual o menor al 14%, buen tamaño de grano, porcentajes de grano desnudo o quebrados menores del 5%, menos de 2% de impurezas, un máximo del 10% de grano dañado y hasta 10% de mezclas con otras variedades de cebada (Fundación Guanajuato Produce, 2004). Para verificar el cumplimiento de las características de la cebada demandadas por las empresas cerveceras existen organismos que apoyan su cadena agroindustrial como Impulsora Agrícola (IASA), quien bajo contrato estimula la tecnificación del cultivo de cebada, ayuda a mejorar la productividad en el campo (Aguilar & Schwentesius, 2004) y apoya en la mejora de la calidad de la semilla junto al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Fernández, 2013), de acuerdo a las normas de producción y los lineamientos del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (Aguilar & Schwentesius, 2004), siguiendo la norma mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003, la cual es específica para cebada maltera (Secretaría de Economía, 2003). No obstante es importante monitorear los cambios por los que el cultivo está pasando actualmente, desde cambios climáticos (prolongadas sequías) como la baja productividad y rendimiento entre otros aspectos que ponen en riesgo el trabajo de los agricultores como la industria cervecera.

3.2 Volumen de producción, importación y exportación de cebada

Dada la importancia del cultivo de cebada, hoy en día, en el mundo se cultiva en un espectro de condiciones ambientales más amplio que cualquier otro cereal, (Figura 1) ocupando aquellas regiones con clima o condiciones medioambientales desfavorables para la producción de otros cultivos. Desde las regiones más áridas del norte de África, hasta las ricas y húmedas tierras del centro y norte de Europa. Asimismo, su adaptación en cuanto a latitud y altitud es enorme, desde la Región mediterránea al centro de Finlandia, y desde el nivel del mar en Holanda, hasta las laderas del Tíbet (Himalaya) (Moralejo, 1993).

Para conseguir esto, se han desarrollado grupos varietales que poseen morfología y fisiología muy diferentes (Moralejo, 1993).

Cantidades de producción por país 2012

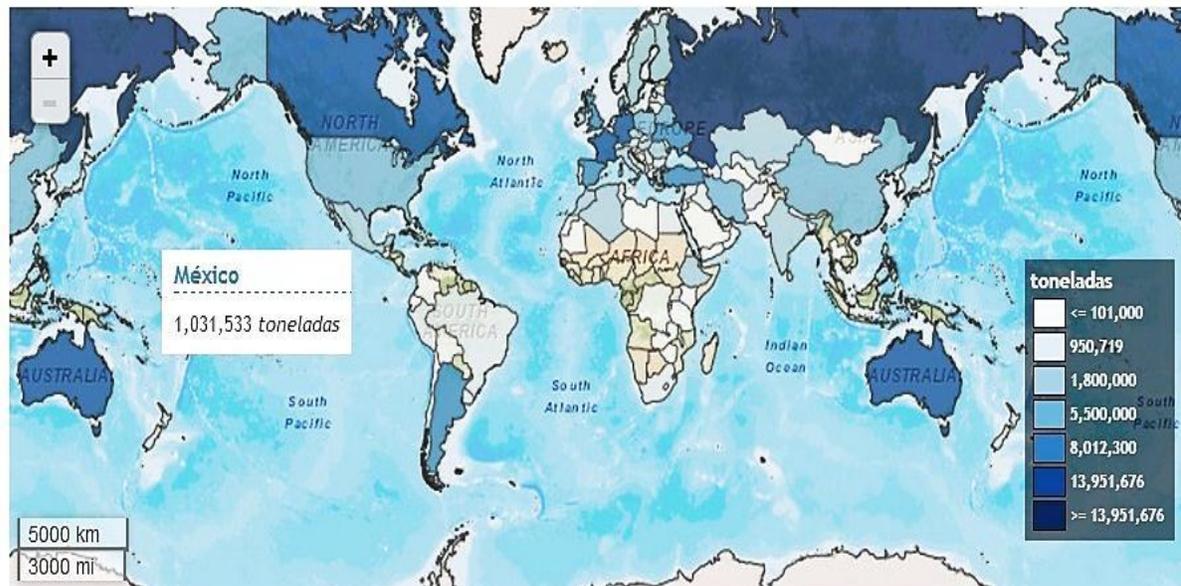


Figura 1. Mapa de distribución de producción de cebada a nivel mundial de 2012. Fuente: (FAOSTAT, 2012)

En 2010 la producción total de cebada en el mundo fue de 123'682,055.2 ton (toneladas), en el 2011 fue de 133'049,075 ton y en el 2012 fue de 132'350,224.92 ton (FAOSTAT, 2012). La región de mayor producción durante el año 2012 fue Europa con el 59.76% (79'093,867 ton), seguido de la región de América con el 15.25% (20'187,275.92 ton), Asia con 14.05% (18'589,360 ton), Oceanía con 6.54% (8'659,652 ton) y África con 4.4% (5'820,070 ton) (FAOSTAT, 2012).

En la región de América la Tasa anual de crecimiento 2000-2012 en cuanto al área cosechada fue de 0.071%, en producción-cantidad es de 2.055% y en rendimiento de cosecha fue de 1.983%. Como se puede observar en la Figura 2, específicamente la Federación de Rusia fue el país de mayor producción durante los últimos años (13'951,676 ton) y el principal productor de semillas de cebada (2'600,000 ton) durante 2012 (FAOSTAT, 2012).

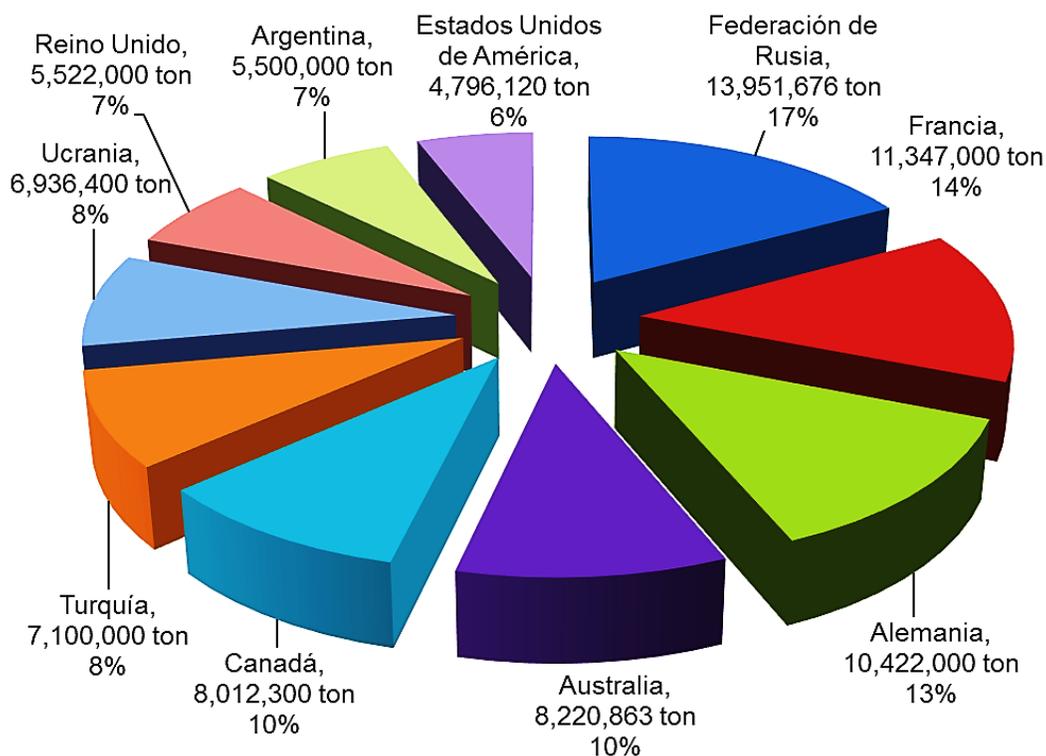


Figura 2. Principales países de producción de cebada (promedio 2012)
 Fuente: (FAOSTAT, 2012)

Dentro de los 25 principales productos cosechados a nivel mundial, la cebada ocupó el noveno lugar con 132'350,224.92 ton durante 2012, después de azúcar-caña, maíz, arroz-cascara, trigo, papas, azúcar-remolacha, yuca y soya (FAOSTAT, 2012).

En cuanto al comportamiento de las importaciones, durante el 2011 la cebada fue el octavo lugar con 24'260,294 ton después del trigo, maíz, soya, torta de soya, aceite de palma, azúcar y arroz (orden descendente). Se mantuvo entre 24 y 25 millones de toneladas desde 2008 a 2011 siendo Arabia Saudita el mayor importador durante 2011 con 6'351,620 ton. Mientras que en las exportaciones la cebada ocupa el octavo lugar con 26'077,133 ton después del trigo, maíz, soya, torta de soya, aceite-palma, arroz y azúcar (orden descendente) durante 2011. Se mantuvo entre 25 y 26 millones de toneladas durante el periodo 2008-2011, siendo Francia el mayor exportador durante 2011 con 5'003,319 ton (FAOSTAT, 2012).

Hablando a nivel nacional, México representó sólo el 0.5% de producción de cebada a nivel mundial con el 33° puesto, el 32° lugar en superficie cosechada con 0.5% mundial, y el lugar 41 en rendimiento, teniendo una Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) 6.02% (1998-2008) (Caballero, 2011). Alrededor de 310,000 ha (hectáreas) de cebada son sembradas anualmente en México, de las cuales 230,000 son de cebada maltera (Fernández, 2013). La producción de cebada (Figura 3) tuvo una racha de menor valor durante los años 2009-2011, sin embargo hubo un incremento aproximadamente del doble con respecto a los años anteriores en el 2012, siendo de 1'031,533 ton. Dentro de los cultivos de mayor producción cosechados en México en el año 2012 la cebada de grano se encuentra en el 21° lugar (ver Cuadro 1), la cebada forrajera en verde ocupa el 40° lugar y la cebada en semilla el 138° puesto (SIACON, 2013).

Se puede observar en la Figura 3 que las importaciones de este cereal en el país han ido disminuyendo desde el año 2008, donde se presentó una de las mayores valores de importación de la última década (en el 2000 se dio una cifra alarmante con 209,746 ton) (FAOSTAT, 2012), lo que nos indica que a pesar de los diversos factores que influyen en la producción como las adversidades ambientales, poco a poco se está abasteciendo la necesidad del mercado nacional; sin embargo la demanda por la materia prima crece cada año en el mercado mexicano (Mendoza, 2013). Sólo durante los años 2009 y 2010 se tuvo una exportación considerable, en años anteriores y aun 2011 fueron valores menores a 6 ton (FAOSTAT, 2012).

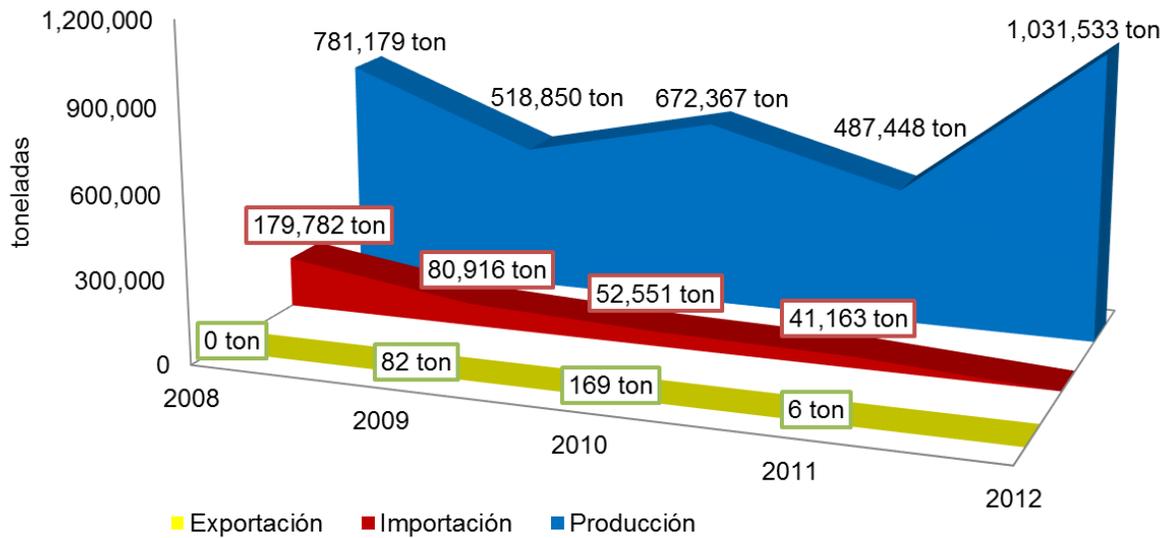


Figura 3. Promedio de exportación, importación y producción de cebada en México (2008-2012) Fuente: (FAOSTAT, 2012)

En el Cuadro 2 se tienen los principales estados de producción de cebada, que son Guanajuato (mayor productor a nivel nacional de semilla), Hidalgo (mayor productor a nivel nacional de grano), Tlaxcala, Puebla, México y Querétaro durante el 2012 (SIACON, 2013). En el estado de Hidalgo los principales municipios de mayor producción de cebada de grano durante el año 2012 son Apan (18.95%), Zempoala (12.06%), Almoloya (10.65%), Singuilucan (9.91%), Tepeapulco (7.37%), Epazoyucan (7.3%), Cuautepec de Hinojosa (7.02%) y Tizayuca (4.08%), de los 27 municipios que producen cebada (SIACON, 2013).

Cuadro 1. Principales productos cultivados en base a su producción en México durante 2012.

Ciclo: Año Agrícola OI+PV 2012								
Modalidad: Riego + Temporal								
Cultivo	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Sup. S (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	PMR (\$/ton)	Valor Producción (miles de pesos)	
1° Fresa (planta)	508	508	0	171,224,500	337,056.10	0.49	83,479.00	
2° Plantero de tabaco (planta)	30.55	30.55	0	121,439,925	3,975,120.30	0.21	25,554.39	
3° Maíz grano blanco	6,959,980.0	6,518,366.3	441,613	20,179,483.1	3.1	4,029.38	81,310,721.6	
4° Noche buena (planta)	240.28	240.28	0	16,097,389	66,994.29	25.1	404,002.19	
5° Maíz forrajero en Verde	655,511.01	586,695.08	68,815.9	12,062,988.2	20.56	588.61	7,100,344.94	
21° Cebada grano	335,767.61	328,190.81	7,576.80	1,031,533.44	3.14	3,824.18	3,944,769.73	
40° Cebada forrajera en verde	38,040.67	35,103.79	2,936.88	479,510.40	13.66	442.24	212,057.74	
138 Cebada grano (semilla)	5,529.00	5,529.00	0	28,869.30	5.22	4,673.15	134,910.55	

OI: Otoño-Invierno; P-V: Primavera-Verano; Sup.: Superficie; S: siniestrada; PMR: Precio Medio Rural
Fuente: (SIACON, 2013).

Cuadro 2. Principales estados de producción de cebada de grano, año agrícola, tanto riego como temporal hasta agosto de 2013.

Ubicación	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	PMR* (\$/ton)	Valor Producción (miles de Pesos)
Guanajuato	82,622.27	82,103.27	435,091.97	5.3	3,830.27	1,666,520.20
Hidalgo	106,576.39	105,236.39	237,773.05	2.26	3,976.08	945,404.09
Tlaxcala	50,913.00	50,913.00	163,679.20	3.22	3,846.55	629,599.91
Puebla	31,687.00	31,200.20	76,970.05	2.47	3,630.33	279,426.93
México	38,895.00	38,895.00	60,638.79	1.56	3,545.36	214,986.57
Querétaro	4,903.00	4,890.00	32,293.66	6.6	3,893.62	125,739.35
Michoacán	1,790.50	1,790.50	9,444.33	5.28	3,744.48	35,364.09
Jalisco	4,210.70	4,210.70	5,487.99	1.3	2,846.88	15,623.63
Zacatecas	2,921.00	2,906.00	3,706.60	1.28	3,063.76	11,356.12
Durango	1,163.75	1,143.75	2,173.50	1.9	3,141.31	6,827.64
San Luis Potosí	8,500.00	3,400.00	1,360.00	0.4	3,650.00	4,964.00
Nuevo León	315	315	1,344.00	4.27	2,543.75	3,418.80
Tamaulipas	500	450	540	1.2	2,200.00	1,188.00
Oaxaca	352	352	522.3	1.48	4,075.57	2,128.67
Veracruz	353	353	449.5	1.27	4,532.03	2,037.15
Baja California	12	12	48	4	3,200.00	153.6
Coahuila	53	20	10.5	0.52	2,950.00	30.98
	335,767.61	328,190.81	1,031,533.44	3.14	3,824.18	3,944,769.73

*PMR: Precio Medio Rural

Fuente: Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA (SIACON, 2013).

3.3 Variedades de cebada cultivadas en México

Como la producción de cebada va creciendo año con año debido a la demanda de la industria cervecera primordialmente, en México se han delimitado regiones productoras de este cultivo, las cuales se dividen en Valles Altos, Centro-Norte y Bajío, éstas se pueden observar en la Figura 4. El Altiplano es una meseta elevada a más de 2,300 metros sobre el nivel del mar (Valles Altos), se caracteriza por tener un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, donde los meses más calurosos del año son en primavera y verano, oscilan entre los 25 y 30°C, mientras que en otoño e invierno la temperatura promedio desciende a menos de 10°C; en el Centro-Norte el clima es seco, cálido y semicálido (en partes como Guanajuato), con temperaturas de hasta 32° en promedio, con un promedio de 1,780 a 2,500 msnm y una precipitación de 450 hasta 974 mm (en San Luis Potosí); en tanto en el Bajío comprende una región fértil con temperaturas en promedio de 26°, presenta clima templado hasta semiseco (como Zacatecas) con una precipitación de 570 a 750 mm (Albanil *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2012; INEGI, 2012; Flores, 2007).

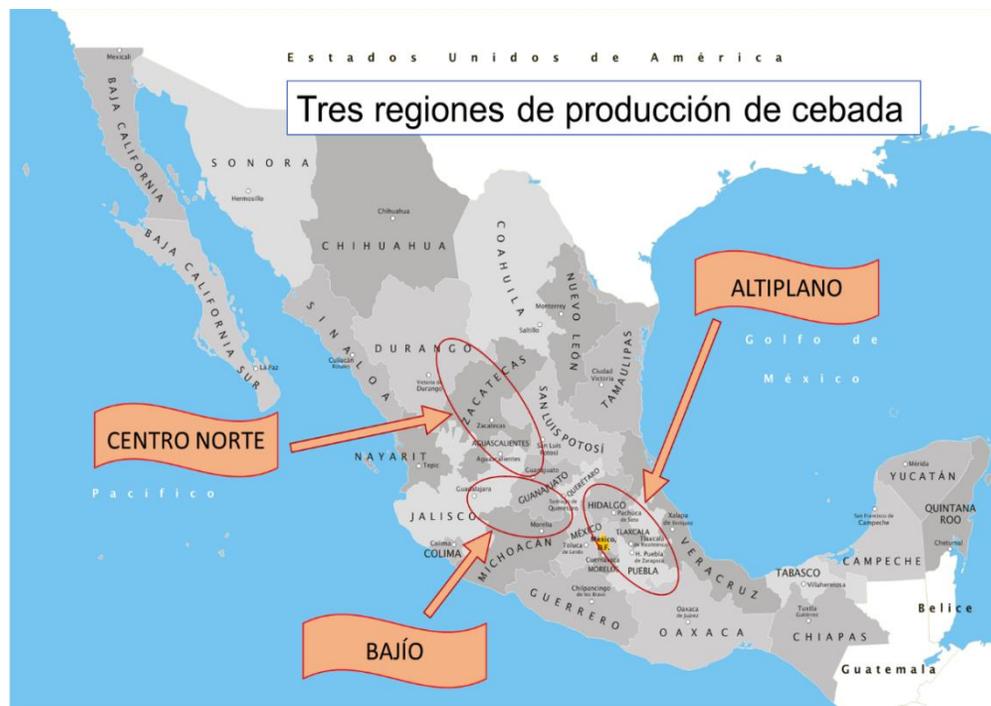


Figura 4. Principales regiones de producción de cebada en México.
Fuente: (Fernández, 2013)

En cuanto a los ciclos de producción (INCA Rural, 2005) nos menciona que el principal ciclo de producción corresponde al de Primavera – Verano, con el 75% del total nacional, donde aproximadamente el 99% se siembra bajo condiciones de temporal; la superficie sembrada bajo este ciclo es de aproximadamente 150,000 ha con un rendimiento promedio de 1.7 ton/ha (ASERCA, 1994; Fernández, 2013). En relación con el ciclo de Otoño – Invierno, se produce cerca del 95% bajo condiciones de riego (Prieto *et al.*, 2012), con 80,000 ha son sembradas y un rendimiento promedio de 5.3 ton/ha (Fernández, 2013), destacando el Estado de Guanajuato, que utiliza este sistema agrícola. La cebada cultivada bajo riego en Bajío, aunque de más alto rendimiento por hectárea, tiene el inconveniente de producir más proteína, lo cual no es favorable para su transformación en malta; de aquí que se considere a la zona de Valles Altos como la que reúne las mejores condiciones agroclimáticas para el cultivo de este grano, ya que se cultiva en condiciones de baja precipitación pluvial y menor uso de fertilizantes, lo cual favorecería la calidad maltera de esta zona (Prieto *et al.*, 2012).

Dentro de estas regiones las variedades que principalmente se cultivan son: Adabella, Alina, Armida, Esmeralda y Esperanza. En el Cuadro 3 se muestra sus características como el año de liberación de variedad, el origen de la línea, el número de hileras, su rendimiento, alguna característica de cultivo, sus días de madurez fisiológica, cantidad de proteína total (% materia seca), sus condiciones y ciclo de cultivo, su zona de adaptación y estados de mayor producción.

Cuadro 3. Características generales de las principales variedades de cebada cultivadas en México.

	Adabella	Esmeralda	Alina	Armida	Esperanza
					
Año de liberación de variedad	2004	1993	2006	2006	1989
Origen de línea	Cruzamiento simple por INIFAP	Por INIFAP con cruzamiento simple de las líneas M9653 X M9667	Cruzamiento doble por INIFAP	Tres progenitores seleccionados por INIFAP	Por INIFAP con genes de enanismo de la variedad Dwarf Good de origen de la India
Número de hileras	6 hileras	6 hileras	6 hileras	6 hileras	6 hileras
Rendimiento (ton/ha)	3.080	2.902	6.271	6.373	6.162
Característica de cultivo	Recomendada para ambientes de mediana a alta productividad y forraje	Tolerancia mancha reticular, escaldadura hoja, roya lineal amarilla (<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>hordei</i>) y acame (caída)	Tolerancia a enfermedades comunes en la región	Tolerancia a la roya lineal amarilla (<i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>hordei</i>)	Amplia tolerancia a roya lineal amarilla (<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>hordei</i>), y cenicilla (<i>Erysiphe graminis</i>); es resistente al acame y al desgrane
Días de madurez fisiológica	101 a 107	96 a 102	95 a 105	95 a 105	100 a 110
Proteína total (% materia seca)	15.2	15.2	12.7	13.0	13.5
Condiciones y ciclo cultivo	Temporal en Primavera-Verano			De riego en Otoño-Invierno	
Zona de adaptación y estados de mayor producción	Valles Altos: Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Estado de México, partes de Oaxaca y de Veracruz (más del 90% del área por Esmeralda); Centro-Norte: Zacatecas, San Luis Potosí, Durango y Guanajuato (principalmente Esmeralda)			El Bajío: Guanajuato, Querétaro, Jalisco y Michoacán	

Fuente: (Consejo Mexicano de la Cebada Maltera, 2005; Santoyo & Quiroz, 2004; Fernández, 2013; Impulsora Agrícola, 2011; Aguado, 2008; Zamora *et al.*, 2007; Zamora *et al.*, 2006).

3.4 Origen del cultivo de cebada

Todas las variedades de cebada cultivadas en México o cualquier parte del mundo tienen un origen en común, el dato exacto es ambiguo, sin embargo haciendo un breve recorrido en la historia, se encontró que en 1986 Bar Josef & Kislev en excavaciones de una aldea neolítica del valle del Jordán, Israel, encuentran restos de (*H. vulgare* y *H. spontaneum*) estimado entre 8,260 y 7,800 A.C., correspondiendo este hallazgo a los comienzos de la agricultura (Morales *et al.*, 2010). En excavaciones arqueológicas realizadas en el valle del Nilo se descubrieron restos de cebada, con unos 15,000 años de antigüedad, además los descubrimientos también indican el uso muy temprano del grano de cebada molido (Álvarez, 2011); las cebadas de seis carreras, aparecieron hace aproximadamente 10,000 años tras el proceso de domesticación; la aparición de cebadas cultivadas con granos desnudos, tuvo lugar hace unos 8,000 años con el proceso de la domesticación (Moralejo, 1993).

Por otra parte INCA Rural (2005) dice que se tienen antecedentes del cultivo de la cebada en las culturas babilónica, egipcia y china, en donde se cosechaba este producto de forma silvestre. Se considera que de manera accidental se descubrieron las propiedades de la cebada, cuando al estar almacenada cierto tiempo, por las condiciones de humedad, ésta germinaba y al ser empleada para la preparación de alimentos, éstos resultaban con mejor textura y sabor. Así, en forma deliberada se inició el proceso de germinación de cebada.

A manera de conclusión Moralejo (1993) considera que el origen de las cebadas cultivadas ha sido explicado por diversos autores desde dos puntos de vista diferentes: el primero considera que la cebada cultivada es un cultivo monocéntrico, esto es, que tiene un centro de origen definido, el Creciente Fértil, y uno o más centros de diversidad.

La zona del Creciente Fértil abarcaría diversos países como Turquía, Irán, Irak, Jordania, Siria e Israel, donde la cebada fue domesticada hace unos 10,000 años a partir de una cebada silvestre de dos carreras. Para varios autores el Creciente Fértil es además un centro de diversidad, donde están presentes múltiples genotipos adaptados a diferentes rangos ecológicos, lo que haría posible la distribución de las cebadas silvestres y cultivadas hacia otras áreas geográficas como centros de diversidad alternativos, como Etiopía (Moralejo, 1993).

Una segunda teoría que apunta hacia la existencia de múltiples centros de origen de la cebada cultivada. Existen diversos estudios que avalan dicha teoría basados en evidencias agromorfológicas y bioquímicas. Shao Quiquan (1981) propuso el origen y evolución de la cebada cultivada como un proceso continuo con diferentes etapas, la primera de las cuales sería el *H. spontaneum* (cebada silvestre) y la última ya cultivada, *H. vulgare*. Marruecos y China han sido considerados como un centro de domesticación para las cebadas cultivadas de seis carreras (Moralejo, 1993).

Haciendo referencia a nuestro país, la cebada fue introducida a México durante el siglo XVI por agricultores españoles, la primera variedad sembrada era de origen español denominada "Criollo". La producción de grano fue impulsada con el establecimiento de la primera cervecería en 1865. Sin embargo, fue hasta 1950 que la Industria Cervecera demandó una mayor producción en cantidad y calidad, por lo que se estableció un programa de investigación por la Secretaría de Agricultura, la Fundación Rockefeller y la Asociación Mexicana de Cebada Maltera (Fernández, 2013).

3.5 Taxonomía, morfología y composición química del grano de cebada

Una vez descubierta y valorada con su domesticación, la cebada adquirió múltiples usos, por lo que su identidad fue necesaria como componente básico dentro de la clasificación de los cereales; se define como una planta monocotiledónea anual perteneciente a la familia de las poáceas (Anexo 2), y al género *Hordeum*. Linnaeus (1757), clasifica a la cebada en cuatro especies cultivadas diferentes, basado en la fertilidad y diferencias morfológicas de las espigas. Botánicamente el origen de *Hordeum vulgare* se encuentra en *Hordeum spontaneum* (silvestre), que se caracteriza por que tiene una espiga de dos hileras, raquis quebradizo y germinación tardía. *Hordeum distichum* L. (2 hileras), se emplea para la obtención de cerveza. *Hordeum hexastichum* L. (3 hileras), se utiliza básicamente como forraje para la alimentación animal. Ambas especies pueden agruparse bajo el nombre único de *Hordeum vulgare* L., ssp. *vulgare* (Agro-Inversiones, 2009). La clasificación taxonómica del cultivo de cebada se describe en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Taxonomía de la cebada.

Dominio: Eucaria

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta (Plantas vasculares)

Subdivisión: Spermatophyta (Plantas con semilla)

División: Magnoliophyta (Plantas con flores o angiospermas)

Clase: Liliopsida (Monocotiledóneas)

Subclase: Commelinidae

Grupo: Glumiflora

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Hordeum* L.

Especie: *H.vulgare* L. o *H. hexastichum* L. (seis hileras) y *H. distichum* L. o *H. deficiens* L. (dos hileras)

Fuente: (Castillo, 2012)

En cuanto a la morfología de la cebada, se puede observar en la Figura 5, está recubierta por una carióspside, la cual es una fusión entre los pétalos de la flor con el ovario; el embrión está formado por un eje embrionario y en él se diferencian la radícula, el hipocótilo y la plúmula, por lo que el grano es un fruto de una sola semilla; la palea y la lema (también llamados glumilla) son vestigios florales que se encuentran en la parte ventral y dorsal de la semilla, siendo la barba su prolongación; la testa esta fundida con el pericarpio (compone entre 2-3% del peso del grano); la capa aleurona (entre el 4-5% del peso seco del grano) está constituida por células ricas en proteína y exentas de granos de almidón; el endospermo o albumen (constituye el 75-80% del peso total del grano) almacena las reservas alimenticias de la semilla (alto contenido de almidón); separando el embrión del depósito de nutrientes o endospermo se encuentra el escutelo (único cotiledón modificado en gramíneas); la raquilla es parecida a un tallo con vellos que está adherida a la base en el exterior del grano y por el micrópilo se puede permear el aire y el agua a la planta (Carvajal & Insuasti, 2010; Castillo, 2012; Morales *et al.*, 2010; Moreno¹, 1996; Pérez, 2006).

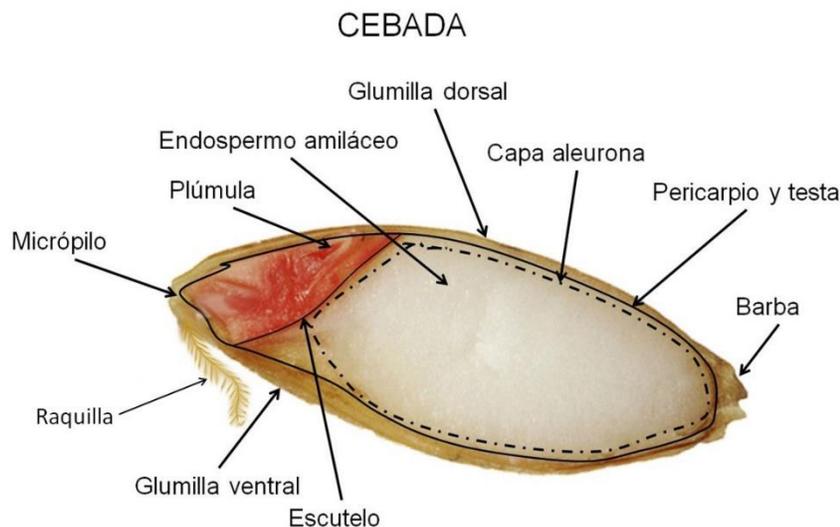


Figura 5. Partes del grano de cebada. Fuente: (Paucar, 2013)

En lo que se refiere a su composición química, es importante indicar que el grano de cebada es fuente de potasio, magnesio y fósforo, pero su mayor virtud es contener oligoelementos: hierro, azufre, cobre, cinc, manganeso, cromo, selenio, yodo y molibdeno (Tamayo, 2011), asimismo su composición química es diferente de acuerdo a su presentación, en el Cuadro 5 se puede observar la composición química de la cebada como grano, paja y cebada verde.

Cuadro 5. Composición química de un grano de cebada, en paja y cebada verde.

	Grano de cebada	Paja	Cebada verde
En 100 g de cebada:			
Proteínas	10 g	1.9 g	2.5 g
Materia grasa	1.8 g	1.7 g	0.5 g
Hidratos de carbono	66.5 g	-	-
Celulosa	5.2 g	34.4 g	5.6 g
Materias minerales	2.6 g	-	-
por ejemplo:			
Calcio	55 mg	-	-
Hierro	4.5 mg	-	-
Fósforo	341 mg	-	-
Calorías	348 Kcal	-	-
Agua	14 g	14.2 g	80.9 g
Materia no nitrogenada	-	43.8 g	8.8 g

Fuente: (FENALCE, 2009; INCAP, 2000).

3.6 Germinación de la semilla

Uno de los factores que influye en la composición química del grano de cebada es el proceso de germinación; en términos fisiológicos, la germinación se considera como el proceso que comienza con la hidratación de los diferentes tejidos que constituyen la semilla, resultando una serie de complejos acontecimientos metabólicos escalonadamente, y termina con el inicio del crecimiento o elongación de la radícula; en cereales la emergencia del coleóptilo es signo de germinación (Pérez, 2006).

El principal objetivo de la germinación es generar nutrientes, principalmente azúcares y aminoácidos mediante la modificación del endospermo, la cual ocurre por el desarrollo, distribución y acción de enzimas (α y β amilasas, proteasas, arabinoxilasas y β -glucanasas) (López, 2011). Existe una germinación simultánea cuando la mayor parte de la población germina en un corto periodo, y continua cuando se extiende a lo largo de un lapso mayor (Moreno¹, 1996).

