

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 415**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01902597 .2**

96 Fecha de presentación: **22.01.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1346030**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **CEBADA POBRE EN LIPOOXIGENASA 1.**

30 Prioridad:  
**29.12.2000 US 751687**  
**29.12.2000 WO PCT/IB00/02045**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.03.2012**

73 Titular/es:  
**Carlsberg A/S**  
**Ny Carlsberg Vej 100**  
**1799 Copenhagen V, DK;**  
**HEINEKEN TECHNICAL SERVICES B.V. y**  
**Brasseries KRONENBOURG Société dite : S.A.**

72 Inventor/es:  
**DOUMA, Anna Christiana;**  
**DODERER, Albert;**  
**CAMERON-MILLS, Varena;**  
**SKADHAUGE, Birgitte;**  
**BECH, Lene, Molskov;**  
**SCHMITT, Nathalie;**  
**HEISTEK, Jolanda Carolina y**  
**VAN MECHELEN, Johannes Reinier**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

ES 2 376 415 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cebada pobre en lipooxigenasa 1

**Campo de la invención**

5 Esta invención está en el campo de la biotecnología vegetal. Más específicamente, la invención se refiere a un gen de lipooxigenasa 1 (*lox-1*) de cebada mutante que codifica una enzima con actividad formadora de ácido 9-hidroperoxioctadecanoico muy reducida. La invención se refiere también al uso de cultivares de cebada homocigóticos de *lox-1* en procesos de fabricación de cerveza para reducir la formación de aromas desagradables en productos de la fabricación de cerveza, tales como cerveza, durante el almacenamiento.

**Antecedentes de la invención**

10 Las lipooxigenasas son una familia de enzimas (EC 1.13.11.12) que catalizan la dioxidación de ácidos grasos poliinsaturados libres y esterificados que contienen una configuración 1(Z),4(Z)-pentadieno. Los productos de las reacciones catalizadas por lipooxigenasa son sospechosos desde hace tiempo de ser los principales culpables de la aparición de aromas rancios en grano/semilla vegetales y en productos alimentarios derivados de grano/semilla (Robinson *et al.*, 1995, Food Chem., 54: 33-43). Las lipooxigenasas se han implicado en la producción de hexanaldehídos volátiles generados durante el procesamiento de la soja, que tienen un aroma indeseable que limita el uso de proteínas de soja en productos alimentarios. Se cree que tres isozimas de lipooxigenasa expresadas en semilla de soja contribuyen a la oxidación lipídica y la formación de hexanal. Se han generado mutantes de soja que carecen de una o más de estas isozimas con el objetivo de reducir la formación de hexanal y mejorar su estabilidad aromática. El éxito de este enfoque se ha evaluado por Hildebrand *et al.*, 1990, J. Agric. Food Chem., 38: 1934-1936.

15 20 Los mutantes que carecen de lipooxigenasa de soja 3 producían mayores niveles de hexanal, sugiriendo que esta isozima desvía los 13-hidroperoxioctadecanoides producidos por la oxidación lipídica hacia productos no volátiles. El rendimiento de campo de las líneas de soja triples nulas, que carecen de las tres lipooxigenasas de semilla, ha mostrado que estas enzimas no son esenciales para las características agronómicas y de semilla normales (Narvel *et al.*, 1998, Crop Sci., 38: 926-928).

25 Las lipooxigenasas se han implicado también en la generación de aromas desagradables en el arroz, que pueden aparecer durante el almacenamiento del grano. Puede detectarse la liberación de ácidos grasos libres en el grano almacenado, que es indicativo del metabolismo de las reservas de triglicéridos. La variedad de arroz Daw Dam se ha encontrado que acumula los menores niveles de pentanales y hexanales, dando una mejor estabilidad aromática en almacenamiento (Susuki *et al.*, 1999, J. Agric. Food Chem., 47: 1119-1124). Este fenotipo deseable se atribuyó a la ausencia de lipooxigenasa 3 de arroz, que oxida las cadenas de acilo lipídicas insaturadas formando isómeros posicionales de ácido 9-hidroperoxioctadecanoico.