3.6.1 Etapas de la germinación

El primer paso para que se inicie la germinación es que la semilla entre en contacto con el agua para hidratarse y así exista un medio acuoso donde los procesos enzimáticos puedan llevarse a cabo, generalmente no más de 2 a 3 veces su peso seco; el agua tiene que atravesar una membrana permeable, la cual presenta una alta concentración de sustancias en uno de los lados, esto produce una presión de imbibición, de fuerza considerable, la cual llega a alcanzar valores de cientos de atmósferas. Esta presión puede llevar al rompimiento de la testa durante la germinación (Moreno¹, 1996). Álvarez (2011) expresa que el grano de cebada incrementa su tamaño en un 40% debido a la absorción de agua durante la germinación. El oxígeno disuelto en el agua de imbibición debe poder llegar hasta el embrión, a medida que aumenta la cantidad de agua puesta a disposición de la semilla, disminuye la cantidad de oxígeno que llega al embrión (Pérez, 2006).

Poco tiempo después de que el embrión ha sido hidratado, se libera ácido giberélico (GAs), hormona vegetal natural (2), sintetizada por el eje embrionario; ésta se difunde hacia el endospermo a través del escutelo (1) para enviar señales a la capa de aleurona que rodea al endospermo (3), donde se induce la producción de enzimas hidrolíticas (la capacidad de la cebada para producir enzimas hidrolíticas depende de la cantidad y la viabilidad de las giberelinas generadas), como son la α -amilasa, proteasa, ribonucleasa y β 1, 3-glucanasa (4) para atacar la hemicelulosa de las paredes; las paredes celulares se degradan, las reservas en forma de proteínas se hidrolizan para formar aminoácidos, se empieza a desdoblar el almidón en azúcares

(principalmente maltosa y glucosa) y los lípidos dan lugar a ácidos grasos más glicerol respectivamente (5), todo esto con la finalidad de nutrir al embrión; así se inician las divisiones mitóticas, el crecimiento celular y la diferenciación de las células que se van originando, en un futuro convertirán al embrión en una joven plántula (Sarría, 2003; Pérez, 2006; Moreno¹, 1996; López, 2011) (Figura 6).

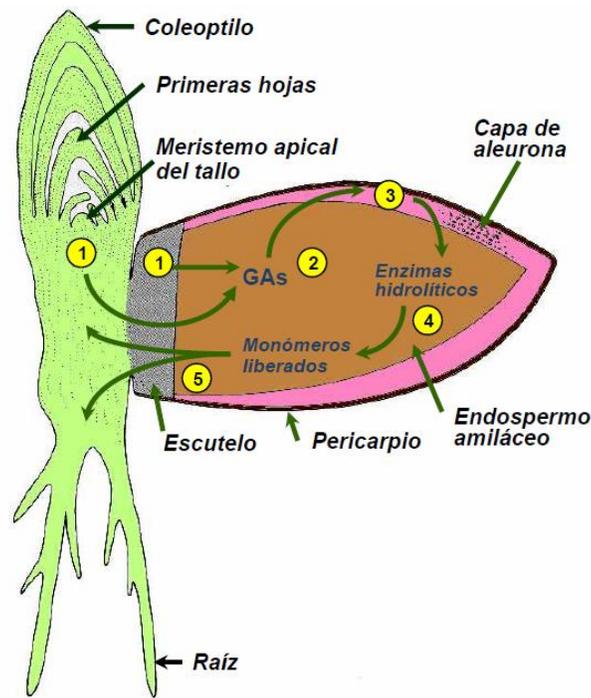


Figura 6. Proceso de germinación de una semilla. Fuente: (García, 2008)

En la Figura 7, y continuo al proceso anterior, se muestra que generalmente se comienza con la primera estructura emergida de la semilla, es decir, la raíz del embrión llamada radícula, después aparece el hipocótilo o plúmula. Esta raíz rápidamente penetra en el suelo y permite que la planta se ancle y comience a absorber agua y nutrientes. El único cotiledón (escutelo) fundamentalmente absorbe agua y nutrientes ya digeridos en el endospermo y los transporta a las partes del embrión que están creciendo. Para esto, la envoltura basal del cotiledón se ha alargado para formar el coleóptilo (Moreno¹, 1996). Una vez que el coleóptilo atraviesa la superficie del suelo deja de crecer, se abre y aparece la primera hoja, seguida rápidamente por la segunda y tercera hoja (Impulsora Agrícola, 2011).

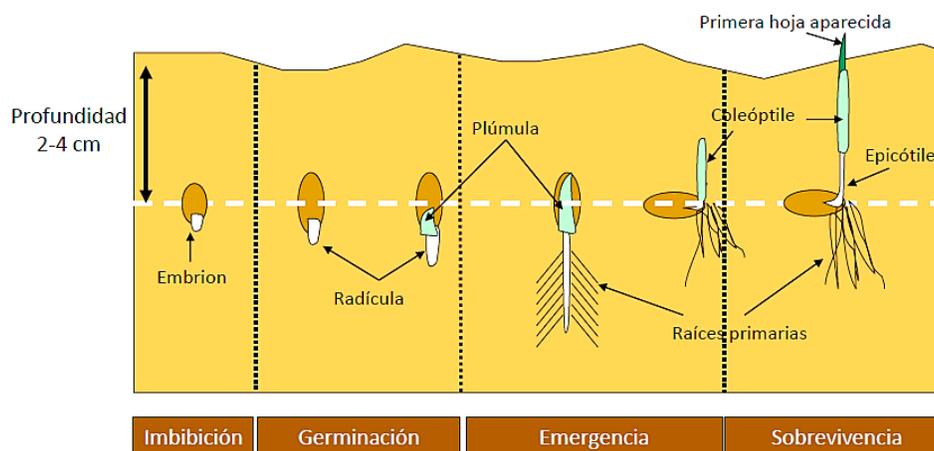


Figura 7. Emergencia de la semilla de cebada

Fuente: (García, 2012)

3.6.2 Ciclo vegetativo de la cebada

Posterior a la germinación de la semilla, comienza la sobrevivencia de esta con la aparición de la primera hoja junto a las diferentes etapas del ciclo vegetativo, el periodo de cada etapa difiere de acuerdo a la variedad, adaptabilidad y las condiciones del cultivo.

En la Figura 8 se puede observar el ciclo vegetativo de la cebada y el periodo aproximado en que se da cada etapa. La germinación comienza durante los primeros 7 días después de la siembra (dds); se puede dividir en cuatro etapas: imbibición, hidratación de enzimas hidrolíticas (aceleran las reacciones en componentes más simples por reacción con moléculas de agua), división y alargamiento celular y emergencia de la radícula (o de la plúmula), pudiendo ser simultáneas; la temperatura mínima para germinar va de 3° a 4°C, la óptima es a 20° C y la máxima entre 28° a 30° C. La emergencia demora entre 5 a 10 días según temperatura del suelo y humedad; el coleóptilo emerge primero, rompe el suelo y permite dar paso a la primera hoja; las raíces primarias pierden importancia en la medida que comienza el desarrollo de las raíces principales o coronarias que sirven de anclaje y proveen de agua más nutrientes a la planta (Agro-Inversiones, 2009; Lallana & Lallana, 2001).

Las hojas y el tallo principal emergen entre los 10 y 19 dds; el tallo principal se ubica en el lugar de unión del mesocótilo con el coleóptilo, permanece bajo el suelo, creciendo lentamente hasta alcanzar la superficie, poco antes se produce un ligero engrosamiento del primer nudo, hecho que marca el comienzo de la fase de encañado, puede alcanzar una altura entre 0.6 a 1.3 m de donde nacen las hojas que producen follaje muy denso, al completar su desarrollo termina en una inflorescencia denominada espiga; en tanto las hojas son largas y de un color más claro que las de trigo, su ancho varía de 5 a 15 mm y los cultivares primaverales se caracterizan por presentar hojas lisas. Las macollas o tallos secundarios pueden ser de dos a nueve en cebadas primaverales, dependiendo de la densidad de siembra y disponibilidad de agua y nutrientes; el número y vigor de la macolla determinará en un porcentaje significativo el número de espigas verdaderas que sobrevivirán por metro cuadrado y se da entre los 20 y 29 dds (Agro-Inversiones, 2009; Lallana & Lallana, 2001).

El encañado comienza con la aparición del primer nudo antes que esté sobre la superficie del suelo y se da en los 30 a 49 dds, en ese momento es posible visualizar la futura espiga. La espiga corresponde a la prolongación del último entrenudo del tallo formada por espiguillas, las cuales van dispuestas de a tres en forma alterna en ambos lados del raquis, si son fértiles, se originará una espiga de seis hileras (*H. hexastichum* L.) y si sólo resultan fértiles las espiguillas centrales, se originará una espiga de dos hileras (*H. distichum* L.), su aparición es de 50 a 59 dds. Cada flor, por su parte, tiene tres estambres y un pistilo, compuesto por un ovario y un estigma dividido (Agro-Inversiones, 2009; Lallana & Lallana, 2001).

Cuando comienza la floración, se da con la aparición del primer estambre, días después de la espigadura, siendo entre los 60 a 69 dds; la apertura de las flores comienza en el segundo tercio de la espiga empezando por la espiguilla central y posteriormente las laterales y continua hacia arriba y hacia abajo; la flor se abre por 100 min y la floración se completa en dos días (Agro-Inversiones, 2009; Lallana & Lallana, 2001).

La formación de grano se produce después de la polinización, en un periodo aproximado de 70 a 77 dds; el crecimiento del grano dentro de la flor es muy rápido en longitud, cuando comienza la etapa de grano pastoso, coincide con el máximo contenido de agua del grano y el fin del aumento de materia seca; el llenado del grano dependerá del suministro de carbohidratos y citoquininas y se completa en 30 días después de la anté시스 (cuando las flores se abren y se polinizan); el grano esta vestido por palea y lema, la primera cubre el grano y la segunda lo envuelve, su longitud máxima de 9.5 mm y mínima de 6.0 mm; de ancho 2.5 y 3.0 mm. La madurez del grano se da cuando el grano llega a un 40% de humedad, aproximadamente de 80 a 89 dds, mientras que la madurez de campo se produce cuando el grano se seca, se encoge y se vuelve duro. Por último la senescencia se da en el momento que se seca el último entrenudo, granos muy duros y muerte de la planta, por lo que se puede iniciar la cosecha donde los granos contiene una humedad bajo 13%, esto entre los 90 y 99 dds (Anexo 2) (Agro-Inversiones, 2009; Lallana & Lallana, 2001).

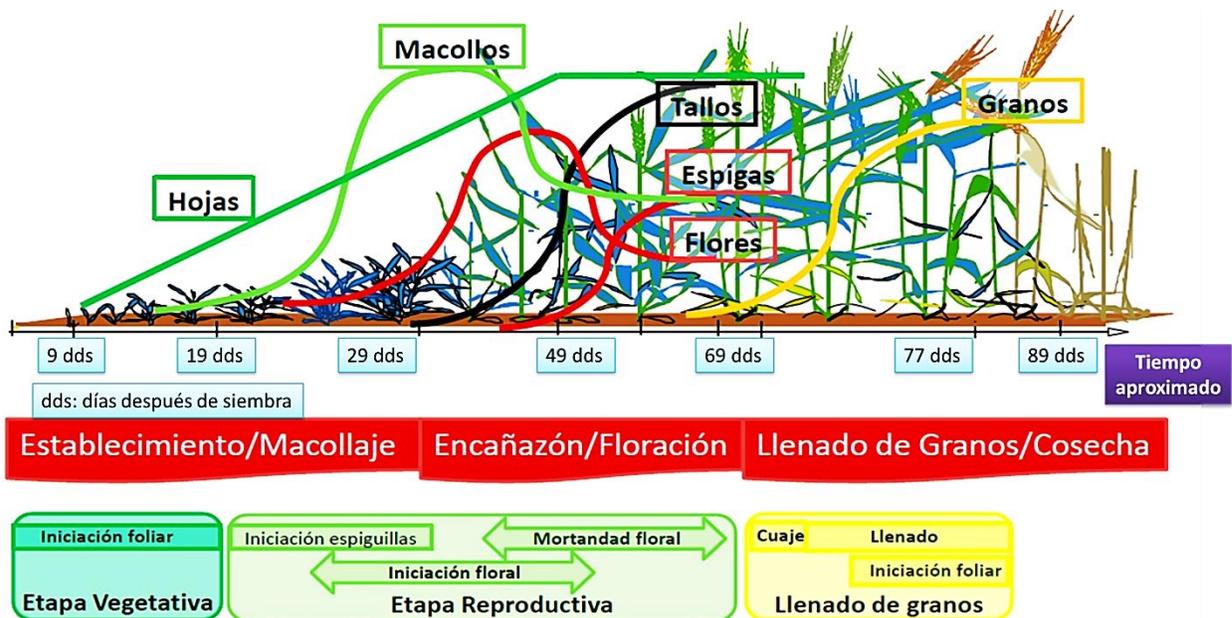


Figura 8. Ciclo vegetativo de cebada.
Fuente: (García, 2012; Agro-Inversiones, 2009)

Fernández (2013) refiere que las características ideales para que una variedad de cebada pueda germinar en una planta vigorosa se muestran en el Cuadro 6, indica que es importante que la planta tenga cierta altura y tallo fuerte que pueda ser resistente al encamado (tendencia de un cultivo a inclinarse hacia el suelo); un ciclo vegetativo corto para tolerar adversidades climatológicas; el mayor potencial de rendimiento posible y menor descascare; asimismo que sobreviva ante los ataques de enfermedades y plagas importantes.

Cuadro 6. Características ideales en una variedad de cebada.

Características	Valles Altos (temporal)	Bajío (riego)
Altura de planta	100 cm	80 - 90 cm
Tallo	Fuerte, resistente a acame	
Ciclo vegetativo	90 - 100 DMF*	105 - 115 DMF*
Potencial de rendimiento	3 ton/ha	7 ton/ha
Descascare de grano	Resistente	
Sequía	Tolerante	
Enfermedades y plagas	Tolerante: Roya lineal amarilla (<i>Puccinia striiformis</i>), roya de la hoja (<i>Puccinia hordei</i>), cenicilla polvorienta (<i>Erisiphe graminis</i>), mancha foliar (<i>Helminthosporium</i> spp.), escaldadura (<i>Rynchosporium secalis</i>), carbón volador (<i>Ustilago nuda</i>), carbón cubierto (<i>Ustilago hordei</i>) y pulgón ruso (<i>Diuophis noxia</i>)	

*Días de madurez fisiológica; Fuente: (Fernández, 2013)

3.6.3 Factores de interferencia en la germinación

Las características de la cebada son afectadas por ciertos factores durante la germinación de la semilla, que si son controlados, el resultado será una planta vigorosa. Los factores más importantes que influyen en el proceso de germinación son: humedad, temperatura, oxígeno e iluminación.

Para que la semilla vuelva a un metabolismo activo es necesario que sus tejidos se rehidraten; al parecer la duración del día influye en las semillas en cuanto a la permeabilidad de la testa, puesto que las condiciones de humedad ambiental que experimenta la planta progenitora durante la maduración de las semillas también determinan el grado de impermeabilidad de la testa (Moreno¹, 1996); si la humedad es limitada, la formación del grano final se verá afectado; mientras que un exceso de agua es desfavorable para la germinación ya que dificulta la llegada de oxígeno hasta el embrión (Pérez, 2006). Estudios indican que un incremento en el índice de estrés hídrico en la etapa de acumulación de reservas disminuyó la germinación en 12% y el peso seco de plántula en 5% de las semillas de soya (Castañeda *et al.*, 2009). En particular, los granos con bajo contenido de proteína tienden a absorber más rápidamente agua que aquellos que tienen mayor contenido de proteína (López, 2011).

La obtención de semilla sana y vigorosa en regiones con lluvias frecuentes o ambientes húmedos es difícil, debido a problemas con la polinización y la incidencia de enfermedades que pueden desarrollarse en las semillas (Castañeda *et al.*, 2009), es por ello que durante el cultivo de la cebada (invierno y primavera), el mínimo óptimo de láminas de riego requeridas para que la cebada tenga un buen rendimiento se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Láminas de riego óptimas para el cultivo de cebada de invierno y de primavera en año seco, medio y húmedo.

	Año		
	Seco	Medio	Húmedo
Cebada de invierno	289-243 mm	193-176 mm	157-143 mm
Cebada de primavera	280-223 mm	206-173 mm	177-155 mm

Fuente: (Ortega *et al.*, 1999)

La asociación entre la humedad y la temperatura, interviene de manera importante en la longevidad de una semilla, ya que este periodo se duplica cada vez que se reduce el contenido de humedad de las semillas en un 1% (solo si está dentro del rango de humedad entre 5-14%); y cada vez que la temperatura de almacenaje disminuye en 5°C (si está dentro del rango de temperaturas mayor a 0°C) (Aníbal, 2011); así mismo las deficiencias de humedad acompañadas de altas temperaturas provocaron una alta proporción de semillas pequeñas con baja germinación y vigor en soya según datos de Castañeda *et al.* (2009). Entrando específicamente con la temperatura, se sabe que afecta la tasa de imbibición a través de su efecto sobre la viscosidad del agua y probablemente también sobre la permeabilidad de los tejidos (Aníbal, 2011); si es alta, se acelera la tasa de crecimiento del grano y se acorta su duración, disminuyendo el peso final del grano (Castañeda *et al.*, 2009); en avena por ejemplo, se encontró que las altas temperaturas durante el desarrollo seminal generaron un menor nivel de dormición (característica interna de las semillas que impide su germinación bajo condiciones térmicas, hídricas y gaseosas); la temperatura y el rango en el cual las semillas germinan, está en función de su origen, sus características genéticas y edad (Castañeda *et al.*, 2009). Con una temperatura óptima se obtiene el porcentaje más alto de germinación en el menor tiempo (Moreno¹, 1996).

En cebada, Aníbal (2011) desarrolló modelos predictivos de la susceptibilidad al brotado pre-cosecha (BPC, es el proceso cuando las condiciones de humedad persisten en campo, continuando la germinación más allá del punto de no retorno, por lo que el embrión pierde la tolerancia a la desecación e implica una pérdida inmediata de la viabilidad) basados en los efectos del ambiente térmico, de esta manera, si la susceptibilidad es alta y existe pronóstico de lluvias, el productor de cebada puede anticipar la cosecha y secar artificialmente. Para una adecuada germinación, este cultivo necesita una temperatura de 6°C, para florecer 16°C y madura a los 20°C (temperatura óptima), aunque incluso puede cultivarse hasta los -10°C (Pérez, 2010).

De igual forma, la temperatura, afecta por un lado, a la velocidad de consumo de oxígeno por el embrión, quien lo necesita para la obtención de la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas, y por el otro, modifica inversamente la solubilidad del oxígeno en el agua que absorbe la semilla (Pérez, 2006). La mayoría de las semillas germina en una atmósfera que contenga 20% de oxígeno (presentarán valores menores de germinación si la tensión de oxígeno disminuye) y bajo porcentaje de bióxido de carbono 0.03%, (no germinarán si aumenta mucho la tensión del bióxido de carbono) (Moreno¹, 1996).

Otro factor de importancia es la iluminación; la calidad de la luz (longitud de onda) recibida durante el desarrollo seminal puede ser determinante para la germinación de la semilla madura; trabajando con *Arabidopsis thaliana*, encontraron que la habilidad para germinar en la oscuridad era mucho mayor en semillas que maduraron bajo luz con alta relación rojo/rojo lejano. La longitud del día (fotoperíodo) experimentado por la planta madre influye durante el desarrollo de la semilla, los días cortos se relacionan con altos niveles de dormición en cebada cervecera (Aníbal, 2011).

Durante el proceso de producción, en el cultivo de cebada, el agricultor no siempre considera los diferentes destinos que este cereal tiene, cayendo fácilmente en el mal uso y abuso del nitrógeno con la esperanza de obtener altos rendimientos, dada la buena respuesta que tiene el cereal a este nutriente. Para consumo animal es importante el contenido de proteína, una aportación balanceada de nitrógeno, fósforo y potasio (NPK) asegura la buena calidad del grano; en cambio, las cebadas para malta, requieren que la riqueza de los extractos, el poder germinativo y el contenido bajo de proteínas entre otras características sean máximos, por lo que es necesario establecer un riguroso control en las aplicaciones de nitrógeno; la utilización de una fertilización balanceada de NPK desde el inicio del cultivo, produjo plantas de mayor vigor en este cereal, no existiendo el problema de acame o encamado, aún a mayores densidades de siembra, lo que permitió obtener mejores rendimientos (Torres & Lazcano, 2002).

La mayor eficiencia en el uso del nitrógeno se debe principalmente a factores genéticos, puesto que brinda mayor estabilidad al contenido de proteínas de los granos. Al tener mayor cantidad de granos e igual contenido del nutriente en el suelo, estos tendrán un menor contenido de nitrógeno (Gimenez & Tomaso, 2008). Además concretamente la cebada es el cereal de mayor tolerancia a la salinidad, sin que afecte el rendimiento (Prieto *et al.*, 2012).

3.6.4 Proteínas en la germinación

Además de regular los factores que afectan la germinación de una semilla, el embrión, por otro lado, durante este proceso necesita de proteínas de reserva que puedan nutrirlo conforme a su crecimiento, ya que dentro de él se diferencian la radícula y la plúmula (primera estructura emergida). Para comenzar, las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células, formadas por una o varias cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos; fundamentales en aspectos de estructura y funciones celulares; especializadas en una función biológica diferente; todas contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, la mayoría tienen azufre y algunas particularmente fósforo, hierro, cinc y cobre; sus pesos moleculares varían de 5 000 hasta 1 000 000 g/mol o más. Se dividen en dos clases basándose en su composición: simples (por hidrólisis producen solo aminoácidos) y conjugadas (por hidrólisis producen aminoácidos, componentes orgánicos e inorgánicos; se dividen en nucleoproteínas, lipoproteínas, fosfoproteínas, metalproteínas y glucoproteínas). Se pueden clasificar en dos clases por su conformación: fibrosas (resistentes, insolubles en agua o disoluciones salinas diluidas; ejemplo colágeno, α -queratina y elastina) y globulares (solubles en sistemas acuosos; abarcan la mayoría de proteínas); en proteínas completas (que presentan aminoácidos esenciales o de alto valor biológico) o incompletas (bajo valor biológico o sin aminoácidos esenciales) (Lehninger, 1983).

De igual forma se clasifican por la conformación de su estructura: proteínas primarias (esqueleto de la cadena polipeptídica, descripción de la secuencia de los enlaces peptídicos y puentes disulfuro), secundarias (arreglo espacial de la cadena polipeptídica en una dirección, α -hélice y β -plegada; evidencia proteínas fibrosas o globulares), terciarias (curvas o pliegues de la cadena polipeptídica) y cuaternarias (disposición en el espacio de las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena). Otra clase de proteínas es de acuerdo a su función biológica: enzimas (ejemplo la hexoquinasa), proteínas transportadoras (ejemplo hemoglobina), proteínas contráctiles (ejemplo miosina), proteínas protectoras o defensivas (ejemplo inmunoglobulinas), toxinas (ejemplo toxina diftérica), hormonas (ejemplo insulina), proteínas estructurales (ejemplo colágeno) y proteínas de almacenamiento o reserva (ejemplo hordeínas en cebada) (Lehninger, 1983).

Retomando las proteínas de reserva, que están depositadas en el endospermo y en la capa aleurona, se subdividen principalmente en su capacidad para solubilizarse en ácidos y bases débiles (Moreno¹, 1996). Esta clasificación fue desarrollada por Osborne (1924) y consistió en una serie de extracciones consecutivas en trigo en base a su solubilidad, donde las separaron en cuatro fracciones: con agua para la fracción albúmina, con una solución de sal diluida para la fracción globulina, una solución de alcohol para la fracción prolamina y una solución con ácidos o con hidróxidos metálicos diluidos (alcalina) para la fracción glutelina (de la Vega, 2009); (Garnero, 2006). Para la cuantificación de las proteínas extraídas secuencialmente se utiliza el método de Bradford (1976) que se basa en la unión de un colorante azul de Coomassie, (Coomassie Brilliant Blue G-250) a las proteínas en solución, y la cantidad de absorción es proporcional a la proteína presente (este provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante entre 465 a 595 nm (Fernández & Galván, 2006).

En cebada las proteínas ocupan entre 8-13% de la materia seca total del grano; generalmente la cantidad de albúminas es relativamente baja (3-5% del total de proteína); considerable cantidad de globulinas (10-20%); mayoritariamente son las hordeínas (35-45%), de bajo peso molecular y gran influencia en calidad tecnológica y nutricional; y por último glutelinas (35-45%) de alto peso molecular; las hordeínas y glutelinas son altas en ácido glutámico, prolina, glicina y fenilalanina; la distribución de las fracciones de proteínas depende de la variedad y condiciones agronómicas; la mayor parte del nitrógeno está en el endospermo como proteína de reserva (Aguado, 2008; Giambastiani & Rubiolo, 2002; López, 2011).

Puede decirse en términos generales, que la absorción de materias proteicas por la planta se completa antes de la floración. Un período post-floral largo con abundancia de sol y de humedad en el suelo y calor moderado, favorecerá la formación del almidón, con disminución correlativa de la proteína. Un tiempo fresco, con abundantes precipitaciones en los meses de septiembre y octubre, aumenta el contenido de proteínas. En cambio, la abundancia de sol cuando la cebada comienza a madurar, lo disminuye. Las lluvias moderadas y a intervalos regulares, originan un porcentaje menor de proteína que las lluvias fuertes y abundantes a intervalos más espaciados (Bauzá, 2005).

3.6.5 Patrones electroforéticos de proteína de cebada

Para poder estudiar una proteína con cierto detalle es necesario separarla del resto de proteínas y disponer de técnicas que permitan determinar sus propiedades. Los métodos de separación aprovechan propiedades como el tamaño, la carga y las propiedades de unión, denominado fraccionamiento, utilizando primeramente diferencias en solubilidad. La mayoría de las veces se deben usar varios métodos diferentes de modo secuencial para purificar completamente una proteína; a medida que se completa cada paso de purificación, el tamaño de la muestra generalmente es menor, lo que hace posible utilizar procedimientos cromatográficos más sofisticados (y caros) en etapas posteriores (Nelson & Cox, 2005).

La electroforesis es un método muy preciso para determinar proteínas presentes en una mezcla, en base a diferencias de cargas eléctricas y tamaños, los cuales afectan a su movilidad en un determinado campo eléctrico; este método afecta la estructura y por tanto la función de las proteínas; la ventaja es que las proteínas además de separarse pueden visualizarse, lo que permite estimar la cantidad de éstas en una mezcla o el grado de pureza de la preparación proteica; asimismo el punto isoeléctrico y su masa molecular aproximada (Maldonado & Jorrín, 2011; Nelson & Cox, 2005; Urbano, Barretto, & Vares, 1996).

Dentro de las variantes de esta técnica, existe la electroforesis en gel de poliacrilamida (se genera mediante la polimerización por la concentración relativa de acrilamida y de bis-acrilamida, a más porcentaje de concentración, menor tamaño de poro), quien actúa a modo de tamiz molecular, retrasando el desplazamiento de las proteínas de acuerdo a cociente carga/masa y forma; para poder estimar la pureza y la masa molecular se usa el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), que se une a la proteína (alrededor de una molécula por cada dos residuos aminoácidos) y da lugar a una linearización y a una uniformidad de la carga negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante y así confiere un cociente carga/masa y forma similar a todas. Los geles de poliacrilamida poseen ventajas como: ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, fuerza iónica y son fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida. Geles con un porcentaje alto de acrilamida (10-15% gel separador) son óptimos para la separación de proteínas de pequeño tamaño (menores de 50 kDa, (Kilodaltones), mientras que geles de porcentajes menores (<10% gel separador) son los indicados para la separación de proteínas mayores. En base a los tampones empleados es el tipo de sistema, siendo continuo cuando existe un único gel separador que emplea el mismo tampón de igual pH, llamado de Weber & Osborn (1969); o sistema discontinuo que ocupa geles preparados con diferente pH, denominado de Laemmli, (Laemmli, 1970).

La combinación secuencial del enfoque isoelectrico (punto isoelectrico) y la electroforesis en gel con SDS es nombrado electroforesis bidimensional, puesto que aporta la resolución de mezclas complejas de proteínas (Maldonado & Jorrín, 2011; Nelson & Cox, 2005; Urbano, Barretto, & Vares, 1996; Schagger & Von Jagow, 1987; Advansta Corporation, 2011).

Las proteínas pueden ser visualizadas en el gel mediante diversos métodos de tinción: fluorescencia, plata y Azul de Coomassie, siendo éste último el más utilizado; para determinar el peso molecular de proteínas se compara el Rf (movilidad electroforética relativa de cada proteína) de la proteína problema con el de proteínas de referencia cuyo peso molecular se conoce (Maldonado & Jorrín, 2011), con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

La separación de proteínas por electroforesis se puede relacionar con la calidad de la malta mediante sus patrones electroforéticos, permitiendo profundizar en el contenido y tipo de proteína (Urbano, Barretto, & Vares, 1996). El número y distribución de las bandas de electroforesis son características para cada variedad y por lo tanto pueden ser usadas para la identificación de variedades (López, 2011). En la cebada, la hordeína (bajo peso molecular), la principal proteína de reserva del grano, ha sido intensamente estudiada a través de esta técnica, permitiendo el análisis de los diferentes tipos de hordeínas (A, B, C y D); como resultado de los análisis se evidenció una posible asociación entre las hordeínas D en cebada y la calidad maltera (cuando la concentración de la proteína total es superior al 9.5%) (Urbano, Barretto, & Vares, 1996); las fracciones de la hordeína C para diferentes cultivares de cebada revelaron un número variable de bandas mayores con peso molecular entre 54 y 60 kDa; se comparó en un patrón electroforético las gliadinas del trigo con las hordeínas de la cebada y cada variedad expuso diferente bandeo a pesar de ser la misma fracción de proteína de reserva, prolaminas, estableciendo así diferencias entre cereales (López, 2011).

Existen laboratorios especializados en la identificación de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) en el sector exportador y semillero como el Laboratorio de Genética Molecular en Rosario, Argentina, con pruebas específicas en la identificación de variedades de trigo y cebada mediante electroforesis; la técnica consiste en la extracción de proteínas de reserva de las semillas, y la posterior separación de éstas mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, pudiéndose determinar la identidad de la muestra comparada con uno o más patrones específicos (Figueredo, 2008).

Actualmente en México investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) trabajan en el primer estudio proteómico y han identificado cinco variedades mexicanas de cebada con 42 proteínas diferenciales (algunas con actividad enzimática y otras de almacenaje o de señalización) y se han enfocado en 10 de ellas, fundamentalmente para mejorar las semillas, conocer las características moleculares y bioquímicas del cereal a fin de mantenerlo y mejorarlo, debido a que el interés de la industria cervecera es identificar la presencia tanto de proteínas, que interfieren en el proceso para producir cerveza, como de enzimas que favorecen la fermentación por la levadura (Olivares, 2014).

3.6.6 Actividad proteolítica

A fin de purificar una proteína, es esencial disponer de un método para detectar y cuantificar dicha presencia. En el caso de proteínas enzimáticas, se puede determinar la cantidad de enzima en una solución o extracto de tejido en función del efecto catalítico (pueden transformar hasta 600 000 moléculas de sustrato por segundo, como la anhidrasa carbónica), es decir, el incremento de la velocidad a la cual su sustrato se convierte en productos de la reacción cuando está presente la enzima. Si se descompone una enzima en sus aminoácidos constituyentes, se destruye su actividad catalítica (Nelson & Cox, 2005).

Las enzimas se estudian normalmente a su pH óptimo y a una temperatura conveniente dentro del intervalo de 25 a 38°C. También se requieren elevadas concentraciones de sustrato, de modo que la velocidad inicial de reacción sea proporcional a la concentración de enzima (Nelson & Cox, 2005).

Las enzimas se clasifican de acuerdo con el sustrato específico sobre el cual actúan, en las reacciones que catalizan las enzimas e incluso muchas se designan con nombres triviales de origen histórico; de acuerdo a la reacción implicada se dividen en: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas; dentro de las hidrolasas, comprende la división en esterasas, carbohidrasas y proteasas; las enzimas proteasas son reguladoras claves de la homeostasis, crecimiento y desarrollo de las plantas, además fundamentales para generar y catabolizar péptidos bioactivos como hormonas; las proteasas se clasifican según las características de su sitio activo, a su vez pueden ser agrupadas en familias según su especificidad al sustrato; por ejemplo, la enzima digestiva tripsina cataliza la hidrólisis de solo aquellos enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo esta proporcionado por un residuo de lisina (Lys) o arginina (Arg); un polipéptido de cinco residuos de Lys y/o Arg dará lugar normalmente a seis péptidos más pequeños al ser cortado por la tripsina (Alquicira, 2003; Nelson & Cox, 2005).

El término “actividad” se refiere a las unidades totales de enzima en una solución; la actividad específica (medida de pureza enzimática) en el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína (Nelson & Cox, 2005). La actividad enzimática se manifiesta por la aparición de raicillas en un extremo y el avance por debajo de la cáscara del cotiledón (López, 2011).