35 Se reconoce que la ruta de la lipooxigenasa es compleja, con muchas ramificaciones, y su papel en numerosos aspectos del crecimiento y fisiología vegetal no se entiende completamente. Se han propuesto modificaciones de la ruta de la lipooxigenasa que alteran la actividad de 9-hidroperoxidación en cultivos de semilla para regular su sensibilidad a la contaminación por micotoxina por *Aspergillus spp.* (documento WO 9726364), lo que es consistente con la implicación de esta ruta en la resistencia vegetal a patógenos, pero no está relacionado con los objetivos de la invención descrita en la presente memoria.

40 Entre los muchos productos volátiles aromáticos que contribuyen al aroma de la cerveza, los aldehídos insaturados superiores con una cadena de 6-12 carbonos tienen umbrales de aroma organoléptico particularmente bajos (Meilgaard 1975, MBA Tech. Quart., 12: 151-168). El trans-2-nonenal, que es un miembro de este grupo, tiene tanto un umbral de aroma extremadamente bajo de 0,11 ppb como contribuye a un aroma desagradable similar a la paja "acartonado" en la cerveza. El aroma desagradable característico causado por el trans-2-nonenal es una característica común de las cervezas almacenadas durante 1-3 meses o más y es particularmente perjudicial para el aroma de la cerveza rubia, que se fabrica con maltas ligeras y tiene un aroma delicado.

45 El sulfito se ha conocido desde hace tiempo que mejora la estabilidad aromática de la cerveza, no solo al unirse al oxígeno y actuar como antioxidante, sino también al formar compuestos de adición de bisulfito volátiles con aldehídos y cetonas presentes en la cerveza. Las dos fuentes principales de sulfito en la cerveza son el sulfito producido por la levadura durante la fermentación por la ruta de asimilación de azufre y el sulfito añadido a la cerveza antes del envasado. Las condiciones de fermentación que potencian la producción y secreción de sulfito de levadura permitirán la formación de aductos de sulfito-carbonilo a partir de los carbonilos presentes en el mosto y evitarán su metabolismo posterior por la levadura (Dufour 1991, Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Lisboa, pág. 209-216). De esta manera, los carbonilos tales como de acetaldehído y diacetilo pueden transferirse a la cerveza. La capacidad del sulfito de evitar la aparición del compuesto carbonílico trans-2-nonenal durante el envejecimiento de la cerveza se ha demostrado fabricando cerveza con una cepa de levadura bloqueada en la ruta de asimilación de azufre (Johannesen *et al.*, 1999, Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Niza, pág. 655-662). Después del embotellado, se sometió la cerveza a envejecimiento forzado por almacenamiento a 37°C durante 7 días, después de lo cual se encontró que los niveles de trans-2-nonenal estaban bastante por encima del umbral de sabor. Si se añadía sulfito 55 10 ppm a la cerveza pobre en sulfito justo antes del embotellamiento, se reducía significativamente la aparición de

trans-2-nonenal durante el envejecimiento forzado. La reacción entre sulfito y compuestos de carbonilo es reversible y está bajo control termodinámico y cinético. Las constantes de equilibrio aparente de los compuestos de bisulfito se encuentran en el intervalo de  $10^{-6}$  M para los compuestos de carbonilo tales como acetaldehído, hexanal y decanal hasta  $10^{-3}$  para diacetilo y piruvato (Dufour 1991, *supra*). Durante el almacenamiento de la cerveza, el intercambio de gas a través del envasado permitirá la entrada de oxígeno a la cerveza y se perderá el sulfito, de tal modo que los aductos de bisulfito más débiles se disociarán, permitiendo que aparezcan carbonilos libres en la cerveza. Aunque el sulfito potencia incuestionablemente la estabilidad aromática de la cerveza, particularmente a corto plazo, su retención en la cerveza envasada depende en gran medida del intercambio de gas a través del envasado y de la temperatura. En una cerveza acabada, los niveles naturales de sulfito producidos durante la fermentación son variables y la adición de sulfito antes del embotellado no es una práctica universalmente aceptada. Por estas razones, el sulfito solo no proporciona un procedimiento fiable para potenciar la estabilidad aromática a largo plazo de la cerveza en las diferentes condiciones de almacenamiento de cerveza usadas por todo el mundo.