Estudios sobre la actividad enzimática de una muestra obtenida de una dilución de látex de hojas de higuera liofilizadas se determinaron utilizando BAPNA (N- α -benzoyl-bL-Arginina4-nitroanilida-hidrocloruro) como sustrato, con una interacción directa entre el BAPNA y fenilalanina; la hidrólisis generó p-nitroanilina, de color amarillo, que se midió espectrofotométricamente su progreso en la reacción con la medida de la velocidad de formación de ese producto, gracias al aumento de absorbancia de la disolución en función del tiempo (la longitud de onda de máxima absorción de p-nitroanilina es 400 nm); los resultados indicaron que las muestras liofilizadas mantienen intacta la actividad enzimática, mientras que las muestras sin liofilizar guardadas en el congelador durante 5 meses mostraron desnaturalización de la proteína y pérdida de la actividad enzimática (Bertoluzzo, Bertoluzzo, & Rigatuso, 2008).

Dentro de la actividad enzimática, existen métodos propuestos que determinan específicamente la actividad proteolítica mediante cambios, físicos y químicos, que los extractos enzimáticos producen en una proteína patrón; Pett (1935) separando por disección distintas partes del grano de trigo, localizó actividad proteolítica en el escutelo y en el embrión, sin detectar actividad alguna en la cubierta y en el endospermo y Mounfield (1936) comprobó que la actividad proteolítica de la semilla de este cereal germinado era unas diez veces superior que sin germinar (García, 2011).

3.7 Calidad de la semilla de cebada

Hablando de calidad, podemos precisar que es el grado de aptitud de un producto para un uso determinado y se halla fijada por los requerimientos específicos de aquellos que desean moler, procesar o comer un grano determinado, más que por las propiedades inherentes a dicho grano. En general, un producto posee más calidad cuando es superior basándose en uno o varios atributos que son valorados objetiva o subjetivamente, ya que depende del criterio especificado en relación al mercado y la industria que utilice dichos granos (como conservación de recursos genéticos, producción en vivero, siembra directa en tierra arable, o en bosque, o bien para producir alimentos (Bustamante, 2010); de igual forma la calidad es un concepto dinámico, ya que se modifica en el tiempo con los distintos usos y necesidades de cada región o país, que puede cambiar de acuerdo a nuevos conocimientos o criterios de evaluación (Garnero, 2006).

3.7.1 Atributos de calidad de semilla de cebada

Para comenzar, se debe conocer el concepto de una semilla, quien procede de un óvulo fecundado dentro de un ovario maduro, que se convierte en un embrión (formado por un eje embrionario y un cotiledón, en caso de cebada), de igual forma consta de una provisión de reservas nutritivas, que pueden almacenarse en un tejido especializado (albumen o endospermo) o en el propio embrión, y cuenta con una cubierta protectora (cariópside en semilla), además es uno de los elementos más eficaces de dispersión de la especie, tanto en el tiempo como en el espacio (Pérez, 2006).

Según la ley sobre Producción, Certificación y Comercio de Semillas, en el capítulo I, Artículo 3, sección XIX a XXV establece las categorías de semilla para siembra, entre las cuales están: la semilla categoría habilitada es aquella cuyo proceso de propagación o producción no ha sido verificado o habiéndolo sido, no cumple totalmente con algunas de las características de calidad genética, física, fisiológica o

fitosanitaria; la semilla original es la fuente inicial para la producción de semillas de las categorías, resultado del proceso de mejoramiento o selección de variedades vegetales; la semilla categoría registrada conserva un alto grado de identidad genética y pureza varietal, procede de semilla original; la semilla categoría certificada es la que conserva un grado adecuado y satisfactorio de identidad genética y pureza varietal, proviene de una semilla original, básica o registrada (SAGARPA, 2007). La certificación consiste en verificar e inspeccionar las semillas para siembra, desde su origen, durante su proceso de producción en campo, beneficio y acondicionamiento, hasta su almacenamiento y comercialización, conforme estrictas normas de calidad establecidas (SNICS, 2013).

La diferencia entre grano y semilla es que la primera puede o no germinar, mientras que la última debe germinar (FAO, 2011). Se utiliza el término de grano cuando se destinan para la alimentación humana y animal, o como materia prima para la industria; mientras que el término de semilla se utiliza para indicar su uso en la siembra, reproducción y multiplicación de la especie o variedad. Si una semilla pierde o reduce su capacidad para generar una nueva planta, debe ser utilizada sólo como grano, siempre y cuando no esté tratada con productos que puedan afectar la salud humana o animal y que no se le hayan desarrollado compuestos tóxicos o alterado sus cualidades alimenticias (Hernández & Carballo, 2007).

Sabiendo lo anterior, podemos decir que la calidad de la semilla es un concepto agronómico múltiple que engloba a un conjunto de atributos físicos, fisiológicos, genéticos y sanitarios (Castañeda *et al.*, 2009), los cuales son regidos o estandarizados por diferentes normas y organismos (gubernamentales o no), entendiéndose por norma como “un documento establecido por consenso y aprobado por un organismo reconocido, que establece para usos comunes y repetidos, reglas, criterios o características para actividades o sus resultados, que procura la obtención de un nivel óptimo de ordenamiento en un contexto determinado” (Gally, 2008).

En el caso de la cebada maltera, la norma mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003, denominada “Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – Cereal – Cebada Maltera - (*Hordeum Vulgare* L. y *Hordeum Distichum* L.) Especificaciones y métodos de prueba”, establece las condiciones y características del grano de cebada maltera género *H.* especies *vulgare* L. y *distichum* L. para poder ser objeto de comercialización en territorio nacional, por ejemplo, poseer un porcentaje de humedad entre 11.5 y 13.5%, contenido máximo de impurezas de 2%, una germinación mínima de 85%, peso hectolítrico mínimo de 56 kg/hl para cebada de 6 hileras y 58 kg/hl para cebada de 2 hileras (Secretaría de Economía, 2003).

La Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (Normas ISTA-International Seed Testing Association) es uno de los organismos no gubernamentales que tiene como finalidad elaborar y editar normas relacionadas con el área temática de sanidad vegetal en semillas, permite realizar análisis de germinación, pureza, viabilidad, entre otros, donde se especifica metodología, insumos recomendados y equipamientos para cada una de las diferentes especies vegetales (Gally, 2008). Por otra parte, el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) es un órgano desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), encargado de vigilar el cumplimiento de las disposiciones legales en materia de semillas y variedades vegetales, verificar y certificar el origen y la calidad de las semillas, proteger legalmente los derechos de quien obtiene nuevas variedades de plantas, a través de un derecho de obtentor y coordinar acciones en materia de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SNICS, 2013).

Otra de las compañías dedicada a promover y mejorar la productividad del cultivo de cebada maltera en México (además a la venta de semillas de cebada maltera, fungicidas, herbicidas, fertilizantes, etc.) es Impulsora Agrícola (IASA), al mismo tiempo, bajo contrato, estimula la tecnificación de este cultivo (Aguilar & Schwentesius, 2004).

De igual forma, IASA celebró un convenio de coordinación con el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) para adoptar el modelo de trabajo del programa Modernización Sustentable de la Agricultura Tradicional (MasAgro) que coordina SAGARPA, donde este programa se basa en la investigación, desarrollo y transferencia de conocimientos y tecnologías que buscan incrementar la producción nacional de maíz y de cereales de grano pequeño, como el trigo y la cebada, en forma sustentable (semillas mejoradas, maquinaria y crédito), que beneficiará principalmente a cerca de 50 mil productores de cebada en Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Estado de México, Querétaro y Zacatecas (SAGARPA, 2012). De igual forma IASA apoya en la mejora de la calidad de la semilla junto al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (instituto que genera, adapta y transfiere conocimientos y productos científico-tecnológicos a través de la investigación, para contribuir al desarrollo sustentable de las cadenas productivas forestales (INIFAP^b, 2013) de acuerdo a las normas de producción y los lineamientos del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (Aguilar & Schwentesius, 2004).

3.7.2 Calidad física

La calidad física representa a la apariencia, pureza y condición de la semilla. Consiste en determinar el contenido de humedad, pureza física, peso hectolítrico, peso de mil semillas, tamaño de la semilla, color, olor (Bustamante, 2010) e incluso gusto (Bauzá, 2005).

Contenido de humedad: es el agua que contiene el grano de cebada maltera, expresada en porcentaje, en cebada el parámetro es entre 11.5 % y 13.5 % (Secretaría de Economía, 2003); un exceso es desfavorable para la germinación ya que dificulta la llegada de oxígeno al embrión (Pérez, 2006) y propicia un desarrollo de insectos y microorganismos como hongos que puedan ocasionar pérdidas de vigor y viabilidad (Moreno², 1996); es importante conocer la humedad del grano en el momento de la comercialización, ya que, si se entrega grano con humedad por encima del estándar se efectúan descuentos y, en caso contrario, se estarían perdiendo kilos de grano representados en agua (Bartosik, Cardoso, & Piñeiro, 2011); existen diversas formas de medir la humedad, se pueden clasificar en directos e indirectos: los métodos directos se basan en medir, de manera directa, la cantidad de agua que tiene el producto (método de estufa, el de destilación y método Karl Fischer), mientras que los métodos indirectos se basan en la medición de alguna propiedad del grano o semilla que es afectada por el contenido de humedad, a partir de la cual se predice el porcentaje de humedad de la muestra (las mediciones de capacitancia o transmitancia y los de resistencia, es decir, con las propiedades dieléctricas de los granos y semillas) (Bartosik, Cardoso, & Piñeiro, 2011).

Pureza física: libre de todo material ajeno al grano de cebada (polvo o suciedad, piedras pequeñas o terrones, fragmentos metálicos, pedazos de bolsa de embalaje, desechos de plantas) en porcentaje (Bustamante, 2010); en cebada las impurezas deben ser con un máximo de 2%, mezcla de otras variedades máximo 10%, grano dañado máximo 10% y granos desnudos y/o quebrados 5%; se utiliza un homogeneizador divisor o cribas de orificios oblongos (Secretaría de Economía, 2003).

Peso hectolítrico: el peso volumétrico es la relación entre el peso y el volumen total de la masa del producto, incluyendo los espacios intersticiales que dejan los granos entre sí en kilogramos por hectolitro (Bustamante, 2010), en cebada el peso hectolítrico mínimo en cebada de seis hileras es de 56 kg/hl y de dos hileras es de 58 kg/hl; un peso elevado indica una mayor proporción de "materias extractivas", que es lo que busca el cervecero, ya que implica un mayor contenido en almidón (Bauzá, 2005). Ponce (2005), en su trabajo, menciona que el peso hectolítrico es directamente proporcional al largo del período de fructificación, por el mayor aporte de almidón que recibe el grano. Para cuantificar el peso se utilizan determinadores tipo Boerner o balanza de peso volumétrico Ohaus provista de una tolva cónica con una válvula de salida (Moreno², 1996), o si es poca muestra se usa un embudo especial con válvula o compuerta y una probeta graduada (Secretaría de Economía, 2003).

Peso de mil semillas: es el peso de 1 000 semillas pura, en promedio el peso de la cebada es de 44 - 45 g (Castañeda *et al.*, 2009; Goñi *et al.*, 2008; Goñi *et al.*, 2009). Esta positivamente relacionado con la calidad del lote, depende del contenido de humedad de la semilla y el tamaño (Bustamante, 2010), de la cantidad de asimilados disponibles para ser transportados hacia la espiga durante su formación y de la translocación de las reservas existentes en la planta hacia el tallo (Moralejo, 1993). Moreno¹ (1996), describe que la técnica consiste en tomar un peso promedio de 8 repeticiones de 100 semillas puras por tratamiento con un contador de semillas o manualmente, posteriormente se calcula una varianza, desviación estándar típica y el coeficiente de variación.

Tamaño de la semilla: es el grano de cebada maltera que es retenido en una criba de orificios oblongos de dimensiones de 2.18 mm x 19 mm (5.5/64 in x 3/4 in), se necesita un mínimo de 85% de granos de tamaño para uso maltero (Secretaría de Economía, 2003). Moreno¹ (1996), menciona que el tamaño dependerá de las condiciones ambientales que la rodea y de la adaptación a dichas condiciones, mayores nutrientes de reserva que utiliza la plántula para establecerse mayores tamaños de semilla; cuando la planta progenitora dispone de recursos limitados, sacrifica el número de semillas producidas y no el tamaño. El tamaño pequeño de grano generalmente tiene niveles más bajos de almidón y niveles más altos de proteínas, reduciéndose así la cantidad de energía que pudiera producir y ser utilizada posteriormente; algunos estudios han demostrado que semillas grandes dan origen a plantas de alta supervivencia, rápido crecimiento y establecimiento (Castillo Z. C., 2012).

Color y olor: El color de los granos de cebada maltera debe ser amarillo claro y uniforme (Bauzá, 2005); si se comercializa o se pone en circulación una semilla o material de propagación que careciendo del plaguicida necesario, se le haya agregado colorante, con lo que induzca o pueda inducirse a error, confusión o una falsa apreciación de sus características será causa de infracción y sanciones (SAGARPA, 2007). En cuanto al olor de la cebada, debe ser semejante al de la paja fresca, más notable cuando se remueve, cuando se percibe un olor a humedad es porque ha sido cosechada o conservada húmeda (Bauzá, 2005); son olores objetables los característicos a putrefacción, rancio, alcohol, pescado y productos químicos, entre otros (Secretaría de Economía, 2003).

Gusto: Cuando se mastica el grano de cebada debe hallársele gusto dulce meloso, débilmente azucarado y en ningún caso debe tenerse una sensación de acidez o de moho (Bauzá, 2005).

3.7.3 Calidad fisiológica

Se considera que las semillas con buena calidad fisiológica son aquellas que tienen alto porcentaje de germinación y vigor, con lo que mejora su vida de almacenamiento, mantiene un mínimo desperdicio de semilla y germina en plantas uniformes en viveros y semilleros (Bustamante, 2010). La calidad fisiológica está determinada por la viabilidad, germinación y vigor de las semillas (Castañeda *et al.*, 2009). Las semillas obtenidas de diferentes estaciones de crecimiento o diferentes áreas geográficas, a menudo varían en su viabilidad y capacidad de germinación; estas variaciones pueden deberse a las condiciones ambientales prevaletes durante la formación, desarrollo y maduración de la semilla (Franca *et al.*, 1993; Bishaw, Niane, & Gan, 2007), constitución genética (Pasin, Santos, & Santos, 1991), tamaño (Gan, Stobbe, & Moes, 1992) forma, cubierta, firmeza, condiciones de secado y almacenamiento de la semilla (Bass, 1980; Castañeda *et al.*, 2009). La longevidad de las semillas depende de la especie y de las condiciones de conservación, en este caso, la longevidad almacenada promedio de la cebada es de aproximadamente 7 años (Moreno¹, 1996; Pérez, 2006).

La viabilidad de un lote de semillas, hace referencia a su capacidad de germinar y de originar plántulas normales en condiciones ambientales favorables, para evaluar y cuantificar la viabilidad se pueden realizar diferentes tipos de test, entre los que destacan: germinación estándar, test del tetrazolio y radiografía con rayos X (Pérez & Pita, 2000).

En lo que se refiere al vigor, la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA) lo definió como “la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel potencial de actividad y el comportamiento de las semillas durante la germinación y la emergencia de las plántulas” (Moreno², 1996).

Los ensayos que se utilizan para evaluar el vigor de las semillas consideran el número y las características de las plántulas obtenidas, como son su apariencia, malformaciones y velocidad de crecimiento; los ensayos más utilizados son: ensayos de crecimiento y evaluación de plántulas (longitud de plúmula), prueba en frío (*cold test*), conductividad eléctrica y envejecimiento acelerado (Pérez & Pita, 2000).

Germinación estándar: determina la cantidad de granos de cebada maltera con la aptitud para iniciar el desarrollo de su embrión (Secretaría de Economía, 2003) que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables de humedad, luz y temperatura (Pérez & Pita, 2000); en cebada la germinación mínima es de 85 % (Secretaría de Economía, 2003). Moreno² (1996), menciona que la humedad relativa de la cámara de germinación deberá ser de 90 a 95%, lo más cercano a la saturación, por lo que todas las muestras durante la prueba que realizó su equipo, se conservaron en humedad constante. La velocidad de germinación disminuye si se incrementa el contenido de humedad, temperatura y periodo de almacenamiento (este método es seguro para saber la calidad de la semilla al paso del tiempo) (Castillo, 2012); se considera la prueba universal de calidad de semilla, aunque dado que se lleva a cabo en condiciones ideales, no necesariamente refleja el potencial de rendimiento de ese lote en campo (Bustamante, 2010); se denomina "energía o fuerza germinativa" al porcentaje de granos que germinan dentro de los 3 días, contando con condiciones propicias de humedad y temperatura y el "poder germinativo" es el mismo proceso de que se verifica en 6 o 7 días (Bauzá, 2005); la emergencia de la radícula (raíz) y plúmula (tallo) es el criterio que se suele utilizar para comprobar si una semilla ha germinado (Pérez & Pita, 2000). Moreno¹ y Moreno² (1996) señalan la clasificación del resultado de la prueba en plántulas normales, anormales y semillas sin germinar (duras, latentes y muertas), las cuales expresarán en porcentaje las semillas que se convertirían en plantas fuertes (plántulas normales).

Test del tetrazolio: es un ensayo para conocer la viabilidad de semillas que presentan dormición, o con una velocidad de germinación muy baja; se basa en que una vez que los diferentes tejidos de la semilla se han hidratado, en el embrión se activan rutas metabólicas, en las que muchas de las reacciones químicas empleadas son reacciones de oxidación pudiéndose estimar el grado de actividad metabólica. Las sales de tetrazolio (cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) son incoloras, pero cuando se reducen se transforman en trifenilformazán, una sustancia estable, no difusible y de un color rojo intenso. Al colocar una semilla viable con solución de tetrazolio, los electrones liberados, en los tejidos del embrión, reducirán a las sales de tetrazolio, con lo que éstos adquirirán un color rojo intenso; si la semilla no es viable, el embrión no cambiara de color y si se colorean parcialmente, indica existencia de áreas de tejidos muertos, debido al deterioro de la semilla. La posición y el tamaño de las áreas necróticas, y no necesariamente la intensidad del color, es el índice que se utiliza para clasificar a las semillas como viables o no viables mediante la comparación con los patrones de referencia establecidos por los organismos oficiales para el control de calidad de semillas (Pérez & Pita, 2000).

Radiografía con rayos X: es un ensayo rápido y no destructivo que se suele emplear para evaluar la viabilidad de semillas de especies forestales, sin embargo, es necesario un equipamiento costoso para su realización. En las radiografías se pueden diferenciar entre semillas sin embriones (semillas vanas), de las que tienen un embrión bien formado; así como distinguir si en el embrión existen malformaciones o algún tipo de daños: mecánicos, por insectos, etc. (Pérez & Pita, 2000).

Ensayos de crecimiento y evaluación de plántulas (longitud de plúmula): se mide la longitud de diversas partes de la plántula al cabo de un determinado periodo. La metodología más ocupada es descrita por Perry (1977) con un procedimiento desarrollado “entre papel”; la prueba generalmente dura siete días, sin embargo, el periodo puede ajustarse, de tal manera que las plántulas vigorosas midan aproximadamente 10 cm (Moreno², 1996).

En la evaluación del crecimiento de plántulas no es posible comparar el desarrollo de plúmulas entre lotes por medio de pruebas llevadas a cabo en tiempos diferentes, debido a que ligeras diferencias en la duración de la prueba y las condiciones ambientales ocasionan variaciones en el desarrollo de las plántulas. Sin embargo, es posible compararlos si en cada prueba se tiene incluido como referencia a un lote de alto vigor, de tal manera que el desarrollo del testigo pueda ajustarse y los otros lotes se ajustan en la misma proporción. Los pesticidas pueden afectar la germinación y desarrollo de las plántulas en el papel, así que esta prueba se deberá realizar antes de tratar químicamente a las semillas (López, 1995). Son especialmente apropiados en especies cuyas plántulas tienen un vástago recto y estrecho, trigo (*Triticum* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), maíz (*Zea mays*), o que presentan raíces simples, lechuga (*Lactuca sativa*) (Pérez & Pita, 2000).

Prueba en frío (*cold test*): se evalúa el vigor, indirectamente, a través del efecto que tiene el tratamiento de los granos con bajas temperaturas, sobre el posterior crecimiento y desarrollo de las plántulas, se mantienen la semilla durante 7 días en oscuridad a 10 °C y un 95% de humedad relativa, incubándose, a continuación, de cinco a seis días con iluminación a 25 °C en suelo contaminado con patógenos de la semilla y de las plántulas de la variedad (es más usado en maíz) (Moreno², 1996), se evalúan las plántulas cuando hayan desarrollado dos o tres hojas y la raíz mide unos 20 cm (Pérez & Pita, 2000).

Conductividad eléctrica: el ensayo se basa en que el deterioro de las semillas y su pérdida de vigor está asociado a alteraciones de las membranas celulares, que implican un incremento de la salida de compuestos solubles (lixiviados) desde las semillas; consiste en sumergir las semillas durante 24 horas en agua desionizada a 20-25 °C, se decanta y se mide su conductividad eléctrica; una mayor conductividad indica una mayor presencia de iones (lixiviados), lo que se puede correlacionar con una menor emergencia de plántulas (Pérez & Pita, 2000).

La prueba de conductividad eléctrica tiene una alta correlación con la emergencia en campo, por lo tanto, en términos generales se puede decir que esta correlación es mejor que entre germinación en el laboratorio y emergencia en el campo, puesto que predice el potencial de emergencia de un lote, sobre todo en siembras tempranas (condiciones de frío) que son desfavorables para el buen establecimiento de las plántulas (Pérez & Pita, 2000).

Envejecimiento acelerado: se somete a condiciones en las que se produce un deterioro muy rápido: temperaturas elevadas (40-45 °C) durante periodos variables según la especie (48 a 72 horas) y alta humedad ambiental; tras el tratamiento, se evalúa la capacidad germinativa de las semillas, considerando más vigorosos aquellos lotes que son capaces de producir un mayor número de plántulas normales (Pérez & Pita, 2000). Aníbal (2011) usó semilla de cebada en tratamientos pre-germinados de hasta 14 horas de reposo, posteriormente almacenó las muestras en cámaras climáticas a una temperatura de 40°C y 80% humedad relativa por hasta 25 días y midió la viabilidad, los resultados indicaron que a un mayor tiempo de reposo de granos humedecidos significó un mayor nivel de daño por pre-germinado en su viabilidad, notándose una caída significativa de viabilidad a partir de los 12 días de almacenamiento con envejecimiento acelerado.

3.7.4 Calidad genética

La Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas define la calidad genética como la medida de la identidad genética de la semilla y se expresa como el porcentaje de semillas viables que equiparan con respecto a caracteres pertinentes de la variedad vegetal (SAGARPA, 2007). La calidad genética está inherente a la variedad (mejorada o tradicional), ya que durante el proceso de mejoramiento genético y selección de genotipos superiores, el fitomejorador evalúa características que puedan proporcionar buen rendimiento (como número de espigas/m², de granos/espiga y peso de mil granos), mejor calidad del grano y mayor tolerancia a estrés biótico y abiótico (Castañeda *et al.*, 2009; Castillo, 2012).

En el caso de la producción de cerveza se ha incorporado a las levaduras genes procedentes de *Trichoderma reesei* o de *Trichoderma longibrachiatum* que expresan una enzima β -glucanasa que resuelve la colmatación (índice que marca la efectividad de la filtrabilidad); también se han obtenido cepas de levadura de cerveza que portan un gen de *Saccharomyces diastaticus* que expresa una glucoamilasa, la cual se caracteriza por degradar las dextrinas y el almidón, responsables de la gran carga energética de la cerveza (especialmente de algunos tipos) obteniéndose de esta manera un tipo de cerveza baja en calorías (Rodríguez *et al.*, 2003).

Sabiendo que el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el portador de la información genética y que un gen (secuencia de ADN que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios) se puede aislar, copiar, amplificar e insertar dentro del ADN de otro ser vivo, fue posible la incorporación de este sistema de transferencia directa de ADN en plantas monocotiledóneas, incluyendo todo tipo de cereales (arroz, trigo, maíz, centeno, cebada, etc.), por ejemplo en los Estados Unidos, Canadá y Japón, desde 1993 ha producido continua y progresivamente marcas de cereales modificados genéticamente, siempre buscando caracteres específicos como son la resistencia a virus, bacterias, hongos, insectos, herbicidas, etc. O dándoles un valor añadido, como la inducción a una planta a producir (expresar) una determinada proteína antigénica, cuyo origen está en el agente patógeno, capaz de inducir la respuesta protectora buscada cuando el alimento (la planta, o su fruto o su semilla) es ingerido por el hombre o los animales, como ejemplo, en los Estados Unidos, se ha registrado una patente sobre un maíz transgénico, que produce una proteína que actúa como anticuerpo frente al virus del herpes humano (Rodríguez *et al.*, 2003)

Existe en México un Catálogo Nacional de Variedades Vegetales, documento que enlista las variedades vegetales cuyos caracteres pertinentes han sido descritos conforme a las Guías de cada especie para garantizar su identidad genética y distinción (SAGARPA, 2007).

El SNICS establece, conjuntamente con otras dependencias e instituciones vinculadas, políticas, acciones y acuerdos internacionales sobre conservación, acceso, uso y manejo integral de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (SNICS, 2013); técnicas como variación somaclonal inducida por cultivo *in vitro* (fenómeno natural que ocurre en los procedimientos de cultivo de tejidos, se utiliza para generar mutantes con características prediseñadas, a través del uso de un agente de selección artificial), mutagénesis química (cambio del material genético no por transmisión sucesiva a células hijas, sino de manera inducida químicamente) e irradiación gamma (capaz de aniquilar un par positrón-electrón y de causar grave daño al núcleo de las células) tienen el potencial para asistir el mejoramiento de cultivares de cebada, que se complementan con las técnicas de mejoramiento genético tradicionales para aumentar la eficiencia y la precisión en la transferencia de características (Aguado, 2008; Patiño, 2010); sin embargo, en el caso de que se sospeche de alguna modificación genética, existen métodos de detección de alimentos transgénicos, por un lado, se dispone de procedimientos que detectan las nuevas proteínas expresadas por el/los transgenes introducidos (técnica ELISA o la banda de flujo lateral) y, por otro, existen métodos que identifican el ADN correspondiente al gen o genes introducidos (reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa o *Southern Blot*) (Rodríguez *et al.*, 2003).

Prueba de ELISA: es un tipo de enzimo-inmuno-análisis en el que un anticuerpo conocido capta a la proteína transgénica y se pega (se adhiere) a la microplaca en la que se lleva a cabo el análisis, esto es apoyado por un nuevo anticuerpo (secundario) que se une específicamente al primero con una enzima fijada previamente, en seguida, con la adición del sustrato específico de la enzima se desarrolla color o fluorescencia, la cual es medida por un espectrofotómetro especial; puede hacerse cuantitativo si se compara el color obtenido con concentraciones conocidas de la misma proteína (Rodríguez *et al.*, 2003).

Banda de flujo lateral: es un procedimiento que se ejecuta sobre una lámina de vidrio rectangular alargada, en un extremo se fija el anticuerpo específico que reconoce la proteína transgénica (anticuerpo de captura), mientras que el anticuerpo secundario se dispone en el extremo opuesto con la muestra y se hace correr en la dirección al anticuerpo de captura, en caso positivo se forma una banda coloreada, como control de reacción se dispone una segunda banda de anticuerpo de captura (Rodríguez *et al.*, 2003).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): sirve para la detección directa del transgen. Se pueden utilizar primers (oligonucleótidos) para cualquiera de los elementos que forman parte de la secuencia, mediante un termociclador se consigue la amplificación de los fragmentos, que se separan en un gel de agarosa en razón de su tamaño y para identificar el fragmento de ADN buscado se realiza una tinción con un compuesto que fluoresce cuando se expone a la luz ultravioleta (Rodríguez *et al.*, 2003).

PCR cuantitativa: es una variante de la técnica anterior, permite identificar en tiempo real la amplificación de un genoma de interés; se basa en la utilización de una sonda de ADN, complementaria de una parte del ADN que se pretende amplificar, la cual va adherida a una molécula fluorescente y a otra inhibidora, si la sonda se desplaza de su sitio por acción de la ADN-polimerasa, la molécula fluorescente se libera y fluoresce al ser estimulada por un láser, la cuantificación de la fluorescencia en cada ciclo de la PCR es proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando y ofrece, por tanto, una medida indirecta de la misma (Rodríguez *et al.*, 2003).

Southern Blot: después de extraer el ADN total de la planta en la que se busca el transgén, se fragmenta con enzimas de restricción y se separa en un gel de electroforesis; se transfiere a una membrana de nailon (o semejante) y se hace uso de una secuencia complementaria previamente diseñada y marcada con un isótopo radiactivo, si detecta el compuesto radioactivo en la membrana, está presente el gen problema (Rodríguez *et al.*, 2003).

3.7.5 Calidad sanitaria

La calidad sanitaria es la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades: hongos, bacterias, virus y plagas de animales (gusanos e insectos), pero también pueden estar involucradas condiciones fisiológicas, tales como deficiencias de microelementos (Moreno², 1996). Cuando la semilla se utiliza en la siembra, los patógenos transmitidos por ésta pueden causar enfermedades o la muerte de las plantas, lo cual provoca pérdidas en los cultivos y la producción de alimentos. Cuando las semillas se utilizan como fuente de alimentos, los organismos transmitidos por la semilla pueden producir cambios químicos, deterioro importante en el contenido de la semilla, o liberación de micotoxinas, con efectos potenciales en los seres humanos y el ganado, lo cual provoca desperdicio de alimentos o hambruna (FAO, 2011).

En materia internacional, el CIMMYT es un centro a nivel mundial dedicado a la capacitación sobre los sistemas de producción, investigación y desarrollo de variedades de maíz y trigo; como apoyo el Laboratorio de Sanidad de Semilla reporta directamente al CIMMYT la viabilidad y seguridad de los envíos internacionales de semilla de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum spp.*, *T. aestivum*, *T. turgidum*, *Tricosecale*) y cebada (*Hordeum vulgare*) en materia de sanidad; en México la autoridad fitosanitaria es la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), quien se encarga del análisis por daño de plagas y los beneficios económicos del control fitosanitario; de convenios internacionales, legislación fitosanitaria y servicios de inspección; y de la divulgación de los estudios de plagas, recomendaciones, programas y campañas fitosanitarias de prevención. A través de DGSV se enmarcó el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF), para determinar la ocurrencia o ausencia de plagas en un área específica (Pérez, 2014).

El Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), desarrolla y establece estrategias de control biológico para plagas reglamentadas, para ello genera y proporciona tecnología alternativa al uso de plaguicidas químicos; en tanto el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Fitosanitaria (CONAPROF) elabora, aprueba y valida la publicación de Normas Oficiales Mexicanas o, en su caso, modificaciones, en diferentes materias relacionadas con los vegetales, como la sanidad vegetal, así como la promoción de su cumplimiento (CIMMYT, 2013; Pérez, 2014).

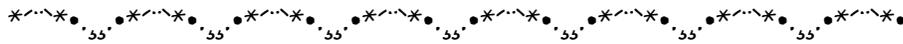
Dentro de las normas que regulan la sanidad de semillas esta la Norma Oficial Mexicana NOM-029-FITO-2002, denominada “Requisitos y especificaciones fitosanitarios aplicables a semillas para siembra, de importación”, en ella se establecen los requisitos fitosanitarios para las semillas botánicas para siembra de importación, con el fin de prevenir la introducción de plagas al territorio nacional; menciona que se debe contar con un Certificado Fitosanitario Internacional (o de Reexportación emitido por el Organismo Nacional de Protección Fitosanitaria) emitido por las autoridades de Agricultura del país de origen que señale el lugar de embarque y el país de origen, así como la declaración adicional de que el producto se encuentra libre o cumple con las tolerancias de las plagas indicadas en este ordenamiento junto con una inspección fitosanitaria en el lugar de ingreso al país; en cuestión de cebada, se verifica la introducción de esta semilla por parte de los Estados Unidos; en caso requerido se constatará en el Certificado Fitosanitario Internacional la aplicación del tratamiento a las semillas, que puede ser aplicado en el país de origen o de procedencia, o bien en el punto de ingreso al país, anotando el ingrediente activo del producto usado (Hernández, 2006).

Moreno² (1996) indica que existen diferentes métodos para verificar la sanidad de un cereal que varían en sensibilidad y reproductibilidad así como en el adiestramiento y equipo requerido; dependerá del patógeno o las condiciones que serán investigadas, la especie de la semilla y el propósito de la prueba; la muestra de trabajo se examina con o sin incubación, o en su caso, plantas en crecimiento.

La clasificación de los métodos de verificación de sanidad según (Moreno², 1996) se da de la siguiente manera:

- a) Examen sin incubación: no da indicación de la viabilidad del patógeno.
 - 1. Examen directo: con o sin microscopio estereoscópico para cornezuelos, agallas de nemátodos, insectos, ácaros, etc.
 - 2. Examen en semillas imbibidas: en agua u otros líquidos para aflorar los síntomas y ser visibles a microscopio estereoscópico.
 - 3. Examen por organismos removidos por lavado: en agua con un agente humectante o en alcohol y se agita para remover esporas, hifas, etc.
- b) Examen después de la incubación: puede ser superficial o interno, comúnmente:
 - 1. Papel filtro: las semillas se espacian durante la incubación para evitar la diseminación secundaria de los organismos; a veces se usa un microscopio estereoscópico.
 - 2. Arena: se siembran las semillas espaciadas en camas de arena y se incuban para la expresión de los síntomas.
 - 3. Placas de agar: se colocan semillas en agar esterilizado y se incuban, identificándose macroscópica o microscópicamente.
- c) Examen en plantas de crecimiento: el inóculo se usa en plántulas sanas o partes de plantas.
- d) Otras técnicas: como reacciones serológicas, formación de fago-placa, etc.