Está generalmente aceptado que el trans-2-nonenal encontrado en la cerveza es el resultado de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados derivados de lípidos de grano de cebada, en que el ácido graso de cadena de 18 carbonos, el ácido linoleico [clasificado como un ácido graso poliinsaturado 18:2, n-6 (Broun, Gettner y Sommerville 1999, *Annu. Rev. Nutr.* 19: 197-216)] es el más abundante. Sin embargo, no hay acuerdo en la bibliografía respecto al mecanismo mediante el cual se forma el trans-2-nonenal. Se ha propuesto la presencia de rutas enzimáticas que conducen a la formación de trans-2-nonenal a partir de ácidos grasos poliinsaturados, pero las etapas enzimáticas individuales no se han demostrado experimentalmente nunca en grano de cebada o durante el proceso de malteado (Gardner 1988, *Adv. Cereal Sci. Technol.* 9: 161-215). El concepto de uso de tecnología genética anticodificante o de cosupresión para reducir los niveles de lipooxigenasa 1 en grano de cebada, y así controlar la 9-hidroperoxidación y reducir los niveles de aldehído y alcohol en el grano de cebada acabado, se ha propuesto como un medio para controlar la formación de aromas desagradables, pero los resultados de dicho enfoque no se han notificado (McElroy y Jacobsen, 1995, *Bio/Technology* 13: 245-249).

Se ha desarrollado una prueba forzada como procedimiento para valorar el potencial de trans-2-nonenal de una cerveza, en que se induce la formación de trans-2-nonenal en mosto o cerveza sometiendo las muestras a temperaturas elevadas a pH reducido ( $100^{\circ}\text{C}$  a pH 4,0 durante 2 horas). Los intentos de correlacionar el potencial de trans-2-nonenal en mosto y cerveza acabada con el nivel total de actividad lipooxigenasa en la malta horneada han indicado que la lipooxigenasa puede contribuir a la aparición de trans-2-nonenal en cerveza envejecida (Drost *et al.*, 1990, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48: 124-131). Sin embargo, las conclusiones que pueden extraerse de este estudio están muy limitadas por el hecho de que la actividad lipooxigenasa en la malta de cebada estaba regulada al final del proceso de malteado por el grado de inactivación enzimática durante el secado en horno. Por tanto, se examinó solo el efecto de la actividad lipooxigenasa de malta residual sobre el potencial de trans-2-nonenal en el mosto derivado y la cerveza acabada. El estudio no consiguió evaluar las lipooxigenasas que catalizan la primera etapa de la ruta enzimática de la lipooxigenasa en el grano de cebada durante el desarrollo y malteado, y su papel como determinantes del nivel de trans-2-nonenal encontrado en la cerveza. Es más, la ausencia de cultivares de cebada deficientes en una o más isoenzimas de lipooxigenasa ha hecho imposible proporcionar evidencias convincentes sobre el papel de la ruta de la lipooxigenasa en la malta de cebada para el control de la formación de trans-2-nonenal. Dichos experimentos son necesarios para evaluar la contribución de las rutas enzimáticas, en comparación con las autooxidativas/químicas, a la formación de trans-2-nonenal en cerveza. El proceso de fabricación de cerveza implica una etapa de alta temperatura de cocción del mosto en que se propone que ocurren estas reacciones no enzimáticas (Noël *et al.*, 1999, *J. Agric. Food Chem.* 47: 4323-4326).