MATERIALES Y MÉTODOS



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Espacio de investigación

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Sanidad de Semillas y Biología Molecular, de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Roque, ubicado en el kilómetro 8 de la carretera Celaya-Juventino Rosas, Celaya, Guanajuato (Figura 9).



Figura 9. Fachada del Instituto Tecnológico de Roque

4.2 Material biológico a evaluar

Las variedades de cebada evaluadas (Cuadro 8) fueron Adabella, Alina, Armida, Esmeralda y Esperanza, líneas con ciclo Otoño-Invierno 2010-2011 bajo condiciones de riego; se conoce que fueron sembradas bajo el establecimiento de dos calendarios de riego (0-49-78 y 0-60-106 días después de siembra) con un arreglo a dos y tres hileras; la fertilización de todo el ciclo fue de 180-60-00 (N-P-K), en la siembra se agregó 90-60-00 y el resto al primer riego; se cosechó a los 120 días y la densidad de siembra fue de 120 kg/ha.

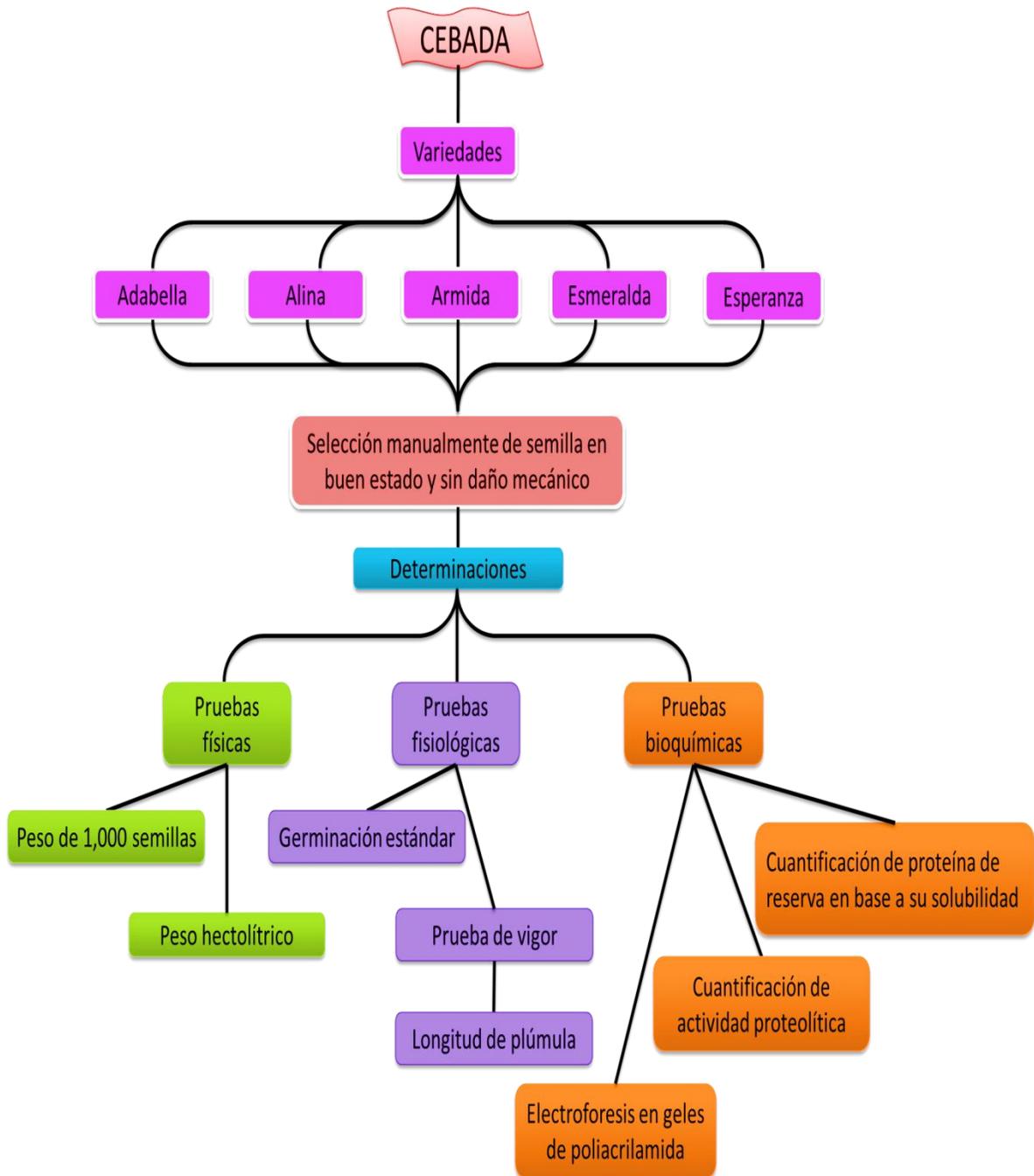
Cuadro 8. Genotipos evaluados y datos del cultivo.

Variedades de cebada (6 hileras)	Zona de adaptación	Días de madurez fisiológica	Rendimiento (ton/ha)	Proteína total (% materia seca)
Adabella	Valles Altos	101 a 107	3.080	15.2
Esmeralda	Valles Altos	96 a 102	2.902	15.2
Alina	El Bajío	95 a 105	6.271	12.7
Armida	El Bajío	95 a 105	6.373	13.0
Esperanza	El Bajío	100 a 110	6.162	13.5

Fuente: (Fernández, 2013)

El primer paso fue seleccionar manualmente la semilla, de inmediato se pasó a conservar a 4°C y se procedió a efectuar las pruebas físicas, fisiológicas y bioquímicas que se describen en el siguiente diagrama de flujo.

4.3 Diagrama de flujo de actividades en la investigación



4.4 Diseño experimental

En el Cuadro 9 se desglosa el diseño de los tratamientos del experimento. Se tomaron dos experimentos, uno por cada calendario de riego, siendo a 0-49-78 dds (CR1) y a 0-60-106 dds (CR2), cada calendario de riego estuvo formado por dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) y por las cinco variedades de cebada: Adabella, Alina, Armida, Esmeralda y Esperanza. Se consideraron cuatro repeticiones.

Cuadro 9. Diseño de tratamientos del experimento trifactorial de cinco variedades de cebada, dos calendarios de riego y dos arreglos de siembra.

Variedades	Tratamientos	Arreglo de siembra	Calendario de riego
Adabella	Tratamiento 1	3 hileras	CR1
Adabella	Tratamiento 2	2 hileras	CR1
Adabella	Tratamiento 3	3 hileras	CR2
Adabella	Tratamiento 4	2 hileras	CR2
Alina	Tratamiento 1	3 hileras	CR1
Alina	Tratamiento 2	2 hileras	CR1
Alina	Tratamiento 3	3 hileras	CR2
Alina	Tratamiento 4	2 hileras	CR2
Armida	Tratamiento 1	3 hileras	CR1
Armida	Tratamiento 2	2 hileras	CR1
Armida	Tratamiento 3	3 hileras	CR2
Armida	Tratamiento 4	2 hileras	CR2
Esmeralda	Tratamiento 1	3 hileras	CR1
Esmeralda	Tratamiento 2	2 hileras	CR1
Esmeralda	Tratamiento 3	3 hileras	CR2
Esmeralda	Tratamiento 4	2 hileras	CR2
Esperanza	Tratamiento 1	3 hileras	CR1
Esperanza	Tratamiento 2	2 hileras	CR1
Esperanza	Tratamiento 3	3 hileras	CR2
Esperanza	Tratamiento 4	2 hileras	CR2

4.5 Evaluación de la calidad física

La calidad física se evaluó por medio de las determinaciones de Peso de mil semillas y Peso hectolítrico, que se describen a continuación.

4.5.1 Peso de mil semillas

La prueba del peso de mil semillas se realizó mediante una modificación de las normas de la ISTA (2004). Se contaron de forma manual cuatro repeticiones de mil semillas para cada variedad de cebada por tratamiento (Cuadro 9), cada repetición se pesó en una balanza analítica Setra SI-410S y se tomó el promedio de cada peso.

4.5.2 Peso hectolítrico

Se utilizó el método descrito por la Secretaría de Economía (2003). Se tomó como base 30 ml en un recipiente graduado (tubo falcón de 50 ml) y se procedió a llenar el recipiente por cuatro repeticiones de cada variedad de cebada hasta la base tomada; se anotó el peso para cada tratamiento (Cuadro 9), usando una balanza analítica Setra SI-410S. Se obtuvo el promedio de los pesos de las repeticiones y se aplicó la siguiente fórmula para poder obtener el peso hectolítrico.

$$\text{Peso hectolítrico} \frac{\text{kg}}{\text{hl}} = \frac{\text{Peso}_{\text{muestra de cebada}}(\text{g})}{\text{volumen}_{\text{base}}(\text{ml})} * 100$$

4.6 Evaluación de la calidad fisiológica

La calidad fisiológica se evaluó mediante la prueba de Germinación estándar y una Prueba de vigor: longitud de plúmula.

4.6.1 Germinación estándar

La prueba se realizó de acuerdo a la norma de la ISTA (2004). El método desarrollado para la prueba fue “entre papel”. Se colocó en una charola germinadora una hoja de germinación esterilizada y humedecida con agua destilada.

Se colocaron 50 semillas de cebada en 5 filas de 10 semillas y se taparon con otra hoja de germinación esterilizada y previamente impregnada con agua destilada. Posteriormente se enrolló con un doblez en la parte inferior y varios dobleces a lo ancho de las hojas hasta formar un rollo o “taco”. Se elaboraron cuatro repeticiones de 50 semillas por cada tratamiento de cada variedad de cebada (Cuadro 9). A continuación los rollos o “tacos” se colocaron verticalmente en bolsas de plástico, que a su vez fueron introducidas en la cámara de germinación Conviron G30 a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de siete días (Figura 10).

Una vez terminado el proceso de germinación, el conteo se hizo a los cuatro y siete días (Moreno², 1996). Para su evaluación se cuantificaron las plántulas normales, anormales y semillas sin germinar o muertas, identificadas como tales conforme al manual de evaluación de plántulas de la ISTA (1993), considerando como:

- Plántulas normales: aquellas que obtuvieron las estructuras esenciales para originar plantas normales en condiciones favorables como hipocótilo y coleóptilo bien desarrollados, rectos y sin daño; varias raíces seminales (2 o 3), y plúmula intacta.
- Plántulas anormales: porción que tenga alguna ausencia de sus estructuras esenciales para germinar normalmente como fisuras, lesiones o poco desarrollado el coleóptilo, epicótilo o raíz, plúmulas retorcidas en espiral, fragmentada, pálida y sin vigor, o plántulas que no presentan desarrollo después de haber salidos de los cotiledones.

- Semilla sin germinar o muerta: fracción donde no se presentó emergencia de radícula y plúmula posterior al tiempo determinado.

Y se utilizó la ecuación siguiente:

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{Número de plántulas normales}}{\text{Número total de plántulas por lote}} * 100$$

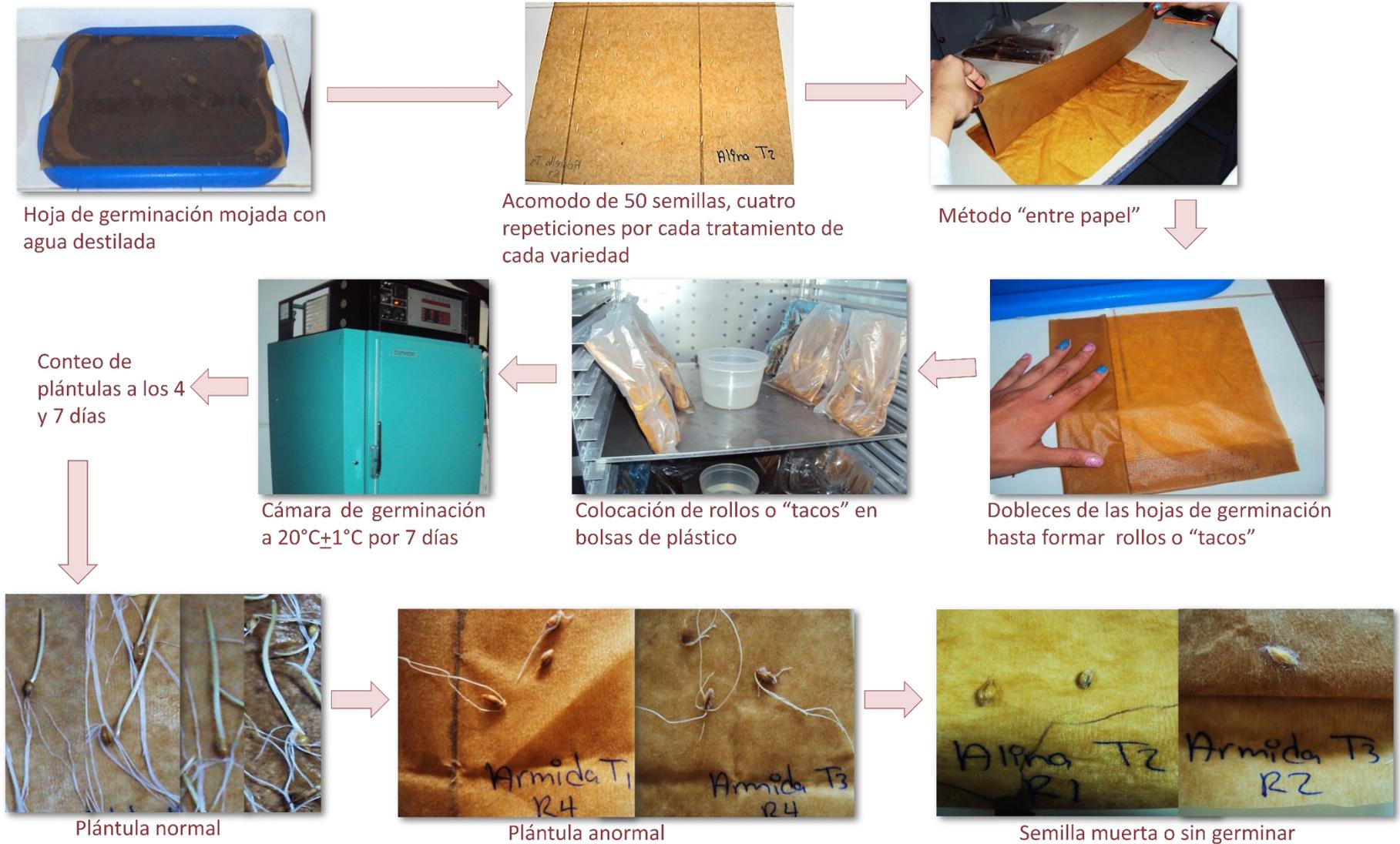


Figura 10. Esquema descriptivo de la prueba de germinación estándar

4.6.2 Prueba de vigor: Longitud de plúmula

Se siguió la metodología descrita por (Moreno², 1996). El procedimiento desarrollado fue “entre papel”. A la mitad de una hoja de papel de germinación, se marcó una línea. Igualmente se marcaron cinco líneas paralelas a la línea central con una distancia de 2 cm de línea a línea, las cuales se dibujaron en la parte superior de la hoja. Sobre la línea central se marcaron 25 puntos con 1 cm de distancia y se pegó una semilla en cada punto y se humedeció con agua destilada. Para pegar las semillas se usó cinta adhesiva. Los embriones de las semillas quedaron hacia el lado contrario al papel y con la plúmula apuntando hacia arriba, en ángulos rectos respecto a las líneas horizontales. Se cubrieron las semillas con otra hoja de germinación húmeda, se dobló hacia arriba una franja de 2 cm de la parte basal, para luego enrollar las hojas en sentido perpendicular a las líneas horizontales. No se dejó muy apretado el rollo o “muñeca” para permitir una buena aireación de las semillas, se conservó húmedo durante toda la prueba y se mantuvo verticalmente sin necesidad de sostén en bolsas de plástico. Se prepararon cuatro repeticiones con 25 semillas cada tratamiento por cada variedad (Cuadro 9). Los rollos o “muñecas” se colocaron en la cámara de germinación Conviron G30 a una temperatura de 20°C ± 1°C con alta humedad relativa por un periodo de cuatro días (Figura 11).

La elongación de la plúmula de cada semilla germinada se midió (en centímetro) pasados los cuatro días de la prueba, se consideró el epicótilo y en su caso primer folíolo, se contaron las plúmulas de plántulas normales (previa inspección de acuerdo a las normas de la (ISTA, 1993), donde cuya radícula y plúmula brotó normalmente). Para ello (Moreno², 1996) indica la fórmula para calcular el crecimiento fue la siguiente:

$$L = \frac{n(x_1) + n(x_2) + n(x_3) + \dots + n(x_n)}{\text{Número plántulas normales}}$$

en donde: L: longitud media de las plúmulas

n: número de plúmulas germinadas

x: la distancia en centímetros a los que creció la plúmula



Figura 11. Esquema para determinar el vigor en la semilla de cebada: crecimiento de plúmula

4.7 Métodos bioquímicos de evaluación

Los métodos que se utilizaron para el análisis de tipo bioquímico fueron la cuantificación de proteína de reserva en base a su solubilidad separando las correspondientes fracciones y la cuantificación de actividad proteolítica, además se incluyó un patrón electroforético en gel de poliacrilamida durante el proceso de germinación de cada variedad, tales métodos se describen a continuación.

4.7.1 Cuantificación de proteína de reserva en base a su solubilidad

El primer paso fue preparar una curva estándar para determinar la concentración de proteína de cada variedad de cebada de los tratamientos antes descritos. Posteriormente se prepararon las soluciones de extracción y se aplicó la técnica desarrollada por Osborne (1924) de extracción de proteínas de reserva en base en las diferencias de solubilidad. Por último se cuantificó la proteína por el método de (Bradford, 1976).

Preparación de la curva estándar

Para esto se dispuso de 6 tubos eppendorf que fueron cargados con la concentración descrita por el Cuadro 10 donde se utilizó albúmina de suero bovino como proteína estándar de medición.

De cada tubo se tomaron 15 μl y se le adicionaron 750 μl del reactivo de Bradford de Bio-Rad®; se le dio un toque de agitación en Vortex-Genie®2 para homogeneizar la muestra y se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Velab^{MR} 722-2000. Para cuantificar la proteína de los tratamientos de las variedades de cebada se usó la ecuación de la curva estándar obtenida por regresión lineal y está representada en la gráfica de la Figura 12, con su respectivo valor de R^2 .

Cuadro 10. Concentración de proteína (BSA*) usada para la curva estándar por el método de Bradford.

Concentración de BSA* (µg/ml)	Preparación	
0	1 ml de agua destilada	
200	100 µl de BSA*	+ 900 µl de agua destilada
400	200 µl de BSA*	+ 800 µl de agua destilada
600	300 µl de BSA*	+ 700 µl de agua destilada
800	400 µl de BSA*	+ 600 µl de agua destilada
1000	500 µl de BSA*	+ 500 µl de agua destilada

*Albúmina de Suero Bovino (2 mg/ml) de Bio-Rad®.

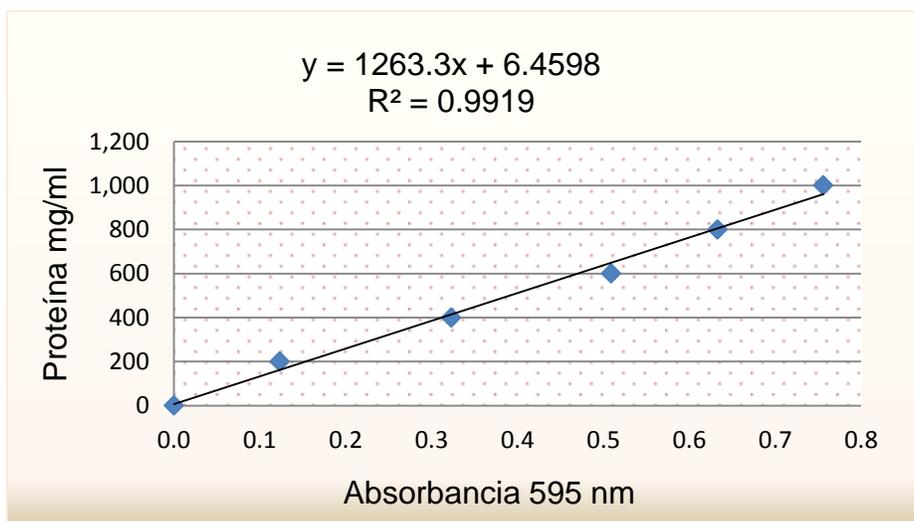


Figura 12. Curva estándar de cuantificación de proteína por el método de Bradford

Preparación de soluciones de extracción

Las soluciones de extracción de cada fracción de proteínas de reserva se exponen en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Soluciones de extracción de proteínas de reserva.

Proteínas de reserva	Solución de extracción
Albúminas	Agua destilada
Globulinas	Solución Tris pH8 (Tris* ¹ -HCl pH8 50 mM - NaCl 0.5 M)
Hordeínas (prolaminas)	Isopropanol ² 55%
Glutelinas	Solución de Boratos (Borato de sodio ³ 0.1 M-SDS** ⁴ 0.5%)

¹hidroximetilaminometano; **dodecil sulfato sódico; ¹USB®; ^{2,3}Karal®; ⁴Phytotechnology Laboratories™

Extracción de proteínas de reserva y cuantificación por el método de Bradford

- Fracción albúmina

Se procedió a moler finamente las muestras (entre más pulverizada, mayor superficie de contacto de la solución de extracción hacia la proteína) con ayuda de un molino Krups GX410011 y se llevó a refrigeración (4°C) hasta la extracción de las proteínas. Un vez hecho lo anterior, se pesó 0.1 g en una balanza analítica Setra SI-410S por duplicado de cada tratamiento (2 muestras por tratamiento) de cada variedad de cebada y se les adicionó 1 ml de agua destilada. Se pasó por 15 min en agitación en Vortex para que se asegure que todas las partículas de la harina están en contacto con el solvente. Después se centrifugó a 13,200 rpm durante 5 min en una microcentrífuga (Eppendorf® Centrifuge 5415D), se decantó y se recuperó el sobrenadante, del cual se tomó 15 µl por triplicado de cada muestra (3 repeticiones por muestra) y se les añadió 750 µl de reactivo de Bradford a cada repetición. Se preparó un blanco con 15 µl de agua destilada más 750 µl de reactivo de Bradford para calibrar el espectrofotómetro y se leyó la absorbancia de las repeticiones a 595 nm como lo específica (Bio-Rad, 2013).

- Fracción globulina

A las dos pastillas obtenida de la extracción de albúmina se les adicionó 1 ml de Solución Tris pH8 (extracción secuencial) a cada una, de igual manera se les pasó por 15 min en agitación en Vortex y luego se les centrifugó a 13 200 rpm durante 5 min. Seguidamente se decantaron y se recuperó el sobrenadante, del cual se ocupó 15 μ l por triplicado de cada muestra (6 repeticiones) y se les añadió 750 μ l de reactivo de Bradford a cada repetición. Se calibró el espectrofotómetro con el blanco y se leyó la absorbancia a 595 nm.

- Fracción hordeína

A las pastillas de la extracción anterior se les agregó 1 ml de Isopropanol 55% a cada muestra y también se les agitó por 15 min en Vortex. Se les centrifugó a 13 200 rpm durante 5 min obteniéndose un sobrenadante de donde se tomó 15 μ l por triplicado de cada muestra (6 repeticiones) para adicionar 750 μ l de reactivo de Bradford a cada repetición. De igual modo, se calibró el espectrofotómetro con el blanco y se leyó la absorbancia a 595 nm. Cuando la absorbancia de las repeticiones fue mayor que la curva estándar, se hizo una dilución, siendo el caso de las hordeínas en todas las variedades y se diluyó en proporción 1:2.

- Fracción glutelina

Se usó las pastillas de la extracción anterior y se les incorporó 1 ml de la Solución de Boratos, se mezclaron por 15 min en Vortex y se centrifugaron durante 5 min a 13 200 rpm. Una vez decantadas, del sobrenadante se empleó 15 μ l por triplicado de cada muestra (6 repeticiones) y se les adicionó 750 μ l de reactivo de Bradford. Cuando se obtuvieron los valores de absorbancia de las variedades de cebada (6 repeticiones por cada fracción de proteína por cada tratamiento de cada variedad) se calculó los gramos de proteína por 100 g de harina. Se calibró el espectrofotómetro con el blanco y se leyó la absorbancia a 595 nm.

El esquema de la metodología se puede apreciar en la Figura 13.



Figura 13. Esquema de preparación de muestra para medición de proteína por el método de Bradford.

4.7.2 Cuantificación de actividad proteolítica

Primeramente se preparó una curva patrón que mostró los valores de absorbancia para cada concentración de p-nitroanilina (pNA). A continuación se prepararon soluciones ocupadas para la técnica y posteriormente se determinó la actividad proteolítica (actividad de serín proteasa tipo tripsina) en base a la técnica de Erlanger, Kokowsky, & Cohen (1961).

Con ese fin, se germinaron las cinco variedades de cebada durante cinco días (siguiendo la técnica de la ISTA (2004) mencionada en la prueba de germinación estándar) tomándose muestras cada 12 horas, por lo que como base se fijaron las siguientes horas de germinación: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120.

Preparación de la curva patrón

Se preparó una solución de pNA 1 mM (0.001 M) en dimetilsulfóxido (DMSO) y una solución de Tris (hidroximetilaminometano)-HCl 0.1 M pH8 como solución amortiguadora. La relación entre los reactivos se muestra en el Cuadro 12, leyéndose a 405 nm a 37°C en el lector de microplacas, con tres repeticiones por cada relación. A continuación se graficaron los micromoles de pNA liberados por cada concentración contra las absorbancias, dando la ecuación de la curva patrón por regresión lineal (Figura 14).

Cuadro 12. Relación de reactivos para curva patrón de actividad proteolítica.

Sol.* pNA (μl)	Sol.* Tris (μl)	Sol.* pNA (μl)	Sol.* Tris (μl)	Sol.* pNA (μl)	Sol.* Tris (μl)
0	200	22	178	44	156
2	198	24	176	46	154
4	196	26	174	48	152
6	194	28	172	50	150
8	192	30	170	52	148
10	190	32	168	54	146
12	188	34	166	56	144
14	186	36	164	58	142
16	184	38	162	60	140
18	182	40	160	62	138
20	180	42	158		

*Solución

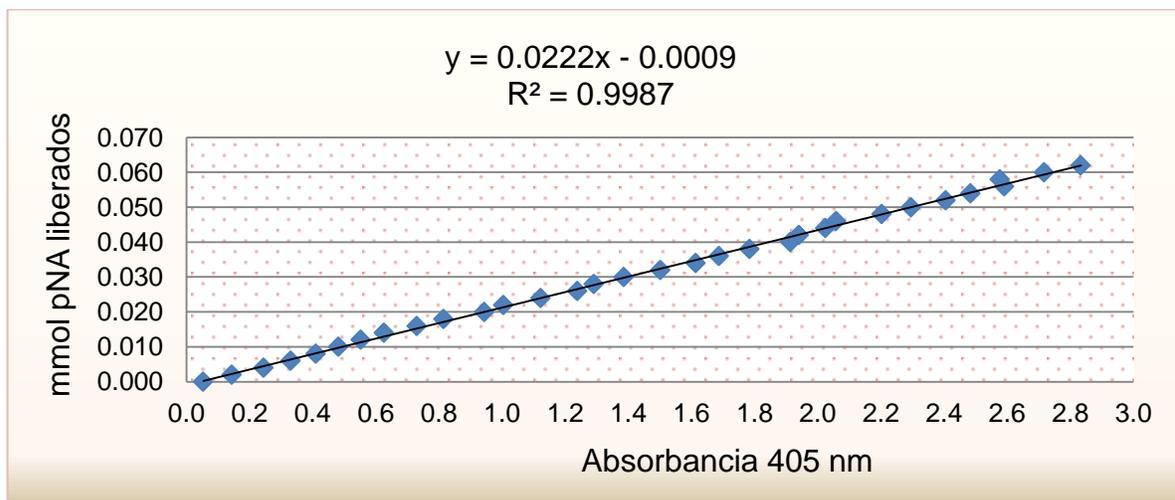


Figura 14. Curva patrón para cuantificación de actividad proteolítica

Preparación de soluciones

Las soluciones que se ocuparon para esta prueba se presentan en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Soluciones para cuantificación de actividad proteolítica en cebada.

Soluciones	Reactivos
Sustrato	α -N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida ¹ (BApNA) 0.01 M en dimetilsulfóxido ² (DMSO)
Solución amortiguadora	Tris ^{*3} -HCl 0.1 M pH8
Enzima: Solución stock	Tripsina ⁴ 1mg/ml en agua destilada pH3
Solución de trabajo	1:19 (50 μ l de sol.* stock + 950 μ l de agua pH3)

¹hidroximetilaminometano; ^{1,2,4}De Sigma®; ³de USB®

Fuente: Elaboración en base a Erlanger, Kokowsky, & Cohen (1961).

Cuantificación de la actividad proteolítica

Se determinó la actividad proteolítica (actividad de serín proteasa tipo tripsina) en base a la técnica de Erlanger, Kokowsky, & Cohen (1961), que consistió en monitorear el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo, por la hidrólisis que sufre el sustrato sintético α -N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BApNA) debido a la liberación de pNA por efecto de la actividad proteolítica en un lector de microplacas, identificándose por medio del color amarillo, lo que permitió medir el aumento de absorbancia de la disolución con el tiempo. La unidad de actividad proteolítica fue manejada en katal (Unidad del Sistema Internacional de Unidades para la medida de la actividad enzimática definida como la cantidad de moles de producto por minuto).

Como ya se mencionó, el tiempo total de germinación fueron 120 horas tomándose muestras cada 12 horas, las cuales se almacenaron a -80°C en un ultracongelador Revco®Ult1786-3-A37 hasta su cuantificación de actividad proteolítica. Se trituraron finamente las muestras con ayuda de nitrógeno líquido en mortero con pistilo previamente congelados (-80°C) para evitar la activación de la actividad enzimática de la plántula.

Se pesó 0.1 g de harina por duplicado (2 muestras por hora de germinación) y se le agregó 1 ml de agua destilada fría como solución de extracción. Cada muestra se agitó en Vortex-Genie®2 por 15 min, (2 min en hielo y 2 min en agitación hasta completar los 15 min para evitar que la muestra se calentara). Se centrifugó en una microcentrífuga eppendorf® Centrifuge 5415D, por 5 min a 13 200 rpm (1 min en centrífuga y 1 min en hielo hasta completar los 5 min, de igual forma para evitar que la muestra se calentara). Se decantó y el sobrenadante se congeló a -20°C hasta la lectura en microplacas, siendo el mismo día de extracción para descartar algún signo por degradación de la proteína (Figura 15). Del sobrenadante se transfirieron 20 µl en una microplaca por triplicado de cada muestra por hora de germinación de las variedades de cebada y se le agregó 160 µl de la solución amortiguadora más 20 µl de sustrato.

El control negativo fue compuesto por 180 µl de solución amortiguadora más 20 µl de sustrato. Se usó un control positivo que consistió en 170 µl de solución amortiguadora, 10 µl de enzima tripsina más 20 µl de sustrato. Tanto las muestras (6 repeticiones por hora de germinación de cada variedad) como los controles se leyeron en el lector de microplacas PerkinElmer Victor™X3 2030 Multilabel Reader, a 405 nm a una temperatura de 37°C, tomando lecturas cada 5 minutos por lapso de 30 min (7 lecturas), previo 15 min de incubación para que pudiera activarse la hidrólisis del sustrato BApNA con la enzima de las muestras con ayuda de la solución amortiguadora.

Se usó la ecuación lineal dada por la curva patrón de pNA ($y = 0.0222x - 0.0009$), se sustituyó el valor de las absorbancias y así se obtuvo los micromoles de pNA liberados por minuto de acuerdo a cada hora de germinación. Posteriormente se graficó el tiempo de las lecturas (7 lecturas), contra los micromoles de pNA liberados para sacar la ecuación lineal en la cual el valor de la pendiente representa la velocidad de hidrólisis (micromoles de pNA liberados por minuto cada 12 horas de germinación).



Se germinó las cinco variedades de cebada durante 5 días, se tomó muestra cada 12 h (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 h para cada variedad)

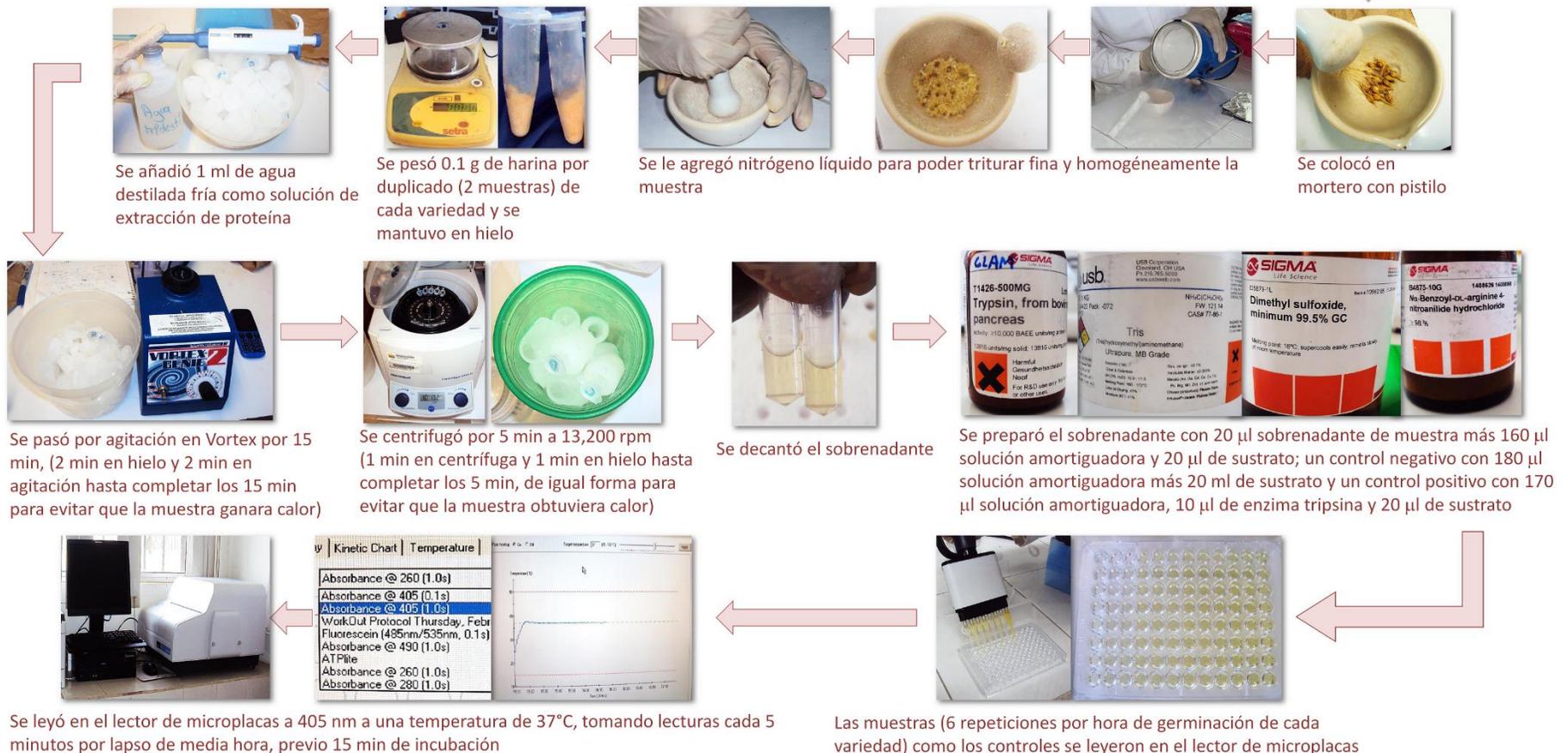


Figura 15. Esquema de la preparación de muestra para determinar actividad proteolítica

4.7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se utilizó la técnica de (Schagger & Von Jagow, 1987) y se comenzó con la extracción de proteína de reserva de cada variedad de cebada, consecutivamente se prepararon las soluciones para la elaboración de los geles, por lo que lo siguiente fue la elaboración de los geles de poliacrilamida y por último se corrió la electroforesis y se tiñó con azul de Coomassie. Para identificar el patrón electroforético de las proteínas durante el proceso de germinación de las variedades de cebada se utilizaron muestras que habían sido germinadas para la prueba de cuantificación de actividad proteolítica, fijándose los siguientes tiempos de germinación: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 horas.

Extracción de proteína de reserva

Durante toda la técnica las muestras tomadas cada 12 horas de germinación de cada variedad de cebada se mantuvieron en frío para limitar la posibilidad de una activación de enzimas. Se molieron finamente añadiendo nitrógeno líquido con un mortero con pistilo previamente congelado (-20°C). Se pesó 0.1 g de cada muestra del proceso de germinación de las variedades en una balanza analítica Adam® ae y se añadió 1 ml de solución de extracción (Tris-HCl 0.1 M pH8). Se agitó en Vortex-Genie®2 por 10 min (2 min en hielo y 2 min en agitación hasta completar los 10 min). Se centrifugó en una microcentrífuga eppendorf® Centrifuge 5415D, por 5 min a 13 200 rpm (1 min en centrífuga y 1 min en hielo hasta completar los 5 min). Se decantó y el sobrenadante se sometió a una precipitación con el triple de acetona fría (3 ml) y se mantuvo por aproximadamente 1 hora a -20°C. Más tarde se centrifugó por 5 min a 13 200 rpm (1 min en centrífuga y 1 min en hielo hasta completar los 5 min). Se desechó la acetona y se dejó secar las muestras hasta evaporarse totalmente (aproximadamente 1 hora) y se adicionó 92 µl de amortiguador de muestra pH 6.8 para luego congelarlas a -40°C en un Opergn® Ultra-Low Temperature Freezer -40°C, hasta cargarlas en los geles de poliacrilamida e iniciar la electroforesis (Figura 16).



Se germinaron las variedades de cebada por cinco días y se tomaron muestras cada 12 horas



Se añadió 1ml de solución de extracción (Tris-HCl 0.1 M pH8) y se agitó por 10 min (2 min en hielo y 2 min en agitación hasta completar los 10 min)



Se pesó 0.1 g



Se molieron las muestras añadiendo nitrógeno líquido con un mortero con pistilo



Se centrifugó por 5 min a 13,200 rpm (1 min en centrífuga y 1 min en hielo hasta completar los 5 min)



Se decantó y el sobrenadante se sometió a una precipitación con el triple de acetona fría (3 ml) y se mantuvo por aproximadamente 1 hora a -20°C



Se evaporó la acetona (aproximadamente 1 hora) y se adicionó 92 µl de amortiguador de muestra pH 6.8, se congeló a -40°C hasta cargar en los geles de poliacrilamida e iniciar la electroforesis



Se centrifugó por 5 min a 13,200 rpm (1 min en centrífuga y 1 min en hielo hasta completar los 5 min)

Figura 16. Esquema de la preparación de muestra para extracción de proteínas de reserva para patrones electroforéticos.

Soluciones para la elaboración de geles de poliacrilamida

Para la prueba se usaron las soluciones presentadas en los Cuadros 14, 15 y 16.

Cuadro 14. Soluciones para extracción de proteínas y para electroforesis.

Soluciones	Reactivos
Acetona	Acetona ² grado reactivo
Amortiguador de muestra pH 6.8	Glicerol ³ 15%; Tris 50 mM; SDS ^{*4} 4%; azul G de Coomassie ⁵ 0.01%
Sacarosa	Sacarosa ⁶ grado reactivo
Solución de extracción de proteína	Tris ^{**1} -HCl 0.1 M pH8

*Dodecil sulfato sódico; **hidroximetilaminometano; ¹USB®; ²ReproquifinPQF^{MR}; ³J.T.Baker®; ⁴GibcoBRL®ultraPURETM; ⁵Sigma®; ⁶Golden Bell Reactivos^{MR}

Cuadro 15. Soluciones para elaboración de gel de poliacrilamida.

Soluciones	Reactivos
Agua destilada	Agua destilada
Amortiguador de gel pH 8.45	Tris ^{**1} -HCl 3 M; SDS ^{**2} 0.3%
Persulfato de amonio	Persulfato de amonio ⁶ 10%
Solución stock de acrilamida-bis-acrilamida	Acrilamida ⁴ -bis-acrilamida ⁵ 30%
Solución de glicerol	Glicerol ³ 1 g/ml
TEMED	TEMED ^{***7} (grado reactivo)

*Dodecil sulfato sódico; **hidroximetilaminometano; ***N, N, N', N'-tetrametilendiamina; ^{1,5}USB®; ^{2,4}GibcoBRL®ultraPURETM; ³J.T.Baker®; ⁶Bio-Rad®; ⁷Sigma®

Cuadro 16. Soluciones para tinción y corrida electroforesis en gel de poliacrilamida.

Soluciones	Reactivos
Amortiguador de ánodo	Tris ^{*1} -HCl 0.2 M pH 8.9
Amortiguador de cátodo	Tris 0.1 M; Tricine ² 0.1 M; SDS ^{***3} 0.1%
Solución fijadora	Metanol ⁴ 50%; Ácido acético ⁵ 10%
Solución teñidora	Azul G de Coomassie ⁶ 0.025%; Ácido acético 10%
Solución desteñidora	Ácido acético 10%

*hidroximetilaminometano; **dodecil sulfato sódico; ¹USB®; ^{2,6}Sigma®; ³GibcoBRL®ultraPURETM; ^{4,5}Karal®

Elaboración de gel de poliacrilamida

Para la prueba se utilizó una cámara de electroforesis Mini-Protean® Tetra Cell de Bio-Rad®. Se usaron geles de poliacrilamida donde el gel separador fue de 12% y el gel concentrador fue de 4% empleando un stock de poliacrilamida al 30%. La relación de reactivos se describe en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Relación de reactivos para geles de poliacrilamida y su concentración.

Reactivos	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
Solución stock de acrilamida-bis-acrilamida 30%	0.8 ml	4 ml
Amortiguador de gel pH 8.45	1.5 ml	3.33 ml
Solución de glicerol	---	1.33 ml
Agua destilada	4.1 ml	1.34 ml
Persulfato de amonio	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie

Una vez montado el equipo de electroforesis y con los geles de poliacrilamida polimerizados se agregó el amortiguador de cátodo, posteriormente se cargó 10 µl del marcador estándar de peso molecular y 20 µl de muestra del proceso de germinación de las variedades de cebada preparadas anteriormente, con un poco de sacarosa para incrementar su densidad y así pudieran entrar en los carriles sin derramarse hacia carriles adyacentes, esto con el fin de evitar contaminación entre muestras. Se empleó un marcador estándar de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad®) de 9 proteínas conocidas: Miosina (200 kDa), β-galactosidasa (116.25 kDa), Fosforilasa b (97.4 kDa), Albúmina de Suero Bovino (66.2 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa Carbónica (31 kDa), Inhibidor tipo Tripsina (21.5 kDa), Lisozima (14.4 kDa) y Aprotinina (6.5 kDa). Para modo de preparación en Anexo 4, Cuadro 36.

Se adicionó el amortiguador de ánodo y se conectó a la fuente de poder (Amersham® Electrophoresis Power Supply – EPS 301) a 50 V con 20 mA por 30 min para concentrar las muestras en el inicio del gel separador, después se subió el voltaje a 70 V con 30 mA entre 3 y 4 horas aproximadamente, hasta que las proteínas se separan por completo en el gel.

A continuación se desmontaron los geles del equipo, se lavaron con agua destilada y se colocaron en recipientes de plástico con solución fijadora hasta completar 30 min, en seguida se añadió la solución teñidora hasta cubrir el gel por un tiempo aproximado de 2 a 4 horas, o hasta la resolución de bandas, y por último se agitaron suavemente con la solución desteñidora para eliminar el exceso de coloración en el fondo del gel. Más tarde se lavaron los geles con agua destilada para quitar el exceso de solución desteñidora y se colocaron en marcos de plástico para secarlos con papel celofán (Figura 17). Los geles de poliacrilamida son continuos debido a que el pH mantenido en el gel concentrador y el gel separador es igual.



Montado de equipo de electroforesis con geles de poliacrilamida polymerizados



Se cargó 10 μ l del marcador y 20 μ l de muestra de cinética de germinación de las variedades de cebada



Se corrió a 50 V con 20 mA por 30 min, después se subió el voltaje a 70 V con 30 mA entre 3 y 4 horas aproximadamente



Se añadió la solución teñidora a los geles hasta cubrir. Se agitaron suavemente con la solución desteñidora y se lavaron con agua destilada



Se lavó con agua destilada y se adició solución fijadora hasta cubrir por 30 min



Por último se colocaron en marcos de plástico para secarlos con papel celofán

Figura 17. Esquema del proceso de electroforesis y tinción de gel de poliacrilamida.

4.8 Análisis estadístico

El análisis de los resultados de las pruebas físicas (peso de mil semillas y peso hectolítrico), fisiológicas (porcentaje de germinación estándar y longitud de plúmula), la prueba de cuantificación de proteína en base a su solubilidad y la prueba de cuantificación de actividad proteolítica se aplicó un diseño completamente al azar (debido a que las pruebas fueron realizadas en el laboratorio y las condiciones fueron controladas) y se analizó mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), versión 9.0 para Windows.

En el Cuadro 34 (Anexo 3) se describen las fuentes de variación y grados de libertad del análisis de varianza de las pruebas físicas, fisiológicas y cuantificación de proteínas de reserva para los dos calendarios de riego (CR1 y CR2), cinco variedades de cebada y dos arreglos de siembra.

En el Cuadro 35 (Anexo 3) se describen las fuentes de variación y grados de libertad del análisis de varianza de la cuantificación de actividad proteolítica de las cinco variedades de semilla de cebada durante el proceso de germinación (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 horas).

Mientras que para poder conocer el peso molecular en kilodaltones (kDa) de las proteínas marcadas en las bandas de los patrones electroforéticos de las variedades de cebada en proceso de germinación se comparó el Rf (movilidad electroforética relativa de cada proteína) de las proteínas de las muestras con el Rf de las proteínas de referencia, cuyo peso molecular se conoce (Maldonado & Jorrín, 2011), usando una ecuación por regresión polinómica de orden 3 dada por la gráfica de logaritmo natural de los peso moleculares de las proteínas del marcador contra el Rf del marcador. El parámetro Rf se define como:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Calidad física y fisiológica

La calidad física se determinó midiendo el peso de mil semillas y peso hectolítrico; mientras que la calidad fisiológica se obtuvo utilizando pruebas de viabilidad como germinación estándar y prueba de vigor como longitud de plúmula.

5.1.1 Comparación entre variedades de cebada

En el Cuadro 18, se describe la comparación de medias entre las cinco variedades de cebada, respecto a las variables de calidad física y fisiológica en los dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) y los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras). Se puede ver que la variedad Esperanza fue la que presentó el mejor valor en las variables de calidad de peso de mil semillas (47.8231 g), peso hectolítrico (67.2087 kg/hl) y longitud de plúmula (4.3175 cm), en tanto que Adabella fue inferior en las variables de calidad física y fisiológica (peso de mil semillas con 41.4678 g, peso hectolítrico con 63.4154 kg/hl y longitud de plúmula con 2.2237 cm); sin embargo, en el porcentaje de germinación estándar las variedades de Valles Altos (Adabella y Esmeralda) obtuvieron mayores porcentajes de germinación que las variedades de El Bajío (Alina, Armida y Esperanza) (Figuras 25 y 26, Anexo 5). Estos resultados se comprueban en el Cuadro 37 (Anexo 5) que muestra el análisis de varianza conjunto (ANOVA) para las variables de calidad física y fisiológica, ya que las cinco variedades (V) presentaron alta diferencia estadística significativa en todas las pruebas físicas y fisiológicas, lo que indica que al menos una variedad es diferente; el coeficiente de variación es un índice de la validez del ensayo, siendo más confiable cuanto menor sea dicha variación (en cereales es conveniente un coeficiente inferior a 15% según Goñi *et al.* (2008). En el análisis de varianza conjunto (Cuadro 37, Anexo 5) se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en los calendarios de riego (R) en peso de mil semillas y peso hectolítrico; sin embargo, el arreglo de siembra (S) sólo afectó en peso de mil semillas.

Los calendarios de riego en su interacción con las variedades de cebada (R*V) y el arreglo de siembra (R*S) contribuyeron significativamente en peso de mil semillas y en porcentaje de germinación estándar, lo que significó que el riego durante el ciclo de producción y arreglo de siembra en campo afectó el llenado de la semilla de las variedades, suministrando cantidades variables de nutrientes o sustancias de reserva, lo que propició diferentes porcentajes de germinación (entre mayor cantidad de sustancias de reserva se relacionó con un mejor porcentaje de germinación). Este análisis nos dio como resultado que los valores obtenidos en la comparación de medias (Cuadro 18) de la prueba de peso de mil semillas (valores entre 41.46 y 47.82 g) fueran superiores que los publicados por (Goñi *et al.*, 2009) para otras variedades de cebada con siembra en el ciclo otoño-invierno logrando un valor de 40 g para variedad de 6 hileras (mismo número de hileras que las utilizadas en este trabajo). Sin embargo los resultados coincidieron con lo reportado por GENVCE^b (2012) y con Castañeda *et al.* (2009), el primero maneja principalmente valores entre 41 y 47 g donde se evaluó la calidad agronómica de variedades de cebada de ciclo largo (tardía), el segundo manejó una siembra en el ciclo invierno-primavera bajo sistema de riego (utilizando la variedad Esmeralda) con un peso de 42 g. (Castillo, 2012) evaluó las mismas cinco variedades de cebada siendo Armida y Esperanza las más altas estadísticamente con valores entre 42.06 a 46.63 g, coincidiendo en este trabajo con la variedad Esperanza estadísticamente más alta.

Los valores más altos de peso hectolítrico en la comparación de medias (Cuadro 18) fueron representados por Alina y Esperanza, con 68.356 kg/hl y 67.208 kg/hl respectivamente, mientras Adabella presentó el menor peso (63.451 kg/hl). Los datos cumplen con la norma NMX-FF-043-SCFI-2003 (Secretaría de Economía, 2003) donde se especifica que la cebada de seis hileras debe tener un peso mínimo de 56 kg/hl. Estos resultados coinciden con los que se publicaron por (Goñi *et al.*, 2009) y (GENVCE^b, 2012), que mencionan valores entre 62 y 68 kg/hl; siendo superiores a los reportados por (GENVCE^a, 2012) en cebada de otoño con valores entre 52 y 58 kg/hl.

Asimismo los resultados obtenidos de peso hectolítrico fueron superiores a los registrados por (Ramírez, 2013), donde se señala un rango entre 59.1 a 64.1 kg/hl, aunque son más bajos que los publicados por (Castillo, 2012), quien también evaluó las mismas cinco variedades de cebada y obtuvo valores entre 67.00 a 71.67 kg/hl.

Según el análisis de varianza conjunto (Cuadro 37, Anexo 5) no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en los calendarios de riego (R) en porcentaje de germinación ni longitud de plúmula, lo que denota que el riego no tuvo efecto. En relación al porcentaje de germinación estándar en la comparación de medias (Cuadro 18), las variedades de Valles Altos fueron mayores (Adabella con 99.62% y Esmeralda con 98.87%) con respecto a las de El Bajío (Alina con 97.25%, Armida con 97.62% y Esperanza con 97.50%). Sin embargo, todas las variedades se encuentran dentro del rango establecido por la NMX-FF-043-SCFI-2003, Secretaría de Economía (2003) que exige un 85% como mínimo. Por otro lado los resultados fueron superiores que los obtenidos por (Castañeda *et al.*, 2009), quienes sembraron en ciclo invierno-primavera bajo sistema de riego (variedad Esmeralda con 91%). Siendo similar al resultado reportado por (Prieto *et al.*, 2011) en la misma variedad Esmeralda (hasta 98.8%).

En la prueba de longitud de plúmula, el análisis de varianza conjunto (Cuadro 37, Anexo 5) indicó que tuvo diferencias estadísticas significativas la interacción entre calendarios de riego con el arreglo de siembra (R*S), lo que se reflejó en la discrepancia de los resultados entre variedades. Se pudo observar que Esperanza tuvo un crecimiento de plúmula (4.31 cm) estadísticamente mayor a las demás variedades en la comparación de medias (Cuadro 18), siendo Adabella la variedad con el menor valor (2.23 cm). El rango de longitud de plúmula (23.3 a 44.1 mm) a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ fue superior con lo señalado por Álvarez (2011), con un rango de 23 a 30 mm de longitud a temperaturas de $16 \pm 1^\circ\text{C}$ y $26 \pm 1^\circ\text{C}$, a las 96 horas de germinación con otras variedades de cebada.

En la Figura 18 se muestra el porcentaje de germinación estándar de las cinco variedades de cebada dividido en porcentaje de semillas normales, anormales y muertas. En la gráfica se observa que las variedades de Valles Altos tienen mejor porcentaje de germinación, destacándose Adabella por encima de Esmeralda. Las variedades de El Bajío (Alina, Armida y Esperanza) presentaron mayor porcentaje de semillas anormales y semilla muerta. Moreno¹ (1996) señala que la cebada puede permanecer 7 años almacenada y presentar vigor aceptable si se tienen condiciones de baja humedad y temperatura de entre -10 y -20°C.

Cuadro 18. Calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Variedades	Variables de calidad física y fisiológica*			
	Peso de mil semillas (g)	Peso hectolítrico (kg/hl)	Porcentaje de germinación estándar (%)	Longitud de plúmula (cm)
Adabella	41.4678 ^d	63.4154 ^d	99.6250 ^a	2.2337 ^d
Alina	44.6479 ^c	68.3569 ^a	97.2500 ^b	2.8168 ^c
Armida	46.2377 ^b	66.4961 ^{bc}	97.6250 ^b	3.4962 ^b
Esmeralda	41.1928 ^d	65.4126 ^c	98.8750 ^{ab}	3.3662 ^b
Esperanza	47.8231 ^a	67.2087 ^{ab}	97.5000 ^b	4.3175 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

De acuerdo al análisis de varianza en el Cuadro 38 (Anexo 5) de las pruebas de calidad física y fisiológica en el calendario de riego 1 (CR1), se observó que el arreglo de siembra (S) sólo afectó el peso de mil semillas y la longitud de plúmula, obteniéndose diferencias estadísticas altamente significativas; la relación entre variedades (V) en el calendario de riego y su interacción con el arreglo de siembra (S*V), tuvieron diferencias estadísticas significativas en todas las pruebas, lo que nos indica que el calendario de riego (antes de la fecha de floración) aunado al arreglo de siembra, pudo tener influencia en el aporte de sustancias de reserva.

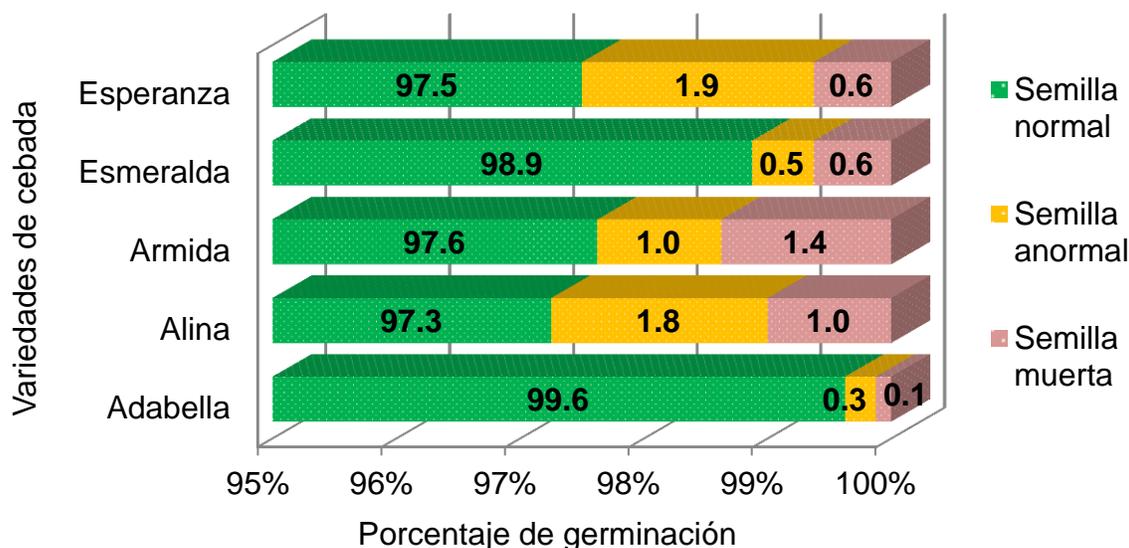


Figura 18. Porcentaje de germinación de las cinco variedades de cebada

Los resultados del análisis de varianza en el Cuadro 38 (Anexo 5) de las pruebas de calidad física y fisiológica en el calendario de riego 1 (CR1) se reflejaron en el Cuadro 19 donde se describe la comparación de medias entre las cinco variedades de cebada, (variables de calidad física y fisiológica) en el calendario de riego 1 (0-49-78 dds) con los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras). En él se muestra que la variedad Esperanza obtuvo mejores valores en todas las pruebas (47.66 g de peso de mil semillas, 67.05 kg/hl, 98% de germinación y 4.2 cm de longitud de plúmula) y Adabella fue la de menor atributos de calidad (39.93 g de peso de mil semillas, 62.41 kg/hl y 2.26 cm de longitud de plúmula). En general se aprecia que las variedades de El Bajío se adaptaron mejor a este calendario de riego que las de Valles Altos.

En el Cuadro 39 (Anexo 5) describe el análisis de varianza del calendario de riego 2 (CR2), en cuanto a las pruebas físicas y fisiológicas. El arreglo de siembra (S) sólo afectó el porcentaje de germinación y la longitud de plúmula de la semilla; la interacción entre el arreglo de siembra y las variedades (S*V) tuvo altas diferencias estadísticas significativas en peso de mil semillas, porcentaje de germinación y longitud de plúmula, no así para peso hectolítrico.

Los resultados del análisis de varianza del calendario de riego 2 (Cuadro 39, Anexo 5) pudieron deberse a que el riego se dio durante la fecha de floración y quizá el periodo previo al riego afectó el número de semillas producidas y no tanto el tamaño (Moreno¹, 1996). De igual forma indicó que las variedades (V), tuvieron altas diferencias estadísticas significativas, por lo que en el Cuadro 20, quien presenta la comparación de medias entre las cinco variedades de cebada del calendario de riego 2 (0-60-106 dds) con dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las variables físicas y fisiológicas, mostró que la variedad Esperanza (47.97 g de peso de mil semillas, 67.35 kg/hl, 97% de germinación y 4.42 cm de longitud de plúmula) y Armida (47.18 g de peso de mil semillas, 67.83 kg/hl, 98.5% de germinación y 3.55 cm de plúmula) manifestaron los valores más altos estadísticamente, mientras que Adabella fue la menor (43 g de peso de mil semillas, 64.41 kg/hl y 2.20 cm de longitud de plúmula), con 99.5% de germinación.

Cuadro 19. Calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada en calendario de riego 1 (CR1) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Variedades	Variables de calidad física y fisiológica*			
	Peso de mil semillas (g)	Peso hectolítrico (kg/hl)	Porcentaje de germinación estándar (%)	Longitud de plúmula (cm)
Adabella	39.9338 ^d	62.4183 ^c	99.7500 ^a	2.2600 ^d
Alina	43.4304 ^c	66.7543 ^a	95.7500 ^c	2.8687 ^c
Armida	45.2883 ^b	65.1593 ^{ab}	96.7500 ^{bc}	3.4350 ^b
Esmeralda	39.8054 ^d	63.9865 ^{bc}	99.2500 ^{ab}	3.3150 ^b
Esperanza	47.6665 ^a	67.0588 ^a	98.0000 ^{abc}	4.2100 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Cuadro 20. Calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada en calendario de riego 2 (CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Variedades	Variables de calidad física y fisiológica*			
	Peso de mil semillas (g)	Peso hectolítrico (kg/hl)	Porcentaje de germinación estándar (%)	Longitud de plúmula (cm)
Adabella	43.0019 ^c	64.4126 ^c	99.5000 ^a	2.2075 ^d
Alina	45.8655 ^b	69.9596 ^a	98.7500 ^{ab}	2.7650 ^c
Armida	47.1871 ^{ab}	67.8329 ^{ab}	98.5000 ^{ab}	3.5575 ^b
Esmeralda	42.5803 ^c	66.8388 ^b	98.5000 ^{ab}	3.4175 ^b
Esperanza	47.9798 ^a	67.3586 ^b	97.0000 ^b	4.4250 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

5.1.2 Efecto de calendario de riego

En el Cuadro 21 se indica la comparación de medias entre los dos calendarios de riego (CR1 y CR2), con las variables de calidad física y fisiológica en los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las cinco variedades de semilla de cebada. Se puede observar que el calendario de riego 2 fue mejor en las pruebas de peso de mil semillas con 45.32 g y peso hectolítrico con 67.28 kg/hl, mientras los resultados no mostraron diferencia significativa, en cuanto al porcentaje de germinación estándar (97.90% para CR1 y 98.45% para CR2) y a la longitud de plúmula (3.21 cm para CR1 y 3.27 cm para CR2) según la comparación de medias, no existiendo diferencias para pruebas de calidad fisiológicas.

Cuadro 21. Variables de calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) y en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Calendario de riego	Variables de calidad física y fisiológica*			
	Peso de mil semillas (g)	Peso hectolítrico (kg/hl)	Porcentaje de germinación estándar (%)	Longitud de plúmula (cm)
CR1 (0-49-78 dds)	43.2249 ^b	65.0754 ^b	97.9000 ^a	3.2177 ^a
CR2 (0-60-106 dds)	45.3229 ^a	67.2805 ^a	98.4500 ^a	3.2745 ^a

dds: días después de siembra; * Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

5.1.3 Efecto de arreglo de siembra

La constitución del arreglo agronómico en surcos a doble hilera ofrece ventajas importantes en comparación con el sistema tradicional de melgas (faja de tierra que se marca para sembrar) como son el ahorro de 50% de semilla, 35% de agua y 40% en la aplicación de plaguicidas, desarrollo de tallos vigorosos y compatibilidad con los sistemas de labranza de conservación (con menor uso de maquinaria), además de obtener altos rendimientos y calidad (García *et al.*, 2003; García & Gámez, 2006; Ramírez, 2013). No obstante, al analizar los resultados de la comparación de medias (variables físicas y fisiológicas) entre los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en los dos calendarios de riego (CR1 y CR2) de las cinco variedades de cebada, en el Cuadro 22, se pudo visualizar que estadísticamente los resultados fueron iguales para la mayoría de las variables, lo que significa que el arreglo de siembra no influyó en el peso hectolítrico de la semilla (66.00 kg/hl para 2 hileras y 66.35 kg/hl para 3 hileras), el porcentaje de germinación (98.35% para 2 hileras y 98.00% para 3 hileras) o en el vigor (longitud de plúmula) (3.24 cm para 2 hileras y 3 hileras).

Sin embargo, el peso de mil semillas fue afectado por el arreglo de 2 hileras (44.53 g), el cual fue mejor estadísticamente que el arreglo de siembra a 3 hileras (44.01 g). Investigaciones de (Suaste *et al.*, 2013) señalan que el arreglo a 3 hileras superó a surcos con 2 hileras en la variable de rendimiento para el caso de trigo.

Cuadro 22. Calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) y dos calendarios de riego (CR1 Y CR2).

Arreglo de siembra	Variables de calidad física y fisiológica*			
	Peso de mil semillas (g)	Peso hectolítrico (kg/hl)	Porcentaje de germinación estándar (%)	Longitud de plúmula (cm)
2 hileras	44.5378 ^a	66.0046 ^a	98.3500 ^a	3.2427 ^a
3 hileras	44.0100 ^b	66.3513 ^a	98.0000 ^a	3.2495 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

En el Cuadro 23 se puede ver la comparación de medias (variables físicas y fisiológicas) entre los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en el calendario de riego 1 (0-49-78 dds) de las cinco variedades de cebada. El arreglo de siembra no intervino en el peso hectolítrico ni en porcentaje de germinación. Sin embargo, para el peso de mil semillas, el arreglo a 2 hileras fue estadísticamente mayor (43.91 g), mientras que para longitud de la plúmula, el arreglo de siembra a 3 hileras fue estadísticamente mejor (3.29 cm), esto podría deberse a la necesidad que tiene la semilla de menor peso de alcanzar rápidamente el proceso fotosintético y no depender de las reservas nutricionales.

Cuadro 23. Calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en el calendario de riego 1 (CR1).

Arreglo de siembra	Variables de calidad física y fisiológica*			
	Peso de mil semillas (g)	Peso hectolítrico (kg/hl)	Porcentaje de germinación estándar (%)	Longitud de plúmula (cm)
2 hileras	43.9191 ^a	64.6275 ^a	97.4000 ^a	3.1365 ^b
3 hileras	42.5307 ^b	65.5234 ^a	98.4000 ^a	3.2990 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

En el Cuadro 24 se puede apreciar la comparación de medias entre los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las variables físicas y fisiológicas en el calendario de riego 2 (0-60-106 dds) de las cinco variedades de cebada. En este caso, el arreglo de siembra no afectó las variables de calidad física, mientras que el arreglo a 2 hileras fue mejor para porcentaje de germinación (99.30%) y longitud de plúmula (3.34 cm), debido a que las plantas tuvieron mejor disponibilidad de recursos para nutrirse.

Cuadro 24. Calidad física y fisiológica de cinco variedades de cebada en los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en el calendario de riego 2 (CR2).

Arreglo de siembra	Variables de calidad física y fisiológica*			
	Peso de mil semillas (g)	Peso hectolítrico (kg/hl)	Porcentaje de germinación estándar (%)	Longitud de plúmula (cm)
2 hileras	45.1565 ^a	67.3818 ^a	99.3000 ^a	3.3490 ^a
3 hileras	45.4893 ^a	67.1793 ^a	97.6000 ^b	3.2000 ^b

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

5.2 Pruebas bioquímicas

Consistió en cuantificar la proteína de reserva, la actividad proteolítica y sus patrones electroforéticos durante la germinación de las cinco variedades de cebada.