### Sumario de la invención

Esta invención proporciona una planta de cebada que tiene una actividad lipooxigenasa 1 reducida en gran medida. En una realización, las plantas de cebada de la invención contienen un gen *lox-1* mutante que expresa niveles reducidos en gran medida de la isoenzima lipooxigenasa 1, en la que dicha proteína LOX-1 mutada comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 12, en la que Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, triptófano, asparagina o glutamina.

Como se muestra en la presente memoria, la malta y mosto producidos a partir de la cebada con lipooxigenasa reducida de la invención son útiles para producir cerveza con una estabilidad aromática significativamente potenciada y niveles de trans-2-nonenal reducidos, particularmente en condiciones conocidas por promover la aparición de T2N. La invención demuestra la correlación entre la actividad de la lipooxigenasa 1 de malta de cebada para producir ácidos 9-hidroxiperioctadecadienoicos (9-HPOD) y la presencia de trans-2-nonenal en la cerveza. El uso de cebada homocigótica del gen *lox-1* mutante en el proceso de fabricación de cerveza mejora la estabilidad aromática de la cerveza, tanto durante el almacenamiento como en la exposición a temperaturas de almacenamiento elevadas. Estas propiedades potencian la calidad de la cerveza, y son útiles para prolongar su vida de almacenamiento y reducir la necesidad de enfriar la cerveza durante el transporte y almacenamiento.

La invención proporciona plantas de cebada y porciones de las mismas que tienen actividad lipooxigenasa 1 reducida y que expresan la proteína LOX-1 mutante como se describe en la presente memoria. Se describen en la presente memoria los procedimientos para producir dichas plantas de cebada, porciones de planta, productos de plantas y, particularmente, malta y mosto producidos a partir de las plantas de cebada de la invención.

**Breve descripción de los dibujos**

- La Figura 1 es una gráfica que muestra el efecto del inhibidor ácido nordihidroguayarático (NDGA) sobre la actividad lipooxigenasa 1 y 2 purificada por inmovilización de embriones de grano de cebada germinado 3 días.
- 5 La Figura 2 es una gráfica que muestra el peso húmedo de grano en desarrollo de línea G y cv Vintage desde 5 días después de la floración hasta la maduración completa (MC). Cada determinación es el peso medio del grano individual de 6 espigas.
- La Figura 3 es una gráfica que muestra el peso seco de grano en desarrollo de línea G y cv Vintage desde 5 días después de la floración hasta la maduración completa (MC). Cada determinación es el peso medio del grano individual de 3 muestras de 5 granos.
- 10 La Figura 4 es una gráfica que muestra la actividad lipooxigenasa total en grano en desarrollo de línea G y cv Vintage desde 5 días después de la floración hasta la maduración completa (MC).
- La Figura 5 es una gráfica que muestra los productos 9- y 13-HPOD de la oxidación de ácido linoleico por la actividad lipooxigenasa en grano en desarrollo de línea G.
- 15 La Figura 6 es una gráfica que muestra la actividad lipooxigenasa total en embriones de grano en germinación de línea G y cv Vintage expresada como  $\mu\text{mol}/\text{min}/10$  embriones (U/10 embriones).
- La Figura 7 es una gráfica que muestra los productos 9-HPOD y 13-HPOD de la oxidación de ácido linoleico por la actividad lipooxigenasa en embriones de grano en germinación de línea G y cv Vintage, mostrando los niveles de 9-HPOD y 13-HPOD.
- 20 La Figura 8 es un Western blot que muestra la inmunodetección de lipooxigenasa 1 en embriones de grano en desarrollo de línea G y cv Vintage [wt] desde 5 días después de la floración hasta la maduración completa (MC).
- La Figura 9 es un Western blot que muestra la inmunodetección de lipooxigenasa 1 en embriones de grano de línea G y cv Vintage [de tipo silvestre (wt)] germinados durante 0-6 días.
- 25 La Figura 10 es un Northern blot sondeado con la región 3' no transcrita de ADNc de *lox-1* y que muestra transcritos de lipooxigenasa 1 detectados en grano en desarrollo de línea G y cv Vintage [tipo silvestre] desde 5 días después de la floración hasta la maduración completa (MC).
- La Figura 11 es una transferencia Northern sondeada con la región 3' no transcrita de ADNc de *lox-1* y que muestra transcritos de lipooxigenasa 1 detectados en embriones de grano de línea G y cv Vintage [wt] germinados durante 0-6 días.
- 30 Las Figuras 12A-12G son un alineamiento de secuencia nucleotídica de la región promotora y transcrita del alelo de *lox-1* de cv Vintage de tipo silvestre (WT) y el alelo de línea G (LG). El sitio de inicio de la transcripción (+1), el codón de inicio ATG (+69) y el codón de terminación de la traducción (+4231) están subrayados en las secuencias génicas. Las mutaciones nucleotídicas identificadas en el alelo de línea G se muestran en cursiva y negrita y se indican por un asterisco.
- 35 La Figura 13 es una presentación esquemática del gen *lox-1* de cv Vintage (tipo silvestre) y del gen *lox-1* mutante de línea G. El transcrito de +1 a +4375 está compuesto por 7 exones (rectángulos punteados) y 6 intrones (rectángulos blancos). Se indican dos mutaciones en el gen *lox-1*.
- La Figura 14 es un dibujo esquemático de los módulos génicos de la expresión transitoria de ADNc de *lox-1* de tipo silvestre y del gen *lox-1* y del gen *lox-1* mutante de línea G. Se clonaron las secuencias codificantes de lipooxigenasa entre el promotor constitutivo de ubiquitina de maíz en el intrón 1 (*Ubi-1*) y el terminador *nos*.
- 40 La Figura 15 es una gráfica de barras que muestra la actividad lipooxigenasa 1 en protoplastos de aleurona de cebada transfectados con módulos génicos que contienen ADNc de *lox-1* de tipo silvestre, el gen *lox-1* mutante de línea G, el gen *lox-1* WT y un gen informador GUS de control. Se ensayó la actividad lipooxigenasa en extractos de protoplastos transfectados en placas de microvaloración mediante la oxidación de KI y se cuantificó espectrofotométricamente. Se expresó la actividad lipooxigenasa 1 como unidades por  $\mu\text{g}$  de proteína en el extracto, y se muestra como la media de 3 medidas de 2 ensayos por duplicado.
- 45 La Figura 16 es un alineamiento de secuencia que demuestra que el RFLP entre el gen *lox-1* de tipo silvestre y mutante es debido a una mutación puntual en el nucleótido 2347, que crea un sitio de restricción *AatII* adicional.
- 50 La Figura 17 es una presentación esquemática de fragmentos de PCR de *lox-1* amplificados y escindidos en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa –sitio polimórfico amplificado por escisión (PCR-CAPS). Las posiciones de los cebadores de PCR se indican mediante flechas y los sitios *AatII* se muestran encima de los genes (posición de secuencia). Las regiones exónica e intrónica del producto de PCR se distinguen mediante rectángulos punteados y blancos respectivamente, y se dan los tamaños de los fragmentos de digestión con *AatII*.

La Figura 18 es un gel de electroforesis de agarosa que muestra fragmentos de PCR de *lox-1* (652 pb) amplificados en la primera etapa del ensayo de PCR-CAPS de ADN genómico de línea G y cv Vintage.

La Figura 19 es un gel de electroforesis de agarosa que muestra el RFLP detectado por PCR-CAPS en el gen *lox-1* de tipo silvestre y mutante. Los fragmentos de digestión por *AatII* del gen mutante incluyen un solo fragmento de restricción de 313 pb, indicado por un asterisco.