5.2.1 Comparación de proteína de reserva entre variedades

En el Cuadro 25 se puede observar la comparación de medias de la cantidad de proteína de reserva entre las cinco variedades de cebada, expresada en mg de proteína por g de harina, (mg P/g H), con dos calendarios de riego (CR1 y CR2) y los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras). La variedad Esperanza mostró más cantidad de proteínas en las fracciones albúmina (4.99 mg P/g H), globulina (6.51 mg P/g H) y glutelina (5.22 mg P/g H); Adabella fue alta en globulina (6.49 mg P/g H) y hordeína (17.46 mg P/g H), mientras que Alina fue la variedad con la menor cantidad de proteína para la mayoría de las fracciones. Los resultados se pueden corroborar en el análisis de varianza conjunto de la cuantificación de proteínas de reserva en los dos calendarios de riego (CR1 y CR2) con los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las cinco variedades de cebada que se muestra en el Cuadro 40 (Anexo 6), donde se puede notar que casi todas las fuentes de variación (R, V y S), incluyendo las interacciones (R*V, R*S, S*V y R*S*V), tuvieron efecto en la cantidad de proteína de reserva (en albúminas, globulinas y hordeínas) excepto en glutelinas con respecto al arreglo de siembra (S), donde no hubo diferencias estadísticas significativas.

Investigaciones publicadas por Giambastiani & Rubiolo (2002) y Aguado (2008) indicaron que la cebada tiene de 10 a 16% de proteína total del grano de la cual, la fracción albúminas representa del 3 a 4%, globulinas de 10 a 20%, 35 a 45% de prolaminas y de 35 a 45% de glutelinas; estos datos son similares a los divulgados por MacGregor & Batty (1996), con resultados para albúmina con el 4%, globulina con 31%, 36% de hordeína y glutelina con aproximadamente 29%; de igual forma los resultados encontrados por Garnero (2006) son similares a los reportados por los autores citados anteriormente.

En comparación a los resultados mencionados, los arrojados por esta investigación se encontraron algunas diferencias (Figura 27, Anexo 6), las medias de cada fracción de las variedades de cebada mostraron para albúminas un total del 14%, globulinas para 20%, hordeínas (prolaminas) el 50% y glutelinas el 16%. Sólo en la fracción hordeínas el resultado obtenido es similar al 46 a 52% mencionado por Fundación Belén (2013). Dichas diferencias entre los porcentajes posiblemente es por el manejo agronómico del cultivo, la composición genética de las variedades y la interacción con el medio ambiente.

Cuadro 25. Cuantificación de proteínas entre cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Variedad	Variable de calidad bioquímica*							
	Cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina)							
	Albúmina	%	Globulina	%	Hordeína	%	Glutelina	%
Adabella	4.3175 ^c	13	6.4977 ^a	19	17.4691 ^a	52	5.1020 ^b	15
Alina	3.9918 ^d	13	6.0168 ^b	20	15.9114 ^c	52	4.5305 ^d	15
Armida	4.9632 ^a	16	6.1312 ^b	19	15.5030 ^d	49	4.8832 ^c	16
Esmeralda	4.7900 ^b	16	6.2021 ^b	21	13.5988 ^e	46	4.9446 ^c	17
Esperanza	4.9998 ^a	15	6.5179 ^a	20	16.3520 ^b	49	5.2228 ^a	16
Proporción promedio (%)	14		20		50		16	

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Puede decirse en términos generales, que la absorción de nutrientes por la planta se completa antes de la floración (Bauzá, 2005), siendo el caso el calendario de riego 1, donde el análisis de varianza de cuantificación de proteína de reserva (Cuadro 41, Anexo 6) mostró que las cinco variedades (V) con arreglo de siembra a 2 y 3 hileras (S) y sus interacciones (S*V) tuvieron diferencias estadísticas significativas, esto significa que el calendario de riego si afectó la cantidad de sustancias de reserva ya que se regó durante el tiempo de espigado.

Agro-Inversiones (2009) señala que el periodo de espigado de cebada es de 76 a 80 dds correspondiendo a la información del calendario de riego analizado, de 0-49-78 dds. El análisis se reflejó en la diferencia en la cantidad de proteína de reserva de cada variedad de cebada, la cual se observa en la comparación de medias entre las cinco variedades del calendario de riego 1 (Cuadro 26), donde Esperanza fue la variedad que estadísticamente, presentó mayor cantidad de proteína expresada en mg de proteína por g de harina, (mg P/g H), en las cuatro fracciones (4.71 mg P/g H en albúmina, (7.11 mg P/g H) en globulina, (15.82 mg P/g H) en hordeína y (5.00 mg P/g H) en glutelina), igualándose con Armida en albúmina (4.77 mg P/g H) y Adabella en hordeína (16.13 mg P/g H) respectivamente. Alina presentó los valores estadísticamente menores en las fracciones de albúmina con (3.49 mg P/g H), globulina con (4.96 mg P/g H) y glutelina con (3.99 mg P/g H), coincidiendo con la comparación de medias del análisis conjunto de los dos calendarios de riego y los dos arreglos de siembra (Cuadro 25).

Cuadro 26. Cuantificación de proteínas entre cinco variedades de semilla de cebada en el calendario de riego 1 (CR1) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Variedades	Comparación de medias*			
	Cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina)			
	Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
Adabella	4.1056 ^c	6.0771 ^b	16.1338 ^a	4.2923 ^c
Alina	3.4990 ^d	4.9654 ^c	14.3790 ^b	3.9996 ^d
Armida	4.7730 ^a	5.9950 ^b	14.5716 ^b	4.0560 ^d
Esmeralda	4.5408 ^b	6.1433 ^b	11.3986 ^c	4.6647 ^b
Esperanza	4.7170 ^a	7.1125 ^a	15.8213 ^a	5.0011 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

En cambio, en el calendario de riego 2, el análisis de varianza (Cuadro 42, Anexo 6), de igual manera afectó en su mayoría a todas las fracciones proteicas de reserva de todas las variables, exceptuando en el arreglo de siembra (S) con la fracción albúmina, que se mostró no significativo. Los resultados se expresaron en la comparación de medias del Cuadro 27, donde Adabella es quien logró los valores estadísticamente más altos para las fracciones de globulina con (6.91 mg P/g H) aunque estadísticamente igual a Alina con (7.06 mg P/g H), hordeína (18.80 mg P/g H) y glutelina (5.91 mg P/g H), y en el caso de Esperanza y Armida fueron estadísticamente superiores en la fracción albúmina (5.28 mg P/g H y 5.15 mg P/g H respectivamente). Los menores valores presentados fueron por parte de Alina para albúmina con (4.48 mg P/g H), Esperanza para globulina con (5.92 mg P/g H) y Esmeralda para hordeína y glutelina con (15.79 y 5.22 mg P/g H) respectivamente. Quizá se debió a que el riego fue al inicio de la floración y durante la formación de las semillas (0-60-106 dds) ya que WWF España (2009) refiere que las etapas de máxima sensibilidad hídrica en cebada son dos semanas antes y dos semanas después del espigado pues influye en el rendimiento o aun en la calidad de la cosecha.

Cuadro 27. Cuantificación de proteínas entre cinco variedades de semilla de cebada en el calendario de riego 2 (CR2) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Variedades	Comparación de medias*			
	Cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina)			
	Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
Adabella	4.5293 ^c	6.9183 ^a	18.8044 ^a	5.9116 ^a
Alina	4.4846 ^c	7.0683 ^a	17.4438 ^b	5.0615 ^d
Armida	5.1535 ^{ab}	6.2675 ^b	16.4344 ^{cd}	5.7105 ^b
Esmeralda	5.0391 ^b	6.2611 ^b	15.7990 ^d	5.2245 ^d
Esperanza	5.2827 ^a	5.9233 ^c	16.8828 ^{bc}	5.4446 ^c

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

La comparación de medias entre los dos calendarios de riego (CR1 y CR2) para la cantidad de proteínas de reserva de las cinco variedades de cebada con los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras), se puede analizar en el Cuadro 28, donde los resultados del calendario de riego 2 fueron mayores para todas las fracciones (4.89 mg P/g H para albúmina, 6.48 mg P/g H para globulina, 17.07 mg P/g H para hordeína y 5.47 mg P/g H para glutelina), posiblemente porque tuvo mejor optimización de humedad al inicio de la floración y formación del grano. Este resultado coincide con lo señalado por Ramírez (2013), en el que menciona que el calendario de riego 2 fue mejor respecto al calendario de riego 1 para porcentaje de proteína cruda en base seca, probablemente a que se promovió una optimización de la humedad al inicio de la floración y formación de la semilla.

Cuadro 28. Cuantificación de proteínas de cinco variedades de semilla de cebada entre calendarios de riego (CR1 y CR2) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Calendario de riego	Cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina)*			
	Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
(0-49-78 dds)	4.3271 ^b	6.0586 ^b	14.4608 ^b	4.4027 ^b
(0-60-106 dds)	4.8978 ^a	6.4877 ^a	17.0728 ^a	5.4705 ^a

dds: días después de siembra; * Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

INIFAP (2013) menciona en una de sus investigaciones en frijol, que la ventaja de la siembra a 2 hileras con respecto a una sola, fue el uso intensivo de los insumos, como el agua, suelo y fertilizantes (importantes para la acumulación de proteínas de reserva), quien germinó más número de plantas por hectárea con la misma cantidad aplicada de insumos. En este caso, en lo que se refiere a la comparación de medias entre los dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) tomando en cuenta los dos calendarios de riego (CR1 y CR2) (Cuadro 29), el arreglo a 3 hileras presentó los valores estadísticamente más altos para las fracciones de globulina y hordeína, mientras que el arreglo a 2 hileras fue estadísticamente mayor en albúmina y ambos arreglos fueron iguales en la fracción de glutelinas.

Los resultados concluyen que el arreglo a 3 hileras tuvo un uso más eficiente de insumos, por lo que logró mayor formación de la fracción de proteína de reserva más importante en cebada, hordeína, lo que le dio una importante ventaja ante las siembra a 2 hileras.

Cuadro 29. Cuantificación de proteínas entre los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) de cinco variedades de semilla de cebada.

Arreglo de siembra	Cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina)*			
	Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
2 hileras	4.7977 ^a	5.9733 ^b	14.7677 ^b	4.9537 ^a
3 hileras	4.4272 ^b	6.5730 ^a	16.7659 ^a	4.9196 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

En la comparación de medias entre los dos arreglos de siembra de (2 y 3 hileras) en el calendario de riego 1 (Cuadro 30), los resultados mostraron que la cantidad de proteína en el arreglo a 2 hileras fue estadísticamente mayor en las fracciones albúmina (4.67 mg P/g H) y glutelina (4.79 mg P/g H), mientras que el arreglo a 3 hileras fue superior estadísticamente en las fracciones de globulina (6.14 mg P/g H) y hordeína (14.73 mg P/g H), pudiendo tener una ventaja relativa, ya que la suma de estas fracciones representan aproximadamente el 70% del total de proteínas de reserva según las medias de cada fracción.

Cuadro 30. Cuantificación de proteínas entre los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en dos calendarios de riego 1 (CR1) de cinco variedades de semilla de cebada.

Arreglo de siembra	Cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina)*			
	Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
2 hileras	4.6768 ^a	5.9716 ^b	14.1845 ^b	4.7937 ^a
3 hileras	3.9774 ^b	6.1456 ^a	14.7373 ^a	4.0118 ^b

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Siendo diferente el resultado en la comparación de medias de la cantidad de proteína en el calendario de riego 2 (Cuadro 31), a pesar de que en la fracción albúmina fueron estadísticamente iguales ambos arreglos de siembra, en las fracciones globulina (7.00 mg P/g H), hordeína (18.79 mg P/g H) y glutelina (5.82 mg P/g H) el arreglo a 3 hileras fue estadísticamente superior. Martínez (1996) afirma que las glutelinas y especialmente las albúminas y globulinas, son relativamente ricas en lisina así como en treonina, (aminoácidos esenciales para el cuerpo humano), por lo que le da ventaja al arreglo de siembra de 3 hileras.

Cuadro 31. Cuantificación de proteínas entre los arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en dos calendarios de riego 2 (CR2) de cinco variedades de semilla de cebada.

Arreglo de siembra	Cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina)*			
	Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
2 hileras	4.9186 ^a	5.9750 ^b	15.3510 ^b	5.1136 ^b
3 hileras	4.8771 ^a	7.0004 ^a	18.7947 ^a	5.8274 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

5.2.2 Comparación de actividad proteolítica entre variedades

La medición de la actividad proteolítica en cinco variedades de cebada se hizo durante el proceso de germinación, como lo hizo Dávila & Seidl (1992), durante la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. var. *Tacarigua*, en su investigación refiere que ocurre un aumento en la actividad proteolítica, sugiriendo que puede deberse a la presencia de una endopeptidasa (menciona Alquicira (2003) que es una enzima que hidroliza los enlaces peptídicos internos de una proteína, como tripsina y quimotripsina, dando como resultado cadenas de péptidos), por lo que cada variedad responde de diferente forma según su genotipo. En este caso, la cuantificación de la actividad proteolítica se puede ver en el Cuadro 43 (Anexo 7) donde se observa que en el análisis de varianza los resultados tuvieron altas diferencias estadísticas significativas entre variedades (V), durante el tiempo de germinación (C), la velocidad de hidrólisis de sustrato por variedad y la interacción entre variedades y tiempo de germinación (V*C).

Los efectos de las diferencias estadísticas entre las cinco variedades se aprecian en su comparación de medias (Cuadro 32), donde Esperanza mostró el valor promedio más alto (2.94 $\mu\text{mol pNA/min}$) y Alina logró el menor promedio (2.44 $\mu\text{mol pNA/min}$); mientras que en la comparación de medias durante el tiempo del proceso de germinación de las cinco variedades de cebada (Cuadro 33), se observó que entre las 60 y 72 horas todas las variedades tuvieron estadísticamente la mayor actividad proteolítica (3.05 $\mu\text{mol pNA/min}$ y 2.94 $\mu\text{mol pNA/min}$ respectivamente), aunque no existen diferencias estadísticas entre las 72 y 84 horas (2.83 $\mu\text{mol pNA/min}$), en cuanto a las 24 y 36 horas se percibió estadísticamente la menor actividad proteolítica (2.31 $\mu\text{mol pNA/min}$ y 2.39 $\mu\text{mol pNA/min}$). Los resultados muestran que al tercer día el proceso de germinación la semilla se encuentra en pleno movimiento de sustancias de reservas para alimentar al embrión y la respiración de las células alcanza su máximo punto (sustentado de igual forma por UBA (2002)), siendo la variedad Esperanza quien tuvo un proceso más rápido (Figura 28, Anexo 7).

Cuadro 32. Actividad proteolítica en cinco variedades de semilla de cebada durante el proceso de germinación.

Variedades	Calidad Bioquímica*
	Actividad proteolítica ($\mu\text{mol pNA /min}$)
Adabella	2.7390 ^b
Alina	2.4426 ^d
Armida	2.6116 ^c
Esmeralda	2.6645 ^c
Esperanza	2.9433 ^a

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Cuadro 33. Actividad proteolítica durante el tiempo del proceso de germinación en cinco variedades de semilla de cebada.

Tiempo germinación (h)	Calidad Bioquímica*
	de Actividad proteolítica ($\mu\text{mol pNA /min}$)
12	2.6585 ^{de}
24	2.3178 ^f
36	2.3905 ^f
48	2.6001 ^e
60	3.0591 ^a
72	2.9479 ^{ab}
84	2.8382 ^{bc}
96	2.6429 ^{de}
108	2.7557 ^{cd}
120	2.5913 ^e

* Medias con la misma letra de la columna indica que son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

En la Figura 19 se muestra la gráfica con la velocidad de actividad proteolítica de cada variedad ($\mu\text{mol pNA}/\text{min}$ contra las horas de germinación). Se aprecia que el comportamiento de cada curva de cada variedad es diferente; Adabella tiene dos puntos máximos de liberación (24 y 60 horas) siendo estas superiores a las demás variedades, coincidiendo a las 60 horas con las variedades Esmeralda y Esperanza, Armida tuvo el punto máximo a las 48 horas y Alina a las 72 horas de germinación, la razón de este comportamiento está implícita en su constitución genética, influyendo en su ciclo vegetativo. El comportamiento de la actividad proteolítica máxima durante el tiempo de germinación de las variedades Adabella, Armida, Esmeralda y Esperanza, coinciden con el ciclo vegetativo del cultivo, siendo Adabella, Esmeralda y Esperanza consideradas como intermedias y Armida como precoz; sin embargo, en el caso de la variedad Alina, su actividad máxima no coincidió con el patrón presentado para el caso de las demás variedades, dado que es clasificada como precoz y su punto máximo de actividad fue posterior (Figura 29, Anexo 7).

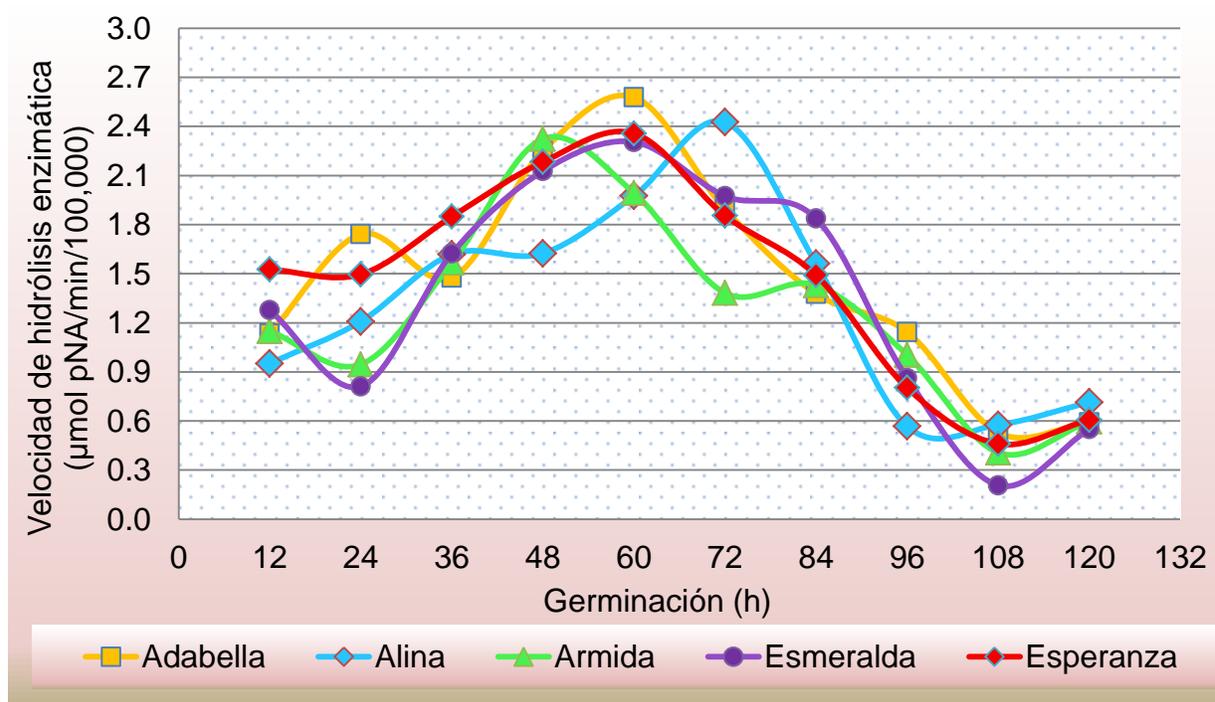


Figura 19. Velocidad de hidrólisis proteolítica de las cinco variedades de cebada

5.2.3 Patrones electroforéticos de las cinco variedades de cebada

De acuerdo con el patrón electroforético de proteínas de semilla de la variedad Adabella (Figura 20) durante el proceso de germinación hasta las 120 horas, se pueden apreciar 10 bandas de proteína bien definidas, la primera de 59.12 kDa (con una alta concentración de proteína debido a la intensidad y el grosor de la banda) la cual se muestra sin cambio aparente hasta las 36 horas; a partir de las 48 horas se observa degradación de dicha banda. Las bandas de 51.63 kDa y 43.41 kDa posiblemente no correspondan a proteínas de reserva debido a que están presentes durante todo el tiempo de germinación con la misma intensidad, el doblete de proteína presentado a la altura de 37.47 kDa es consumida y prácticamente desaparece a las 60 horas de germinación, la banda de 28.79 kDa se aprecia hasta las 120 horas, en tanto que las proteínas de 26.28 kDa, 23.82 kDa y 20.11 kDa se distinguen hasta las 60 horas, la banda de 13.93 kDa se muestra hasta las 96 horas y por último la proteína de 9.87 kDa se degrada en las primeras 48 horas (Anexo 8, Cuadro 44). La degradación de proteínas que este perfil electroforético coincide con la Figura 19 que muestra la mayor velocidad de hidrólisis proteolítica donde su mayor actividad fue a las 60 horas.

En la Figura 21 se muestra el patrón electroforético de proteínas de semilla de la variedad Alina en proceso de germinación, en él se aprecian 6 bandas definidas de 64.68 kDa, la cual aparece aun bien definida hasta las 120 horas, posiblemente se trate de una proteína que no es de reserva dado que no se degrada en el tiempo en que las demás proteínas fueron consumidas; las bandas de 45.46 kDa, 37.42 kDa, 30.23 kDa y 26.50 kDa se pueden apreciar hasta las 60 horas y por último la banda de 18.75 kDa desaparece a las 84 horas (Anexo 8, Cuadro 45).

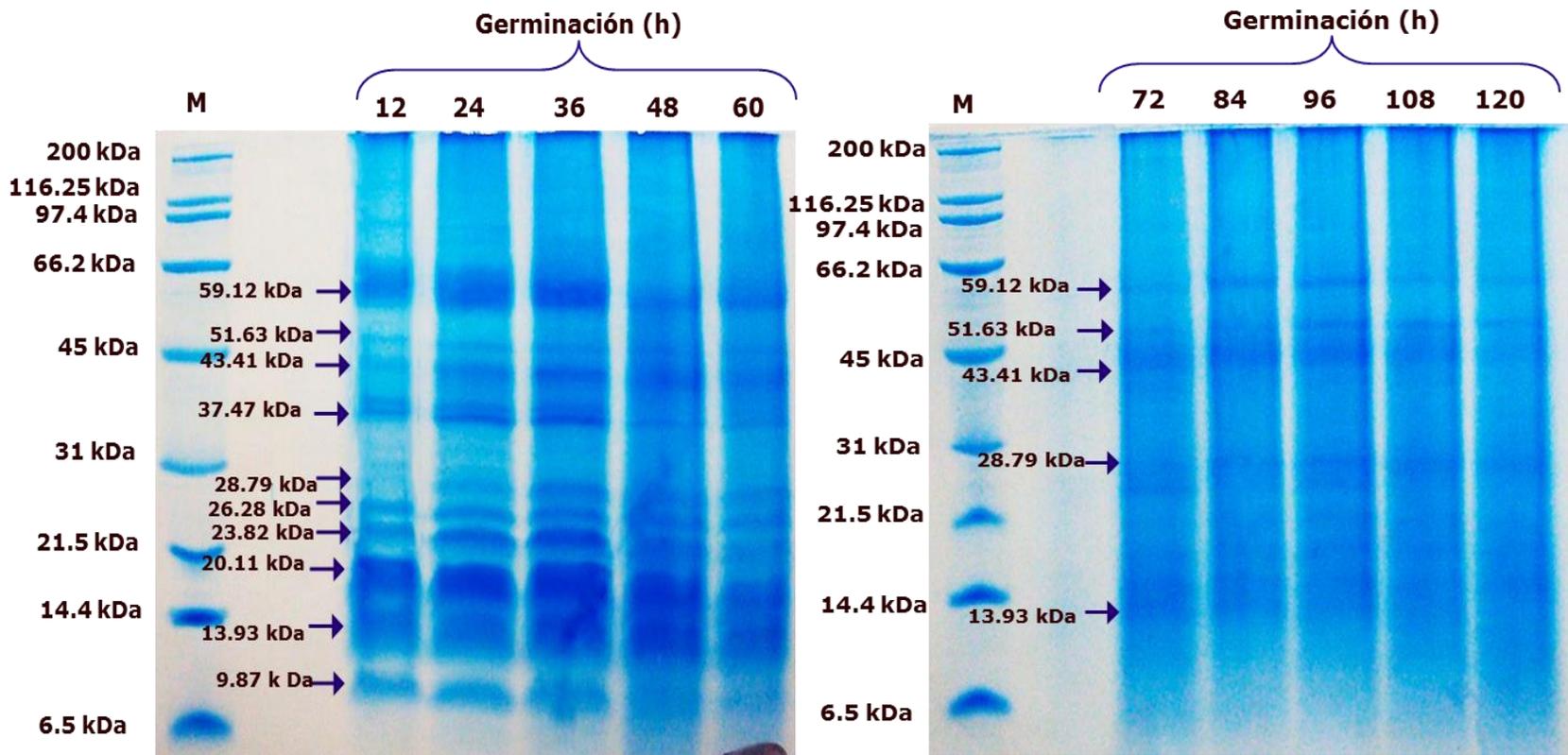


Figura 20. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Adabella; M: marcador de peso molecular

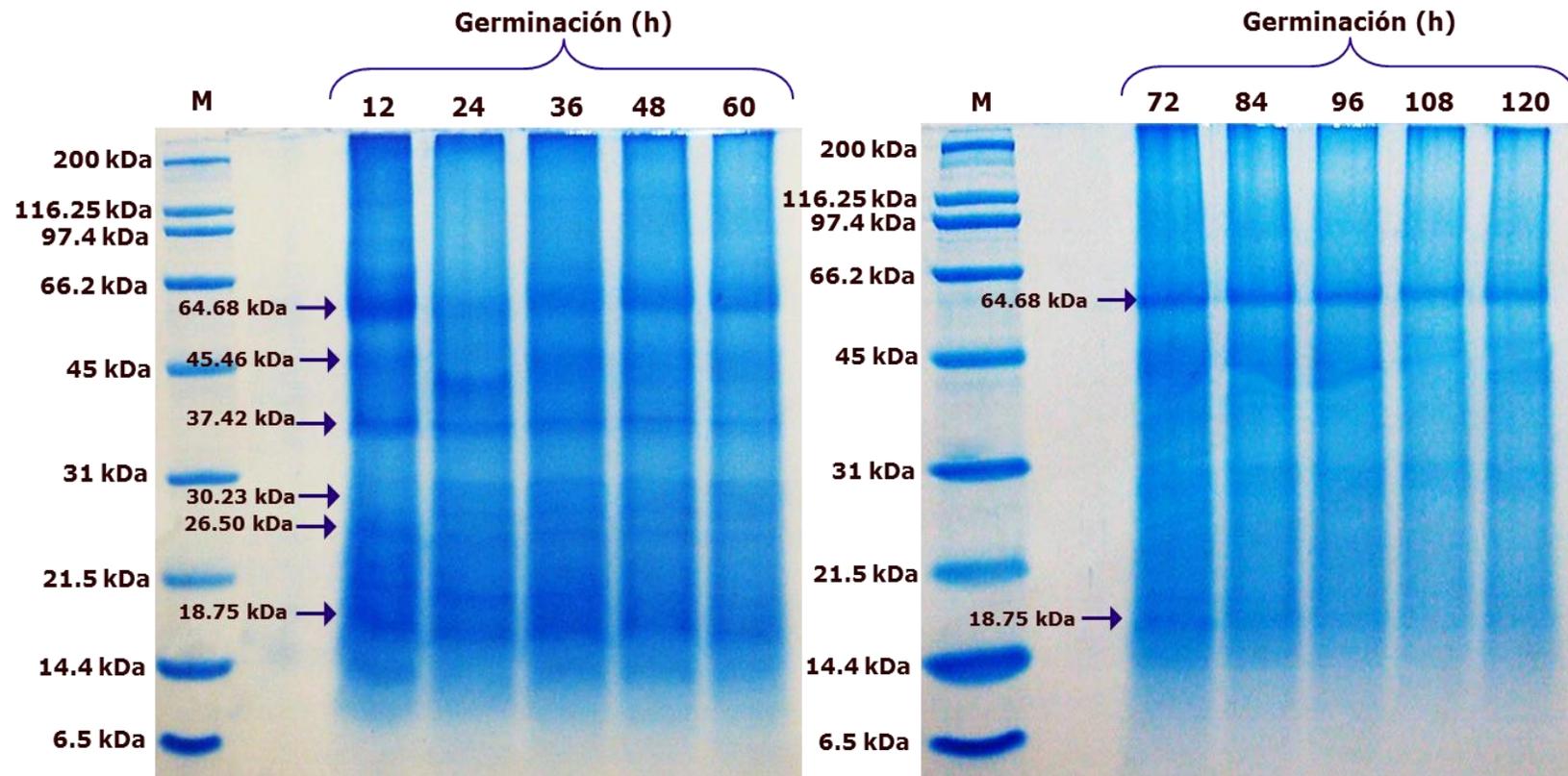


Figura 21. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Alina; M: marcador de peso molecular

El patrón electroforético de proteína de la semilla de la variedad Armida (Figura 22), en el que se muestran 11 bandas de proteína bien definidas, la banda de 123.55 kDa es de las primeras en ser degradada dado que solo permanece hasta las 36 horas, la banda de 87.22 kDa sólo aparece en las primeras 12 horas; la proteína de 59.94 kDa fue consumida casi en su totalidad en las primeras 48 horas, aunque aún se puede ver muy tenuemente hasta las 108 horas, existe una doblete de proteína de 44.58 kDa que se degrada en las primeras 48 horas, pero se visualiza sutilmente hasta las 120 horas, las bandas de 34.07 kDa, 28.34 kDa, 24.29 kDa, 22.44 kDa, 13.49 kDa y 9.98 kDa se desaparecen hasta las 60 horas y por último la proteína que aparece a la altura de 17.82 kDa extiende su presencia hasta las 84 horas de germinación. Como se puede percibir la mayoría de las proteínas de reserva fueron consumidas antes de 48 horas, coincidiendo con la Figura 19 donde se observa que su punto máximo de actividad proteolítica fue a las 48 horas (Anexo 8, Cuadro 46).

El patrón electroforético de las proteínas de reserva de semilla de la variedad Esmeralda (Figura 23) mostró 11 bandas bien definidas, la primera de 66.23 kDa se encuentra presente incluso después de las 120 horas, las bandas de 47.87, 42.42, 40.09, 24.92, 23.08 y 9.85 kDa se visualizaron hasta las 60 horas, se observó una banda de 45 kDa que se manifiesta con menor intensidad hasta las 120 horas, la banda de 31.04 kDa se presenta tenuemente hasta las 120 horas, la proteína de 19.55 kDa se percibió hasta las 108 horas y la banda de 13.96 kDa se muestra hasta las 96 horas de germinación. Se puede considerar que el patrón corresponde al punto de mayor actividad proteolítica (Figura 19), que fue a las 60 horas (Anexo 8, Cuadro 47).

El patrón electroforético de Esperanza presentó un patrón electroforético de proteína bien definido (Figura 24), con 9 bandas, la primera banda de 64.03 kDa se encuentra en gran proporción por la intensidad y grosor, consumiéndose en su totalidad a las 108 horas, las bandas que se presentaron a la altura de 45.26, 27.21, 25.46, 18.58 y 14.55 kDa se degradaron a las 108 horas mientras que las bandas de 35.20, 23.74 y 9.60 kDa se consumieron a las 60 horas de germinación (Anexo 8, Cuadro 48).

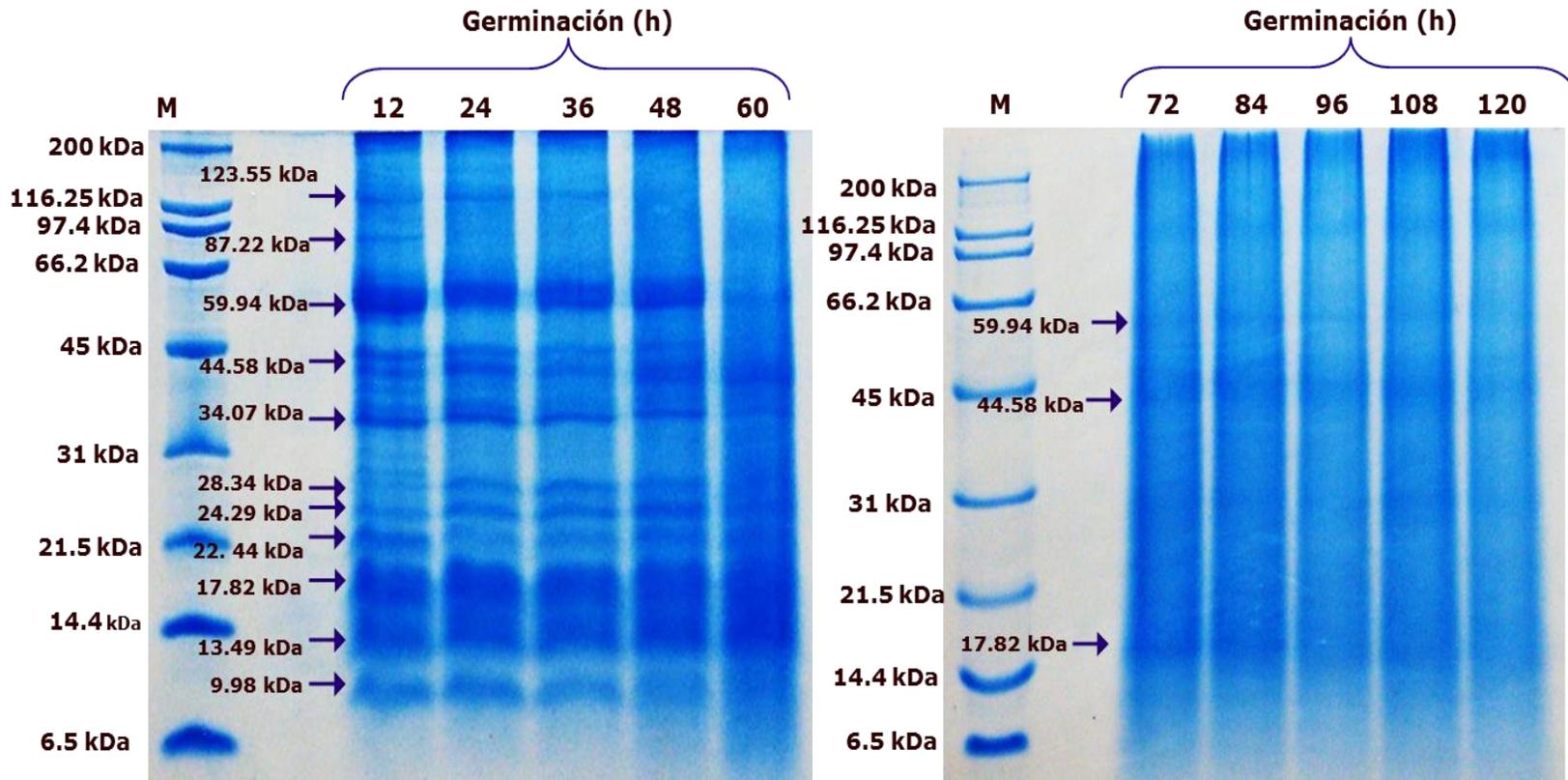


Figura 22. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Armida; M: marcador de peso molecular

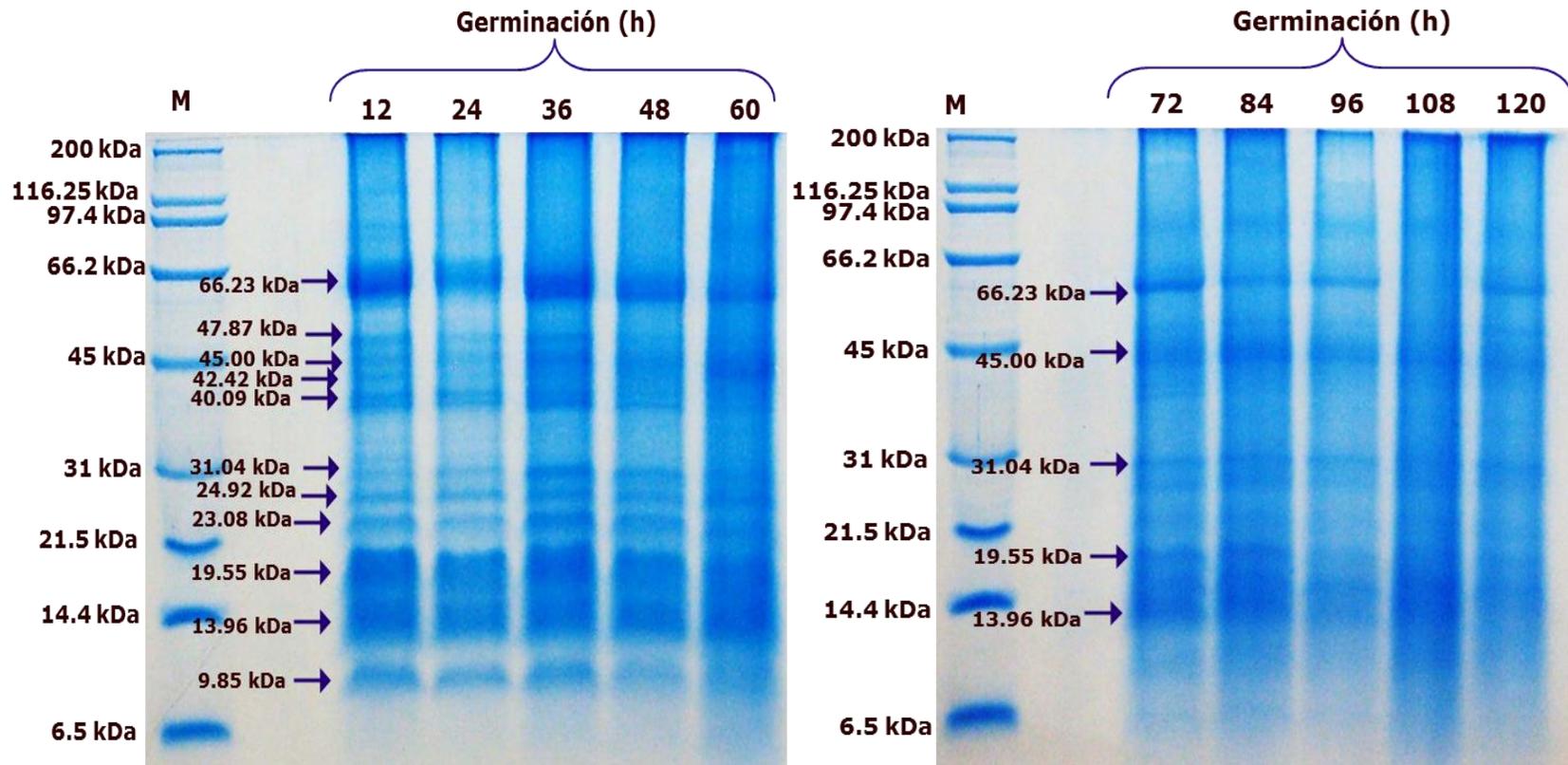
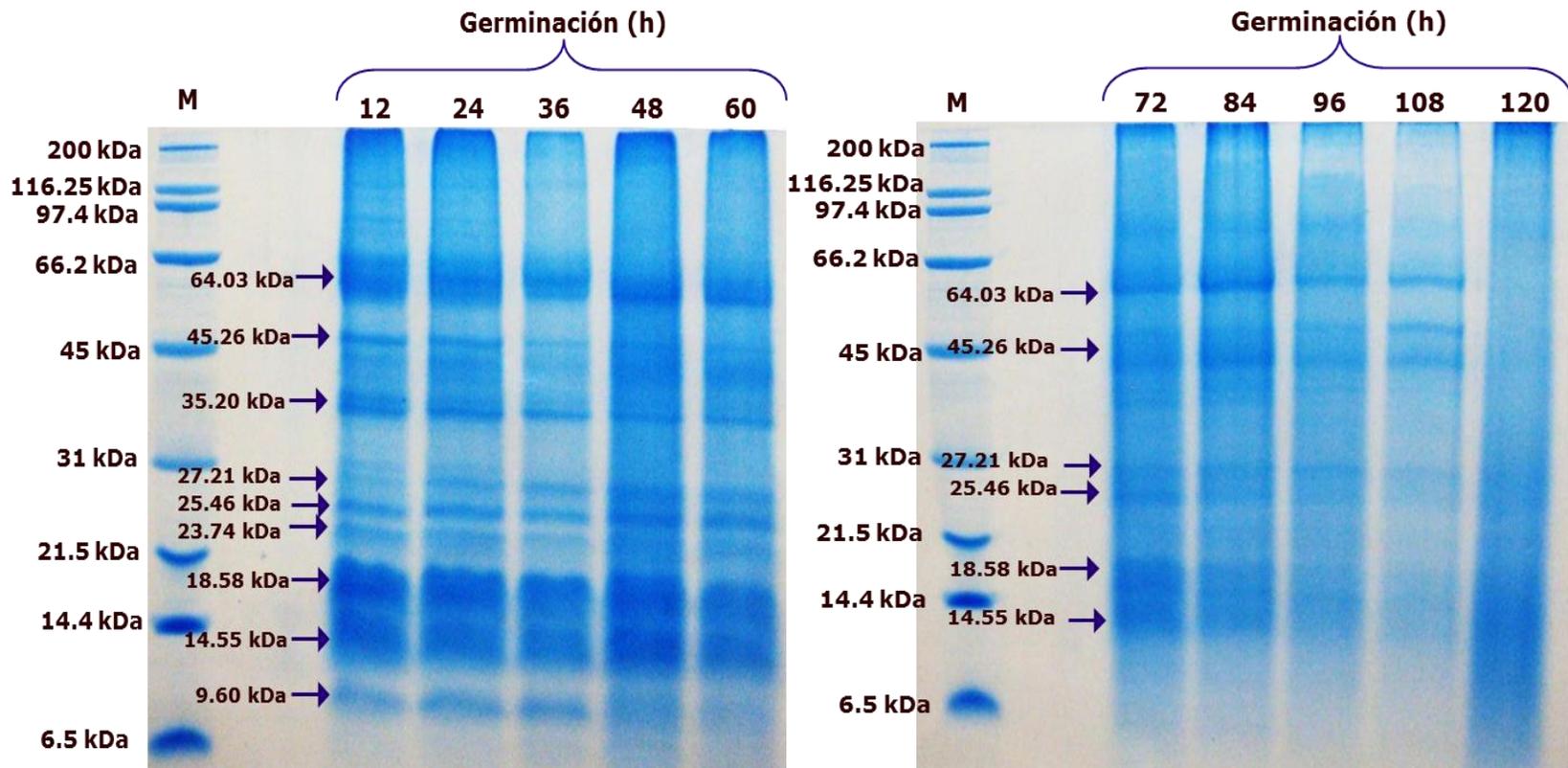


Figura 23. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Esmeralda; M: marcador de peso molecular

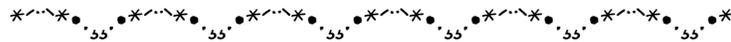


Z

Figura 24. Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de proteínas de semillas en proceso de germinación de la variedad Esperanza; M: marcador de peso molecular

Como se pudo observar las cinco variedades de semilla de cebada presentaron un patrón electroforético similar, con pequeñas diferencias suficientes como para identificarlas genéticamente, ya que cada variedad manifestó un número de bandas variado desde las primeras 12 horas (Adabella 10, Armida 11, Esmeralda 11 y Esperanza 9 bandas de proteína), todos por perfiles coincidieron en la presencia de algunas proteínas a una altura parecida como son las de 59 a 66, de 43 a 45, de 34 a 37, de 24 a 26, de 18 a 20 y de 9 a 10 kDa. Alina es la variedad que tuvo menos proteínas desde el principio (con 6 bandas de proteína).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



VI. CONCLUSIONES

Se encontró que Esperanza es la mejor en calidad física y fisiológica (seguida de Alina y Armida) al igual que en los parámetros bioquímicos (seguida de Adabella y Armida) de las cinco variedades de cebada estudiadas, ya que obtuvo los valores estadísticamente más altos en peso de mil semillas, en peso hectolítrico y en longitud de plúmula, así como mayor cantidad de proteína en las fracciones de albúmina, globulina, glutelina y en actividad proteolítica.

Existe una relación entre las características bioquímicas de la semilla de cebada durante el proceso de germinación con relación a los parámetros de calidad física y fisiológica, puesto que la variedad que demostró ser la más alta en la mayoría de las pruebas de calidad física y fisiológica, la cual fue Esperanza, lo fue también en sus características bioquímicas.

El patrón electroforético de las cinco variedades de cebada fue similar, desde las primeras 12 horas de germinación presentaron un número de bandas de proteína de reserva parecido: Armida y Esmeralda 11, Adabella 10 y Esperanza 9 bandas de proteína, coincidiendo el punto de consumo de estas proteínas con el punto máximo de actividad proteolítica de las cinco variedades de cebada (a las 60 horas de germinación). Alina es la variedad que tuvo menos bandas de proteínas desde el principio (con 6 bandas de proteína).

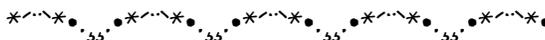
Todas las variedades fueron influenciadas por los calendarios de riego (Calendario de riego 1: 0-49-78 dds); Calendario de riego 2: 0-60-106 dds) en las pruebas de calidad física, fisiológica y bioquímica, tanto en sus análisis estadísticos individuales como en conjunto; sin embargo el calendario de riego 2 estadísticamente fue mejor que el calendario de riego 1 en peso de mil semillas, en peso hectolítrico y en la cantidad de proteína.

El arreglo de siembra no afectó la calidad fisiológica, sin embargo la siembra a 2 hileras fue estadísticamente superior en peso de mil semillas, en cantidad de proteína en la fracción albúmina y glutelina, en tanto que la siembra a 3 hileras favoreció estadísticamente una mayor cantidad de proteína en las fracciones de globulina y hordeína.

VII. RECOMENDACIONES

- De las variedades de El Bajío se recomienda la variedad Armida y Alina por sus altos rendimientos y Esperanza por obtener los valores estadísticamente más altos en los parámetros físicos, fisiológicos y bioquímicos obtenidos en este trabajo en comparación con las otras cuatro variedades
- Para Valles Altos, se recomienda la variedad Esmeralda con respecto a Adabella por ser superior estadísticamente en la mayoría de los parámetros físicos, fisiológicos y bioquímicos evaluados.
- Es importante desarrollar un programa de mejoramiento genético donde intervenga tanto productores como investigadores en cebada que cumpla con la calidad requerida para malta y de alto rendimiento para Valles Altos, tomando en consideración las variedades estudiadas en esta investigación.
- Continuar realizando pruebas más específicas (como electroforesis bidimensional o cromatografías) para identificación de las proteínas presentes en cebada, así conocer su cantidad y poder definir su grado de participación dentro de la semilla y determinar diferencias más específicas.

BIBLIOGRAFÍA



VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Advansta Corporation. (2011). Análisis de proteínas, Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección. *Manual de laboratorio de la empresa Advansta*.
- AGRO-INVERSIONES. (15 de Abril de 2009). *Manual de la cebada cervecera, Malta del Sur, (1-40)*. Obtenido de es.Scribd.com: <http://es.scribd.com/doc/14229542/Manual-Cebada>
- Aguado, S. G. (2008). *Informe Anual 2007-2008; Desarrollo de sistemas de cultivo de tejidos eficientes y reproducibles para la regeneración de plantas a partir de variedades élite de cebada*. Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Aguilar, Á. J., & Schwentesius, R. R. (2004). *La producción de cebada maltera en México-Ventaja comparativa no capitalizada*. Reporte de Investigación 72, Universidad Autónoma Chapingo, Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM).
- Albanil, E. A., Pascual, R. R., Cruz, R. L., & López, Q. M. (2012). *Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), Servicio Meteorológico Nacional*. Obtenido de Servicio Meteorológico Nacional, Reporte del clima en México, Reporte Anual 2012: <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/analisis/reporte/Anual2012.pdf>
- Alquicira, P. L. (2003). *Determinación de la especificidad de porteadas fúngicas en la hidrólisis de proteína*. México, D.F.: Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Álvarez, R. M. (2011). *Elaboración de una harina precocida a base de quinua y cebada germinadas*. Quito, Ecuador: Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Aníbal, G. N. (2011). *Brotado pre-cosecha y pre-germinado en cebada cervecera: predicción de la susceptibilidad del cultivo basada en el ambiente y manejo pos-cosecha de los granos dañados*. Buenos Aires, Argentina: Tesis doctoral, Cátedra de Cerealicultura, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- ASERCA. (1994). La cebada en la agricultura nacional, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). *Revista Claridades*,(13).

- Bartosik, R., Cardoso, L., & Piñeiro, E. D. (2011). Comparación de determinación de humedad de semillas de especies forrajeras por método de estufa y a través de instrumentos de medición electrónico por capacitancia. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA Balcarce*, 4.
- Bass, L. (1980). Seed viability during long-term storage. *Hort. Rev.*, 117-141.
- Bauzá, A. J. (2005). *La cebada cervecera y su aptitud industrial*. Obtenido de BSE-Banco de Seguros del Estado: <http://www.bse.com.uy/almanaque/Almanaque%201968/pdf/0%20-%20024.pdf>
- Bertoluzzo, M., Bertoluzzo, S., & Rigatuso, R. (2008). Estudio cinético de la actividad proteolítica de la enzima ficina. *ANALES AFA*, 20, 243-245.
- Bio-Rad. (2013). Bio-Rad Laboratories. *Protein Assay*. USA: Ficha técnica.
- Bishaw, Z., Niane, A., & Gan, Y. (2007). Quality Seed Production. En Yadav SS, McNeil DL. *Lentil. An Ancient Crop for Modern Times*, 349-383.
- Bradford, M. M. (29 de Enero de 1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*(72), 248-254.
- Bragachini, M., & Peiretti, J. (2009). *Proyecto de Eficiencia de Cosecha, Poscosecha de Granos y Forrajes, y Valor Agregado en Origen*. Obtenido de Comencemos sin pérdidas el camino hacia la industria: <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/cosecha/CebadaCervecer aFrancaExpansion.asp>
- Bustamante, Z. J. (2010). *Calidad física y fisiológica en semillas de híbridos de maíz de los valles altos centrales de México y su relación con el establecimiento en campo*. Montecillo, Texcoco, Estado de México: Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.
- Caballero, D. D. (2011). *Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el medio y largo plazo a nivel nacional*. SAGARPA.
- Carvajal, M. ., & Insuasti, A. . (2010). *Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (*Hordeum vulgare*) y yuca (*Manihot Esculenta Crantz*)*. Ibarra, Ecuador: Tesis de licenciatura, Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Escuela de Ingeniería Agroindustrial.

- Castañeda, S. M., López, C. C., Colinas, d. L., Molina, M. J., Hernández, L. A., ., & . (Abril de 2009). Rendimiento y calidad de la semilla de cebada y trigo en campo e invernadero. *SciELO - Scientific Electronic Library Online*, 34(4), 286-292.
- Castillo, S., Gutiérrez, J., Lucero, F., Briones, F., & Martínez, J. (2012). Comportamiento reproductivo de un hato Angus en el Bajío mexicano. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 16(3), 63-73.
- Castillo, Z. C. (2012). *Almacenamiento de semilla de cebada maltera: análisis físico, proximal y deterioro fisiológico*. Montecillo, Texcoco, Edo. de México: Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- CIMMYT. (2013). *Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo*. Obtenido de Sanidad de semillas: <http://www.cimmyt.org/es/sanidad-de-semillas>
- Consejo Mexicano de la Cebada Maltera, A. (2005). Consejo Mexicano de la Cebada Maltera, A.C. *Sistema Producto Cebada Maltera*.
- Dávila, P. M., & Seidl, D. S. (Enero-Marzo de 1992). Evaluación de los inhibidores de proteasas en *Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua durante la germinación. *BIOAGRO*, 4(1), 31-40.
- de la Vega, R. G. (mayo-agosto de 2009). Notas; Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 13(38), 27-32.
- EL Universal. (22 de julio de 2013). Modificación cupos para la importación de cebada y malta. *Diario El Universal*. Obtenido de <http://www.eluniversal.com.mx/finanzas-cartera/2013/modifican-cupos-para-importacion-cebada-malta-937595.html>
- Erlanger, B., K., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*(95), 271-278.
- FAO. (2011). Semillas en emergencia, Manual Técnico. *Estudio FAO Producción y Protección Vegetal 202, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*, 1-83.

- FAO STAT. (2012). *FAO STAT-Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de Datos por área temática: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>
- FENALCE. (2009). *FENALCE-Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas*. Obtenido de Cebada: http://www.fenalce.org/pagina.php?p_a=50
- Fernández, R. E., & Galván, C. A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Práctica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, 1-7. Campus Universitario de Rabanales.
- Fernández, V. Z. (2013). Nuevas variedades de cebada cervecera adaptadas a México. *4to Congreso Latinoamericano de Cebada* (págs. 1-23). Bahía Blanca, Argentina: <http://congresocebada.files.wordpress.com/2012/10/31-10-13-2-nuevas-variedades-de-cebada-cervecera-adaptadas-a-mc3a9xico.pdf>.
- Figueredo, R. (2008). Institución, Laboratorio de Genética Molecular. *Revista de la Bolsa de Comercio de Rosario*, 6-10.
- Flores, P. J. (2007). La cadena productiva cebada-malta-cerveza en México y la Ronda de Doha. *Comercio Exterior*, 57(7), 574-585.
- Franca, N., Krzyzanowski, F., Henning, A., West, S., Miranda, L., ., & . (1993). Soybean seed quality as affected by shriveling due to heat and drought stresses during filling. *SciELO - Scientific Electronic Library Online*, 107-116.
- Fundación Belén. (2013). *Celíacos/Enfermedad celiaca (intolerancia al gluten)*. Obtenido de Fundación Belén, Desde 1996 información y formación gratuitas para familias con hijos con problemas: <http://fundacionbelen.org/problemas/celíacos-enfermedad-celiaca-intolerancia-gluten/>
- Fundación Guanajuato Produce. (2004). *Cadena Agroalimentaria de Cebada, Plan Estratégico de Investigación y Transferencia de Tecnología; Estapa II: identificación de las demandas de tecnología de la cadena agroalimentaria de cebada*. Guanajuato, Gto.: Fundación Guanajuato Produce A.C.
- Gally, T. (Enero-Mayo de 2008). Mejoramiento de la Calidad de los Resultados en Laboratorios de Patología Vegetal. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(1), 79-82.
- Gan, Y., Stobbe , E., & Moes, J. (1992). Relative date of wheat seedling emergence and its impatc on grain yield. *Crop Sci*, 1275-1281.

- García, B. F. (2008). Tema 14: Reguladores del Crecimiento, 3. Las giberelinas. *Biología y botánica* (págs. 1-22). Unidad Docente de Botánica. ETSMRE, UPV.
- García, G. (2012). Desarrollo fenológico en trigo y cebada: principales etapas y generación de hojas, espiguillas y flores. *Curso Internacional - Red METRICE, Ecofisiología de Cereales de Invierno*, (págs. 1-53). Uruguay.
- García, M., Rharrabti, Y., Villegas, D., Royo, C., ., & . (2003). Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under mediterranean conditions Anontogenic approach. *Agron. J.*(95), 266-274.
- García, O. F. (2011). Las proteasas en el trigo y sus productos. *Sección técnica de Protector, Asociada a piensos españoles, S.A.; Castellana de Pienso S.A.*, 13-17.
- García, R., & Gámez, V. (2006). INIFAP, CE Bajío. *Producción de semilla de cebada maltera ciclo OI-06/07.*, 1-2.
- Garnero, S. (2006). *Calidad intrínseca de los granos en la poscosecha*. Argentina: Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Ed. Universidad Tecnológica Nacional.
- GENVCE^a (2012). Día de Campo. *GENVCE, Grupo para Evaluación de Nuevas Variedades de Cereales* (págs. 1-26). España: Departamento de cultivos extensivos, Grupo de cereales.
- GENVCE^b (2012). Evaluación agronómica y de la calidad de las nuevas variedades de cebada, trigo blando, trigo duro, triticale, avena y centeno híbrido en España; Resultados de la experimentación de nuevas variedades. Campaña 2011-2012. *GENVCE, Grupo de Evaluación de Nuevas Variedades de Cultivos Extensivos*, 1-85.
- Giambastiani, G., & Rubiolo, O. (03 de Septiembre de 2002). *Efecto del almacenaje y el secado sobre la calidad de los granos*. Obtenido de FCA-Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; (1-7):
<http://agro.uncor.edu/~ceryol/documentos/postcosecha/calidadalmacenamiento.pdf>
- Gimenez, F., & Tomaso, J. C. (2008). Evaluación de cultivares de cebada cervecera en Balcarce; Mejoramiento Genético de Cebada Cervecera INTA – EEA Bordenave. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA; Estación Experimental Agropecuaria Bordenave*, 4.

- Goñi, J., Lafarga, A., & Armesto, A. P. (Septiembre-Octubre de 2008). Experimentación de la campaña 2007-2008 del ITG (Innovación, Tecnología y Gestión) Agrícola. *Navarra Agrária*, 13-30.
- Goñi, J., Segura, A., Lafarga, A., Armesto, A., ., & . (Septiembre-Octubre de 2009). Nuevas variedades de cereal, Resultados de experimentación del ITG (Innovación, Tecnología y Gestión) Agrícola en la campaña 2008-2009. *Navarra Agrária*, 15-36.
- Hernández, B. J. (2006). Norma Oficial Mexicana, PROY-NOM-029-FITO-2002; Requisitos y especificaciones fitosanitarias aplicables a semillas para siembra, de importación. Ciudad de México, D.F.
- Hernández, G. A., & Carballo, C. A. (2007). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. *SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Subsecretaría de Desarrollo Rural; Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural*, 8.
- Impulsora Agrícola. (2011). Impulsora Agrícola S.A. de C.V. *Guía técnica 2011*. Cortazar, Guanajuato.
- INCA Rural. (06 de abril de 2005). *Plan Rector, Sistema Nacional Cebada*. Obtenido de Segunda Fase: Diagnostico inicial base de referencia estructura estrategica: <http://www.amsda.com.mx/PRNacionales/Nacionales/PRNcebada.pdf>
- INCAP. (2000). Selección, preparación y conservación de alimentos, CADENA, Contenidos Actualizados De Nutrición y Alimentación. *Guía técnica, Cereales y sus productos*. INCAP, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.
- INEGI. (2012). *Intituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI)*. Obtenido de Cuéntame... Información por entidad: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/default.aspx?tema=me>
- INIFAP^a (2013). *El Cultivo de Frijol de Riego a Doble Hilera en el Altiplano Potosino*. Obtenido de INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Tecnología No. 29: <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/tecnologiasdesc.php?id=106>
- INIFAP^b (12 de diciembre de 2013). *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)*. Obtenido de Política de Calidad Institucional: <http://www.inifap.gob.mx/SitePages/default.aspx>
- INKAPLUS. (2013). *Cebada*. Obtenido de <http://www.inkaplus.com/media/web/pdf/Cebada.pdf>

- ISTA. (1993). International rules for seed testing. *Rules. Seed Science and Technology*(21), 1-288.
- ISTA. (2004). International Seed Testing Association. *Interntional Rules for Seed Testing*, 72. Zurich, Switzerland: 2004.
- Lallana, V., & Lallana, M. (2001). Germinación y latencia. *Manual de Practicas de fisiología vegetal*, 59-69. Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNER.
- Lehninger, A. L. (1983). *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular* (Segunda ed.). (F. Calvet, Prats, & J. Bozal, Fes, Trans.) Barcelona: Ediciones Omega.
- López, P. P. (2011). *Efectos de microondas e infrarrojo en la calidad maltera de cebada (Hordeum vulgare L.)*. Querétaro, Querétaro: Tesis doctoral, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
- López, T. M. (1995). *Fitomejoramiento*. México, D.F.: Trillas, S.A. de C.V.
- MacGregor, A., & Batty, R. (1996). Barley. Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul*.
- Maldonado, A. A., & Jorrín, N. J. (2011). *Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de porteínas de hojas de Arabidopsis thaliana*. Obtenido de Universidad de Córdoba, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>
- Martínez, P. M. (1996). *Esstudio de dos métodos para el análisis de alfa amilasa en malta*. México: Tesis de licenciatura, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Mendoza, A. (julio de 2013). En México se triplica importación de cebada y anuncia Economía criterios para importación de cebada y malta. *Grupo MILENIO*. Obtenido de <http://monterrey.milenio.com/cdb/doc/noticias2011/59c559aceeedad0e4ac7d4b45cdc8d>
- Milenio. (30 de junio de 2012). *www.yucatanalamano.com*. Obtenido de Consuman la venta de Modelo a cervecera belga Anheuser Busch : <http://www.yucatanalamano.com/noticia/Nacional/Consuman-la-venta-de-Modelo-a-cervecera-belga-Anheuser-Busch.html>
- Moralejo, V. M. (1993). *Cebadas dísticas españolas (Hordeum vulgare L.): Filogenia, Bioquímica y aplicación potencial en programas de mejora*. Lleida, España:

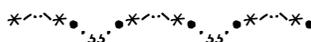
- Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Catalunya, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria de Lleida.
- Morales, R. I., Hernández, C. L., Gómez, M. R., Hernández, F. A., Moreno, L. S., Damián, H. M., . . . Gámez, G. H. (2010). *La cebada maltera en el Estado de Hidalgo; Manual Técnico*. Tulancingo de Bravo, Hidalgo., Hidalgo, México: PROMEP-SEP.
- Moreno¹, C. P. (1996). *Vida y obra de granos y semillas* (Primera ed.). México, D.F., D.F., México: SEP. Obtenido de Vida y obra de granos y semillas.
- Moreno², M. E. (1996). *Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas* (Tercera ed.). Ciudad Universitaria, México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Principios de Bioquímica, Lehninger* (Cuarta ed.). Barcelona: Ediciones Omega.
- Olivares, A. E. (6 de febrero de 2014). Realizan en la UNAM primer estudio a gran escala de las proteínas de la cebada. *Periódico La Jornada*, pág. 2.
- Olmos, B. G. (1990). *La roya amarilla de la cebada. Impulsora Agrícola S.A. de C.V.* México D.F.: 1-14.
- Ortega, J. F., De Juan, J. A., Tarjuelo, J. M., Merino, R., & Valiente, M. (1999). Modelo de optimización económica del manejo del agua de riego en las explotaciones agrícolas: aplicación a la agricultura de regadío de la provincia de Toledo. *Investigación agraria. Producción y protección vegetal*, 14(3), 325-354.
- Pasin, N., Santos, F., & Santos, M. (1991). Performace of bean seeds derived from plants subjected to water stress at two growth stages. *Pesq. Agropec. Bras.*, 183-192.
- Patiño, T. C. (2010). Variación somaclonal y selección in vitro con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1(1), 7-15.
- Paucar, M. D. (2013). Anatomía, Morfología y Fisiología de granos y semillas. *Tecnología de granos y semillas*, (págs. 3,5). Chimbote, Perú.
- Pérez, F. (2006). Germinación y dormición de semillas. En *Material Vegetal de Reproducción: Manejo, Conservación y Tratamiento* (págs. 177-200).

- Pérez, G. F., & Pita, V. J. (2000). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Hojas divulgadas Núm. 2113 HD*. Madrid, España.
- Pérez, P. J. (8 de Junio de 2010). *La cebada*. Obtenido de [www.blogger.com: http://lacebada10.blogspot.mx/2010/06/variedades-de-cebada.html](http://lacebada10.blogspot.mx/2010/06/variedades-de-cebada.html)
- Pérez, V. G. (6 de febrero de 2014). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)*. Obtenido de Historia, Dirección General de Sanidad Vegetal: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4146>
- Perry, D. A. (1977). A vigor test for seeds of barley (*Hordeum vulgare*) based on measurement of plumule growth. *Seed Science and Technology*(5), 709-719.
- Ponce, d. L. (2005). *El peso hectolítrico en la comercialización del trigo*. Montevideo, Uruguay: Almanaque del Banco de Seguros del Estado.
- Prieto, M. J., Prieto, G. F., Hernández, C. N., Domínguez, S. J., Román, G. A., & . (26 de Abril de 2011). Métodos comparativos del poder germinativo en *Hordeum distichon* L. calidad maltera. *Multiciencias, Núcleo punto fijo-Universidad del Zulia; Ciencias del Agro y Mar*, 11(2), 121-128.
- Prieto, M. J., Prieto, G. F., Román, G. A., & Acevedo, S. O. (2012). Análisis proximal del cultivo de cebada maltera (*Hordeum sativum* Jess) del sur del estado de Hidalgo y su relación con la calidad de suelos. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(2), 447-455.
- Ramírez, N. U. (2013). *Efecto del arreglo de siembra en la producción y calidad de semilla de cebada maltera (Hordeum vulgare L.)*. Celaya, Guanajuato: Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Roque.
- Rodríguez, F. E., Zumalacárregui, J. M., Otero, C. A., Calleja, S. A., & de la Fuente, C. L. (2003). Lo que debe saber sobre: Los alimentos transgénicos (y organismos manipulados genéticamente). *Caja España, Obra social*(14), 1-70.
- SAGARPA. (15 de junio de 2007). *Orden Jurídico Nacional; Servicio de la Unidad General de Asuntos Jurídicos*. Obtenido de Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas; Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA): <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/Combo/L-236.pdf>
- SAGARPA. (12 de julio de 2012). *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA*. Obtenido de Principal proveedor de cebada de la industria cervecera nacional adopta MasAgro: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2012B318.aspx>

- Santoyo, C. E., & Quiroz, M. J. (2004). Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México, ICAMEX. *Guía para el cultivo de cereales en el Estado de México, 1*, 9-37. (R. Arias, Mora, Ed.) Metepec, Estado de México, México.
- Sarría, A. (2003). Capítulo 6, Bioquímica nutricional de las proteínas . En *Bioquímica nutricional* (págs. 61-71).
- Schagger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, *Noviembre*(166), 368-379.
- Secretaría de Economía. (2003). Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-cereal-cebada maltera-(*Hordeum vulgare* L. Y *Hordeum distichum* L.)-especificaciones y métodos de prueba. *NMX-FF-043-SCFI-2003*, 1-36. <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2003/nmx-ff-043-scfi-2003.pdf>.
- SIACON. (2013). *SIACON-Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta*. Obtenido de Producción anual y mensual, comercio exterior, mercados nacionales e internacionales y cultivo de interés en México: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=20
- SNICS. (01 de marzo de 2013). *Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS)*. Obtenido de ¿Qué es el SNICS?: <http://snics.sagarpa.gob.mx/somos/Paginas/quienes-somos.aspx>
- Suaste, F. M., Solís, M. E., Ledesma, R. L., de la Cruz, G. M., Grageda, C. O., & Báez, P. A. (febrero-marzo de 2013). Efecto de la densidad y método de siembra en el rendimiento de grano de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el Bajío, México. *Agrociencia*, *47*(2), 159-170.
- Tamayo, B. F. (2011). *Evaluación del contenido de ácido fítico y su relación con la biodisponibilidad de minerales, proteínas y lisina en líneas avanzadas y/o variedades de cebada procesada y no procesada*. Biobamba, Ecuador: Tesis de licenciatura, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Torres, G. H., & Lazcano, F. I. (2002). Disminución de "acame" y aumento de rendimiento de cebada con una nutrición balanceada. Villa Corregidora, Querétaro, México. Obtenido de [http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/\\$webindex/E731CFD02A8C2F0C06256B840066BCC9/\\$file/Disminuci%C3%B3n+de+Acame+y+aumento+de+rendimiento+de+cebada+con+una+nutrici%C3%B3n+balanceada.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/iamex.nsf/$webindex/E731CFD02A8C2F0C06256B840066BCC9/$file/Disminuci%C3%B3n+de+Acame+y+aumento+de+rendimiento+de+cebada+con+una+nutrici%C3%B3n+balanceada.pdf)

- UBA. (2002). *Germinación*. Obtenido de Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (UBA): <http://www.agro.uba.ar/users/jgori/Clases/TG.pdf>
- Urbano, T. P., Barretto, C. V., & Vares, L. (1996). Determinación de la calidad cervecera de la cebada mediante electroforesis SDS-PAGE. *Agricultura*, 144-146.
- Weber, K., & Osborn, T. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 4406-12.
- WWF España. (Octubre de 2009). *Manual de buenas prácticas de riego, Propuestas de WWF para un uso eficiente del agua en la agricultura*. Obtenido de WWF España: http://awsassets.wwf.es/downloads/buenas_practicas_de_riego.pdf
- Zamora Díaz, M., Solano, H. S., Gámez, V. F., García, R. J., Gámez, V. A., & . (2007). Armida nueva variedad de cebada maltera para riego. *Memoria de la Segunda Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal. INIFAP*.
- Zamora, D. M., Solano, H. S., Gámez, V. F., García, R. J., ., & . (2006). Sistema Producto. *Adabella, variedad de cebada maltera para los valles altos de la mesa central de México*. Celaya, Guanajuato: Fichas tecnológicas.