La Figura 20 es una tabla que muestra un programa de retrocruzamiento para el par génico recesivo individual // (rasgo pobre en lipooxigenasa) de la línea G al cv Alexis. El genotipo *LL* son plantas que expresan actividad lipooxigenasa de tipo silvestre (alelo dominante), el genotipo *ll* son plantas que expresan el rasgo pobre en lipooxigenasa (alelo recesivo). Las *Ll* son plantas heterocigóticas que contienen tanto el alelo de tipo silvestre como el pobre en lipooxigenasa. Puesto que el rasgo pobre en lipooxigenasa es un rasgo recesivo, las plantas *Ll* muestran actividad lipooxigenasa de tipo silvestre. Después de cada ronda de retrocruzamiento (incluyendo autopolinización), se espera que la progenie *ll* represente un 25% de la progenie. Se indican las frecuencias observadas de actividad pobre en lipooxigenasa. El porcentaje calculado del fondo genético del cv Alexis que tiene el alelo pobre en lipooxigenasa homocigótico se indica como % de Alexis.

La Figura 21 es un gel de electroforesis de agarosa que muestra la detección por PCR-CAPS del gen *lox-1* mutante en progenie *ll* del programa de retrocruzamiento de línea G-Alexis. Ensayo PCR-CAPS de ADN genómico de la línea G (carril 2), cv Vintage (carril 3), progenie *ll* del 3° (carril 4) y 4° (carriles 5-9) retrocruzamientos. Escala de ADN (carril 1). Línea de control retrocruzada rica en *lox* (carril 10).

Las Figuras 22A-22B son un alineamiento comparativo de las secuencias aminoacídicas de las lipooxigenasas LOX-1 (Gm1), LOX-2 (Gm2), LOX-3 (Gm3) de soja y las lipooxigenasas LOX-1 (Hv1) y LOX-2 (Hv2) de cebada.

### Descripción detallada de la invención

Se proporcionan materiales vegetales, productos vegetales y procedimientos para la producción de una bebida, tal como cerveza, teniendo la bebida un contenido reducido del compuesto de aroma desagradable trans-2-nonenal, de tal modo que mejore la estabilidad aromática de la bebida, por ejemplo cerveza, durante el almacenamiento y exposición a temperaturas elevadas respecto a una bebida de control. Más particularmente, la invención proporciona plantas de cebada cuyo grano en desarrollo y germinación produce niveles de actividad de la enzima lipooxigenasa 1, denominada LOX-1, reducidos en gran medida que, por ejemplo, cuando se usan en un proceso de fabricación de cerveza, dan como resultado una cerveza que tiene niveles reducidos de trans-2-nonenal, en comparación con una planta de cebada de control.

Se describen a continuación los procedimientos usados para generar, caracterizar y validar una planta de cebada que tiene una actividad LOX-1 reducida en gran medida, y el uso de este tipo de cebada para la producción de una cerveza de aroma estable.

#### 1. Definiciones

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen las definiciones indicadas:

"Porción de planta" significa una planta o una parte específica de una planta, tal como el tallo, hojas, raíces, flores, semillas, granos, frutos o yemas.

"LOX-1" significa proteína lipooxigenasa 1; "*lox-1*" significa el gen que codifica LOX-1.

"*lox-1* de cebada mutante" significa un gen de cebada mutagenizado que codifica un polipéptido de lipooxigenasa 1 mutante.

"Control no mutado" significa una planta, ácido nucleico, polipéptido, porción de planta o producto vegetal que contiene el gen o proteína de tipo silvestre.

"Heterólogo" significa una secuencia no nativa, por ejemplo, una secuencia derivada de otra especie, o una secuencia modificada recombinantemente o sintética que difiere de la secuencia nativa.

"Producto vegetal" significa un producto resultante del procesamiento de una planta o porción de planta, e incluye, por ejemplo, malta y mosto.

"Aminoácido ácido" significa ácido aspártico o glutámico.

"Aminoácido básico" significa histidina, lisina o arginina.

"Aminoácido polar" significa treonina, serina, tirosina, triptófano, asparagina o glutamina.

"Propiedades organolépticas" significa propiedades que apelan a los sentidos del olfato y gusto que se analizan, por ejemplo, por un panel de degustación entrenado.