ANEXOS



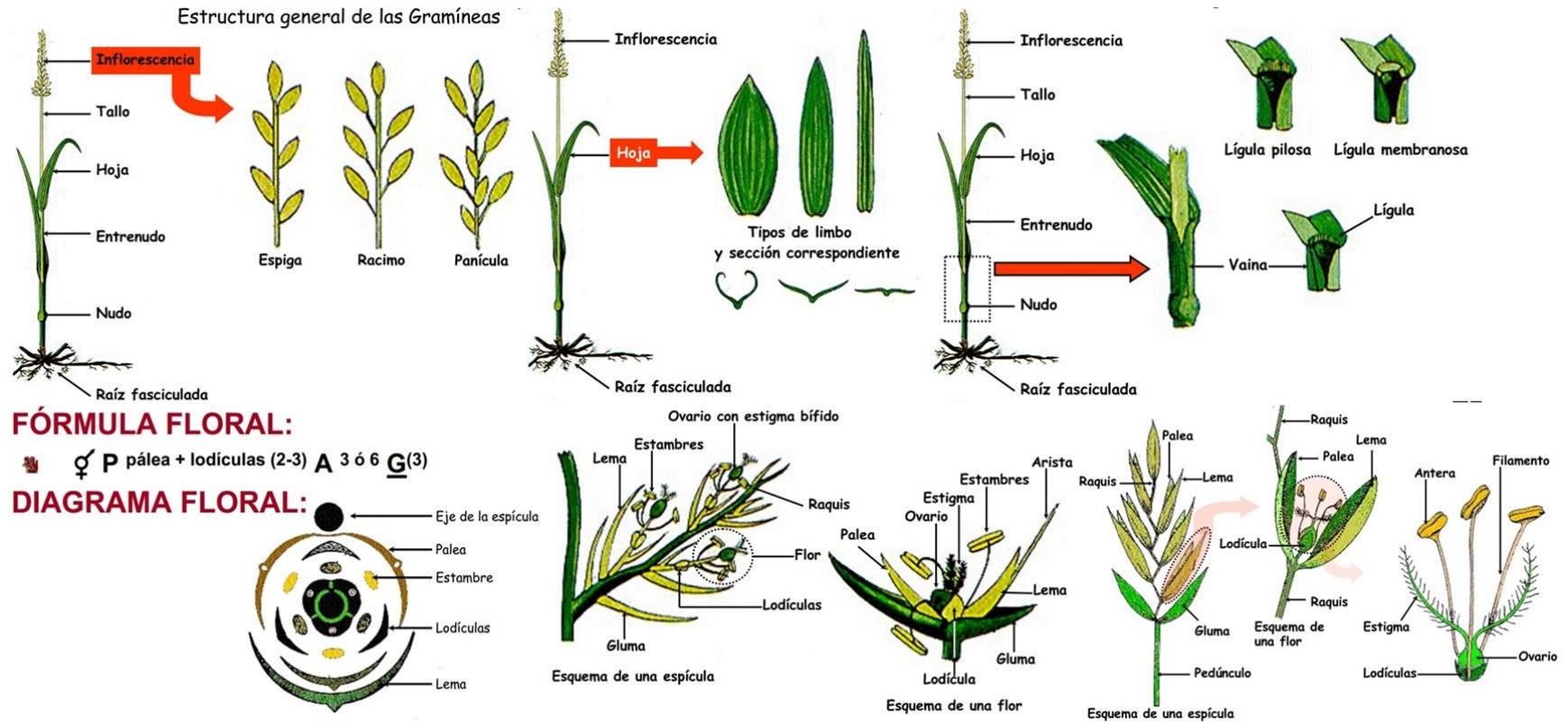
IX. ANEXOS

Anexo 1. Terminología empleada

A.C.	Antes de cristo
Abs	absorbancia
BAPNA	α -N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida
BSA	albúmina de suero bovino
CR1	calendario de riego 1
CR2	calendario de riego 2
dds	días después de siembra
DMSO	dimetilsulfóxido
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	gramos
ha	hectárea
IASA	Impulsora Agrícola
INCA Rural	Instituto Nacional para el Desarrollo de Capacidades del Sector Rural
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
ISTA	International Seed Testing Association, Asociación Internacional de Análisis de Semillas
K	potasio
Kcal	Kilocalorías
kDa	kilodaltones
L.	Lineo
mg	miligramos
mm	milímetros
mM	mili molar
msnm	metros sobre el nivel del mar
N	nitrógeno

P	fósforo
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pNA	p-nitroanilina
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SE	Secretaría de Economía
SNICS	Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
ton	toneladas
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3 –propanodiol
μl	microlitros

Anexo 2. Estructura general de las gramíneas



Anexo 3. Fuentes de variación y grados de libertad para el análisis de varianza

Cuadro 34. Fuentes de variación y grados de libertad para el análisis de varianza, tipo de las pruebas físicas (peso de mil semillas y peso hectolítrico), fisiológicas (porcentaje de germinación estándar y longitud de plúmula) y para la cuantificación de proteínas de las cinco variedades de semilla de cebada con un diseño completamente al azar.

Fuentes de variación	Grados de libertad
Calendarios de riego (R)	$R-1 = 1$
Variedades (material biológico) (V)	$V-1 = 4$
Arreglo de siembra (hileras) (S)	$S-1 = 1$
$R * V$	$(R-1) (V-1) = 4$
$R * S$	$(R-1) (S-1) = 1$
$S * V$	$(S-1) (V-1) = 4$
$R * S * V$	$(R-1) (S-1) (V-1) = 4$

Cuadro 35. Fuentes de variación y grados de libertad para el análisis de varianza, tipo de la cuantificación de actividad proteolítica ($\mu\text{mol pNA}/\text{min}$) de cinco variedades de semilla de cebada con un diseño completamente al azar.

Fuentes de variación	Grados de libertad
Variedades (material biológico) (V)	$V-1 = 4$
Tiempo de germinación (horas) (C)	$C-1 = 9$
Velocidad de hidrólisis (minutos) (T)	$T-1 = 6$
$V * C$	$(V-1) (C-1) = 36$
$V * T$	$(V-1) (T-1) = 24$
$C * T$	$(C-1) (T-1) = 54$
$V * C * T$	$(V-1) (C-1) (T-1) = 216$

Anexo 4. Modo de preparación del marcador estándar para electroforesis en geles de poliacrilamida

Para ello se preparó una solución amortiguadora de muestra de amplio rango descrita en el Cuadro 36.

Cuadro 36. Amortiguador de muestra de amplio rango

Reactivos	Cantidad
Agua destilada	4.8 ml
Tris** ¹ -HCl 0.5 M pH 6.8	1.2 ml
Glicerol ² grado reactivo	1 ml
SDS* ³ 10%	2 ml
Azul de bromo fenol ⁴ 0.1%	0.5 ml

*Dodecil sulfato sódico; **hidroximetilaminometano; ^{1,4}USB®; ²J.T.Baker®; ³GibcoBRL®ultraPURE™

Del amortiguador de muestra de amplio rango se tomó 475 µl y se agregó 25 µl β-mercapto-etanol grado reactivo (Aldrich®), a partir de esta solución, se emplearon 100 µl y se le añadió 5 µl de marcador estándar de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad®) para posteriormente pasar el marcador por 5 min en baño María y conservarlo a -4°C.

Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) de las pruebas de calidad física y fisiológica

Cuadro 37. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza conjunto en las pruebas de calidad física y fisiológica en semillas de cinco variedades de cebada en dos calendarios de riego (CR1 Y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras).

Fuente de Variación	GL	Cuadrados medios ^a			
		Peso de mil semillas	Peso hectolítrico	Porcentaje de germinación estándar	Longitud de plúmula
Calendario de riego (R)	1	88.0362**	97.2493**	6.0500 ^{ns}	0.0644 ^{ns}
R (rep)	6	1.0185	2.4459	3.3166	0.0179
Variedad (V)	4	135.8423**	56.5151**	16.8250**	9.7359**
Arreglo de siembra (S)	1	5.5714*	2.4040 ^{ns}	2.4500 ^{ns}	0.0009 ^{ns}
R * V	4	4.7379*	5.3131 ^{ns}	12.1750**	0.0691 ^{ns}
R * S	1	14.8126**	6.0324 ^{ns}	36.4500**	0.4851**
S * V	4	8.1596**	9.3214*	15.8250**	0.5318**
R * S * V	4	4.3491*	4.7079 ^{ns}	6.5750 ^{ns}	0.1340*
Error	54	1.3420	2.6824	2.7240	0.0372
CV [§] (%)		2.6165	2.4748	1.6811	5.9427

^a *, ** Indica significancia estadística al nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad, respectivamente; ^{ns} Indica no significativo; [§]CV: Coeficiente de Variación.

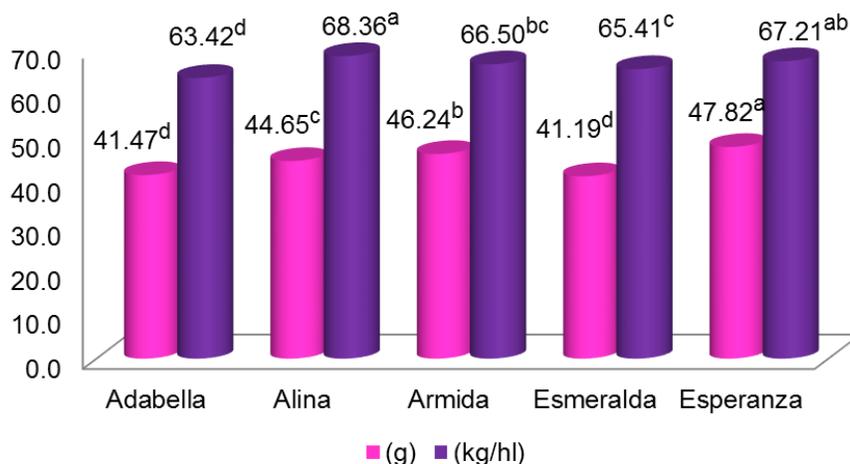


Figura 25. Comparación de medias de peso de mil semillas (g) y peso hectolítrico (kg/hl) entre las cinco variedades de cebada

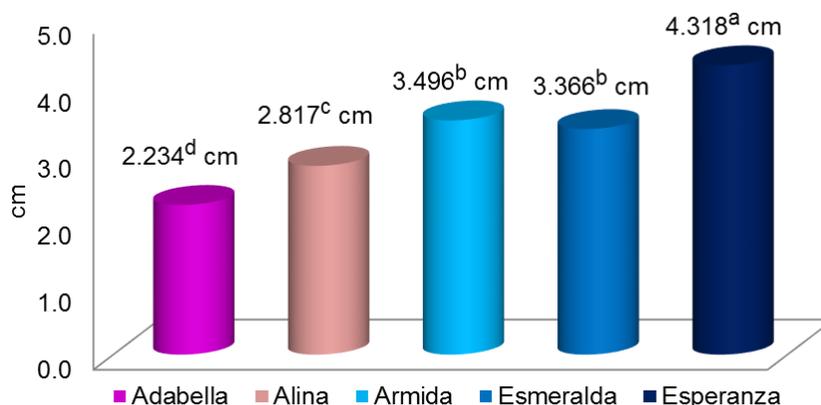


Figura 26. Comparación de medias entre las cinco variedades de cebada en vigor (longitud de plúmula en cm)

Cuadro 38. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 1 (CR1) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las pruebas de calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados medios ^a			
		Peso de mil semillas	Peso hectolítrico	Porcentaje de germinación estándar	Longitud de plúmula
Arreglo de siembra (S)	1	19.2765 ^{**}	8.0263 ^{ns}	10.0000 ^{ns}	0.2640 ^{**}
Variiedad (V)	4	93.1045 ^{**}	30.0107 ^{**}	22.4000 ^{**}	4.1606 ^{**}
S * V	4	4.5914 [*]	9.3920 [*]	12.0000 [*]	0.2971 ^{**}
Error	30	1.4083	2.8744	3.3333	0.0304
CV ^S (%)		2.7454	2.6052	1.8649	5.4202

^a *, ** Indica significancia estadística al nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad, respectivamente; ^{ns} Indica no significativo; ^SCV: Coeficiente de Variación.

Cuadro 39. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 2 (CR2) en dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) de las pruebas de calidad física y fisiológica en cinco variedades de cebada.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados medios ^a			
		Peso de mil semillas	Peso hectolítrico	Porcentaje de germinación estándar	Longitud de plúmula
Arreglo de siembra (S)	1	1.1075 ^{ns}	0.4100 ^{ns}	28.9000 ^{**}	0.2220 [*]
Variedad (V)	4	47.4757 ^{**}	31.8175 ^{**}	6.6000 [*]	5.6445 ^{**}
S * V	4	7.9172 ^{**}	4.6373 ^{ns}	10.4000 ^{**}	0.3688 ^{**}
Error	30	1.2110	2.4432	2.2333	0.0401
CV [§] (%)		2.4280	2.3232	1.5179	6.1200

^a *, ** Indica significancia estadística al nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad, respectivamente; ^{ns} Indica no significativo; [§]CV: Coeficiente de Variación.

Anexo 6. Análisis de varianza (ANOVA) en la cuantificación de proteínas de reserva

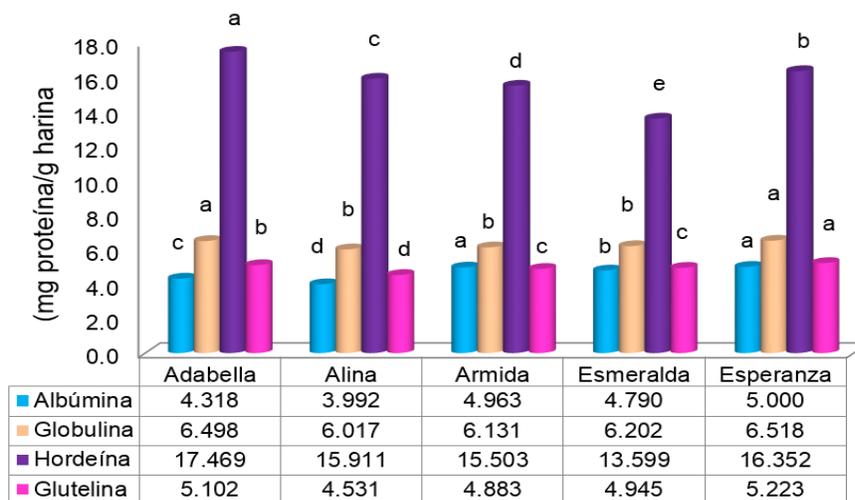


Figura 27. Comparación de medias de cuantificación de proteínas de reserva (mg proteína/g harina) de cada fracción proteica entre las cinco variedades de cebada

Cuadro 40. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza conjunto de dos calendarios de riego (CR1 y CR2) y dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en la cuantificación de proteínas de semilla de cinco variedades de cebada.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados medios ^a			
		Cuantificación de proteínas de reserva			
		Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
Calendario riego (R)	1	6.5156**	3.6825**	136.4508**	22.8028**
R (rep)	6	0.0303	0.0569	0.4356	0.0239
Variedad (V)	4	3.1074**	0.8048**	32.1232**	1.1083**
Arreglo siembra (S)	1	2.7450**	7.1928**	79.8600**	0.0232 ^{ns}
R * V	4	0.2352**	5.7118**	6.3721**	1.2962**
R * S	1	2.1638**	3.6244**	41.7865**	11.1863**
S * V	4	2.9749**	4.5510**	104.6697**	1.9560**
R * S * V	4	2.1906**	10.5405**	54.4744**	1.7740**
Error	54	0.0141	0.0414	0.1433	0.0145
CV ^S (%)		2.5775	3.2443	2.4010	2.4397

^a *, ** Indica significancia estadística al nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad, respectivamente; ^{ns} Indica no significativo; ^SCV: Coeficiente de Variación.

Cuadro 41. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 1 (CR1) y de dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en la cuantificación de proteínas de cinco variedades de cebada.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados medios ^a			
		Cuantificación de proteínas de reserva			
		Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
Arreglo de siembra (S)	1	4.8916**	0.3027*	3.0558**	6.1144**
Variedad (V)	4	2.2626**	4.6347**	28.0909**	1.4432**
S * V	4	4.2888**	12.8343**	71.4159**	0.3474**
Error	30	0.0116	0.0649	0.1370	0.0166
CV ^S (%)		2.4990	4.2062	2.5604	2.9296

^a *, ** Indica significancia estadística al nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad, respectivamente; ^{ns} Indica no significativo; ^SCV: Coeficiente de Variación.

Cuadro 42. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza en el calendario de riego 2 (CR2) de dos arreglos de siembra (2 y 3 hileras) en la cuantificación de proteínas de reserva de cinco variedades de cebada.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados medios ^a			
		Cuantificación de proteínas de reserva			
		Albúmina	Globulina	Hordeína	Glutelina
Arreglo de siembra (S)	1	0.0172 ^{ns}	10.5144 ^{**}	118.5906 ^{**}	5.0951 ^{**}
Variedad (V)	4	1.0799 ^{**}	1.8819 ^{**}	10.4044 ^{**}	0.9613 ^{**}
S * V	4	0.8766 ^{**}	2.2572 ^{**}	87.7283 ^{**}	3.3827 ^{**}
Error	30	0.0198	0.0210	0.2080	0.0142
CV [§] (%)		2.8748	2.2341	2.6714	2.1834

^a *, ** Indica significancia estadística al nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad, respectivamente; ^{ns} Indica no significativo; [§]CV: Coeficiente de Variación.

Anexo 7. Análisis de varianza (ANOVA) en la cuantificación de actividad proteolítica

Cuadro 43. Cuadrados medios, grados de libertad y nivel de significancia estadística del análisis de varianza, en la cuantificación de actividad proteolítica de semilla de cinco variedades de cebada.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados medios ^a
		Cuantificación de actividad proteolítica
Variedades (V)	4	14.0821 ^{**}
Tiempo de germinación (C)	9	11.1370 ^{**}
Velocidad de hidrólisis (T)	6	7.4445 ^{**}
V * C	36	0.9692 ^{**}
V * T	24	0.0074 ^{ns}
C * T	54	0.1240 ^{ns}
V * C * T	216	0.0058 ^{ns}
Error	1750	0.1470
CV [§] (%)		14.3085

^a *, ** Indica significancia estadística al nivel 0.05 y 0.01 de probabilidad, respectivamente; ^{ns} Indica no significativo; [§]CV: Coeficiente de Variación

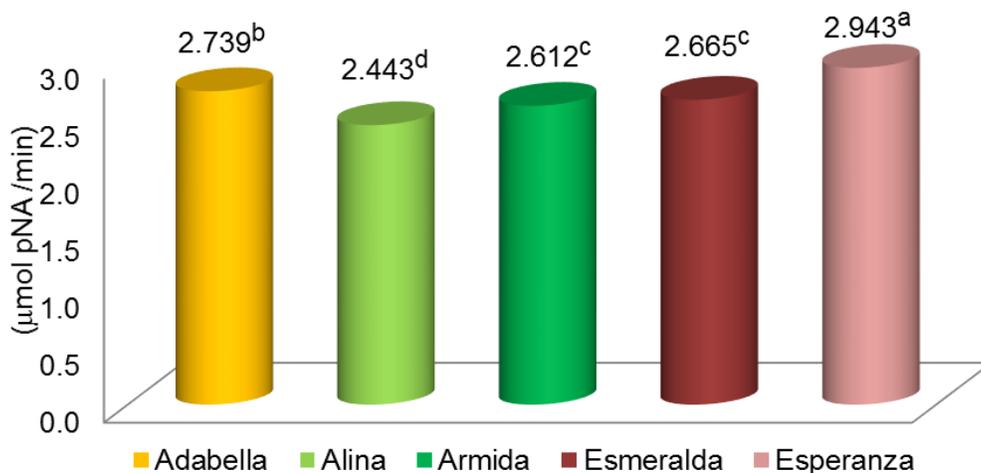


Figura 28. Comparación de medias de cuantificación de actividad proteolítica (μmol pNA /min) entre las cinco variedades de cebada

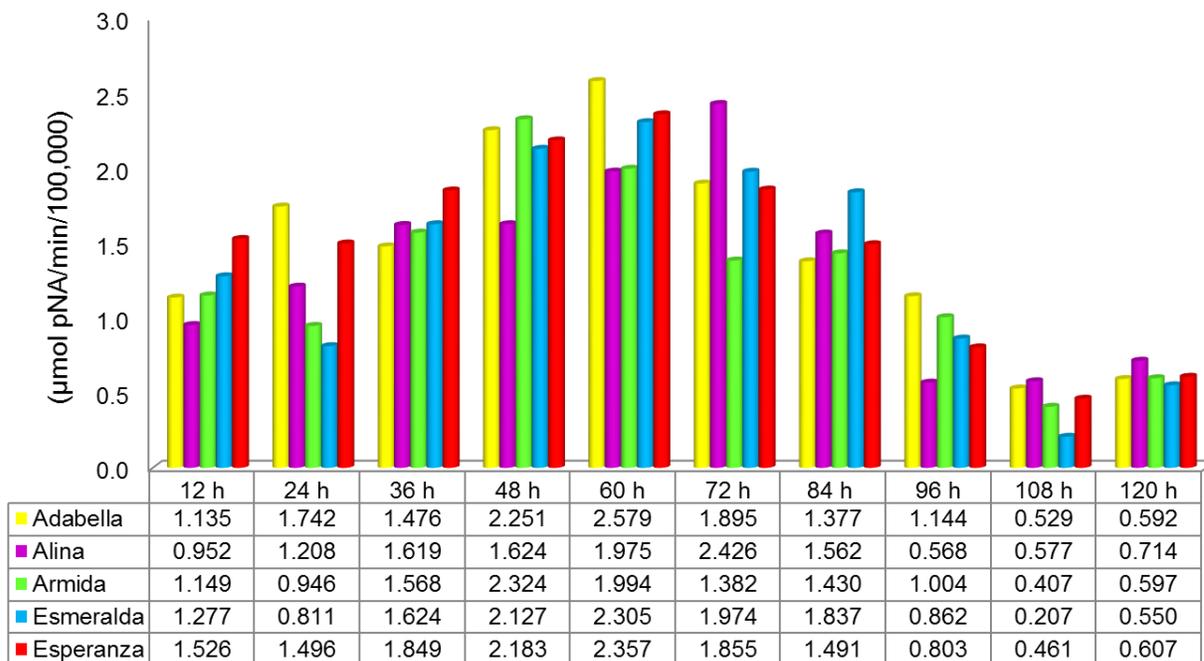


Figura 29. Comparación de medias de la velocidad de hidrólisis enzimática (μmol pNA/min/100,000) durante en proceso de germinación (120 horas) entre las cinco variedades de cebada

Anexo 8. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en los patrones electroforéticos

Cuadro 44. Calculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Adabella

Cálculos para obtener peso molecular de los patrones electroforéticos							
PM (kDa) marcador	Distancia bandas marcador (mm)	Rf	log PM	Distancia bandas muestra (mm)	Rf	Ecuación polinómica orden 3	PM (kDa) de bandas del gel de poliacrilamida
200.00	1	0.017	5.298	12.000	0.200	4.080	59.125
116.25	5	0.083	4.756	14.000	0.233	3.944	51.630
97.40	6	0.100	4.579	17.000	0.283	3.771	43.419
66.20	10	0.167	4.193	20.000	0.333	3.624	37.470
45.00	17	0.283	3.807	26.000	0.433	3.360	28.793
31.00	25	0.417	3.434	28.000	0.467	3.269	26.286
21.50	32	0.533	3.068	30.000	0.500	3.171	23.821
14.40	37	0.617	2.667	33.000	0.550	3.002	20.118
6.50	45	0.750	1.872	38.000	0.633	2.635	13.938
				41.500	0.692	2.290	9.873

Distancia total del gel de poliacrilamida = 60 mm

Ecuación polinómica de orden 3

$$y = -15.423x^3 + 18.281x^2 - 9.812x + 5.4342$$

$$R^2 = 0.999$$

PM: peso molecular; kDa: kilodaltones; Rf: movilidad electroforética relativa; Log PM: logaritmo natural; mm: milímetros

Cuadro 45. Cálculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Alina.

Cálculos para obtener peso molecular de los patrones electroforéticos							
PM (kDa) marcador	Distancia bandas marcador (mm)	Rf	log PM	Distancia bandas muestra (mm)	Rf	Ecuación polinómica orden 3	PM (kDa) de bandas del gel de poliacrilamida
200.00	2.0	0.032	5.298	12.400	0.197	4.170	64.684
116.25	6.0	0.095	4.756	18.500	0.294	3.817	45.467
97.40	8.0	0.127	4.579	23.500	0.373	3.622	37.428
66.20	12.0	0.190	4.193	30.000	0.476	3.409	30.233
45.00	19.5	0.310	3.807	33.500	0.532	3.278	26.509
31.00	28.0	0.444	3.434	40.000	0.635	2.931	18.752
21.50	37.0	0.587	3.068				
14.40	44.5	0.706	2.667				
6.50	50.0	0.794	1.872				

Distancia total del gel de poliacrilamida = 63 mm

Ecuación polinómica de orden 3

$$y = -16.661x^3 + 21.137x^2 - 10.963x + 5.6355$$

$$R^2 = 0.9981$$

PM: peso molecular; kDa: kilodaltones; Rf: movilidad electroforética relativa;
Log PM: logaritmo natural; mm: milímetros

Cuadro 46. Cálculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Armida.

Cálculos para obtener peso molecular de los patrones electroforéticos							
PM (kDa) marcador	Distancia bandas marcador (mm)	Rf	log PM	Distancia bandas muestra (mm)	Rf	Ecuación polinómica orden 3	PM (kDa) de bandas del gel de poliacrilamida
200.00	1.5	0.025	5.298	5.000	0.083	4.817	123.554
116.25	6.0	0.100	4.756	8.000	0.133	4.468	87.223
97.40	7.0	0.117	4.579	12.000	0.200	4.093	59.940
66.20	10.0	0.167	4.193	16.000	0.267	3.797	44.586
45.00	16.0	0.267	3.807	20.500	0.342	3.528	34.070
31.00	23.0	0.383	3.434	24.000	0.400	3.344	28.342
21.50	29.0	0.483	3.068	27.000	0.450	3.190	24.294
14.40	35.5	0.592	2.667	28.500	0.475	3.111	22.443
6.50	44.0	0.733	1.872	32.500	0.542	2.880	17.823
				36.500	0.608	2.602	13.496
				40.000	0.667	2.301	9.981

Distancia total del gel de poliacrilamida = 60 mm

Ecuación polinómica de orden 3

$$y = -13.91x^3 + 17.258x^2 - 10.205x + 5.5553$$

$$R^2 = 0.9988$$

PM: peso molecular; kDa: kilodaltones; Rf: movilidad electroforética relativa;
Log PM: logaritmo natural; mm: milímetros

Cuadro 47. Cálculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Esmeralda.

Cálculos para obtener peso molecular de los patrones electroforéticos							
PM (kDa) marcador	Distancia bandas marcador (mm)	Rf	log PM	Distancia bandas muestra (mm)	Rf	Ecuación polinómica orden 3	PM (kDa) de bandas del gel de poliacrilamida
200.00	1.0	0.017	5.298	10.500	0.175	4.193	66.237
116.25	4.5	0.075	4.756	15.000	0.250	3.869	47.877
97.40	6.0	0.100	4.579	16.000	0.267	3.807	45.001
66.20	10.0	0.167	4.193	17.000	0.283	3.748	42.422
45.00	16.5	0.275	3.807	18.000	0.300	3.691	40.095
31.00	25.0	0.417	3.434	23.000	0.383	3.435	31.042
21.50	30.0	0.500	3.068	27.500	0.458	3.216	24.924
14.40	35.5	0.592	2.667	29.000	0.483	3.139	23.083
6.50	45.0	0.750	1.872	32.000	0.533	2.973	19.551
				37.000	0.617	2.637	13.965
				41.000	0.683	2.288	9.856

Distancia total del gel de poliacrilamida = 60 mm

Ecuación polinómica de orden 3

$$y = -12.788x^3 + 15.512x^2 - 9.1702x + 5.3915$$

$$R^2 = 0.9974$$

PM: peso molecular; kDa: kilodaltones; Rf: movilidad electroforética relativa;
Log PM: logaritmo natural; mm: milímetros

Cuadro 48. Cálculo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el patrón electroforético de la variedad Esperanza.

Cálculos para obtener peso molecular de los patrones electroforéticos							
PM (kDa) marcador	Distancia bandas marcador (mm)	Rf	log PM	Distancia bandas muestra (mm)	Rf	Ecuación polinómica orden 3	PM (kDa) de bandas del gel de poliacrilamida
200.00	1.0	0.016	5.298	10.400	0.170	4.159	64.033
116.25	4.0	0.066	4.756	15.500	0.254	3.812	45.261
97.40	5.5	0.090	4.579	20.500	0.336	3.561	35.203
66.20	9.5	0.156	4.193	26.500	0.434	3.304	27.211
45.00	16.5	0.270	3.807	28.000	0.459	3.237	25.464
31.00	25.0	0.410	3.434	29.500	0.484	3.167	23.744
21.50	31.5	0.516	3.068	34.000	0.557	2.923	18.588
14.40	36.5	0.598	2.667	37.500	0.615	2.678	14.553
6.50	45.5	0.746	1.872	42.000	0.689	2.263	9.610

Distancia total del gel de poliacrilamida = 61 mm

Ecuación polinómica de orden 3

$$y = -15.378x^3 + 18.242x^2 - 9.789x + 5.3743$$

$$R^2 = 0.997$$

PM: peso molecular; kDa: kilodaltones; Rf: movilidad electroforética relativa; Log PM: logaritmo natural; mm: milímetros

Anexo 9. 1er Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Agropecuaria y 1er Simposium en Producción y Tecnología de Semillas

LA SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROPECUARIA, A.C.
Y EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ROQUE
 OTORGAN LA PRESENTE



CONSTANCIA

Marlene Ortiz Ortega, Irma Morales Rodríguez, Juan Carlos Raya Pérez, Juan G. Ramírez
 A: Pimentel, Lucila C. Hernández Cortes, Jorge Covarrubias Prieto, Silvano Ochoa Galaz, César L. Aguirre Mancilla

Por la presentación de la ponencia:

ANÁLISIS DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA DE CINCO VARIEDADES DE CEBADA

Expuesta en el 1er. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Agropecuaria y 1er. Simposium en Producción y Tecnología de Semillas, celebrado en Roque, Celaya, Guanajuato, del 14 al 16 de Noviembre del 2012.

Dr. José Antonio Rangel Lucio
 PRESIDENTE

M.C. David Rafael Trigueros Cázares
 DIRECTOR

Anexo 10. Congreso Internacional de Investigación de Academia Journals