“Producto de fabricación de cerveza” significa un producto preparado triturando, hirviendo y fermentando, por ejemplo, cerveza.

“Trans-2-nonenal reducido” significa menos de aproximadamente un 50%, en comparación con las condiciones de tipo silvestre (de control).

5 **2. Actividad lipooxigenasa**

Las enzimas lipooxigenasas catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. En cebada, son conocidas las isoenzimas LOX-1 y LOX-2. La LOX-1 cataliza principalmente la 9-hidroperoxidación, mientras que la LOX-2 cataliza principalmente la 13-hidroperoxidación de ácidos grasos octadecanoicos poliinsaturados. Los datos mostrados en los ejemplos siguientes demuestran una correlación entre la actividad de 9-hidroperoxidación de LOX-1 de cebada y la presencia de trans-2-nonenal en cerveza. Por consiguiente, la cebada con actividad LOX1 reducida es útil para producir cerveza que tiene un nivel y/o potencial reducido de trans-2-nonenal en comparación con el control.

10 **3. Producción de cebada pobre en lipooxigenasa**

Puede usarse una variedad de enfoques genéticos conocidos para producir las plantas de la invención, es decir, para reducir el nivel de actividad de la enzima lipooxigenasa 1 expresada en una planta de cebada de manera estable y heredable. Estos enfoques incluyen, pero sin limitación, la tecnología anticodificante y la mutagénesis, tal como mutagénesis química e inducida por radiación, así como mutagénesis dirigida a sitio.

**Transformación de cebada.** La cebada puede transformarse con diversas moléculas de ácido nucleico diseñadas para manipular la expresión del gen *lox-1* o alterar la arquitectura del gen *lox-1*. Pueden usarse diversos procedimientos, por ejemplo, transferencia mediada por *Agrobacterium tumofaciens* (Tingay *et al.*, 1997, Plant J., 11: 1369-1376), bombardeo de partículas (Wan y Lemaux, 1994, Plant Physiol., 104: 37-48, o captación de ADN mediada por polietilenglicol (PEG) (Funatsuki y Kihara, 1995, Theor. Appl. Genet., 91:707-712), para introducir ácidos nucleicos en una célula de cebada, por ejemplo, en un protoplasto, callo o embrión.

Pueden usarse diversos promotores para dirigir la expresión del gen de interés. Para la expresión de vectores que contienen *lox-1*, incluyendo secuencias anticodificantes, puede usarse la región promotora de *lox-1* nativa. La secuencia promotora de *lox-1* está contenida en los nucleótidos 2602-3511, que incluyen la 5' UTR de nº de acceso a EMBL U83904. Como alternativa, pueden usarse promotores que dirigen constitutivamente la expresión del gen de interés, por ejemplo, el promotor de ubiquitina de maíz *Ubi-1* (Wan y Lemaux, *supra*; Kjærulff *et al.*, en P. Mathis, Ed., 1995, “Photosynthesis: from Light to Biosphere”, vol. II, 151-154). Los vectores de expresión pueden contener también una región de terminación de la transcripción, por ejemplo, el terminador 3' del gen de nopalina sintasa (*3'-nos*) (Bevan, *et al.*, 1983, Nucl. Acids Res., 11: 369-385) se ha fusionado con genes expresados en cebada transgénica (Wan y Lemaux, *Supra*; Funatsuki y Kihara, *supra*).

Los vectores de expresión pueden contener también un gen que permita la selección de células transformadas cuando el vector se haya integrado exitosamente en la célula. Estos genes pueden codificar genes de resistencia a antibióticos o herbicidas, por ejemplo, el gen de neomicina fosfotransferasa (*npt*) o de fosfinotricina acetiltransferasa (*bar*). Cuando se expresan, dichos genes de resistencia permiten el crecimiento de la célula transformada en medio que contiene neomicina o bialafos, respectivamente (véanse, por ejemplo, Wan y Lemaux, *Supra*; Funatsuki y Kihara, *Supra*; Kjærulff *et al.*, en P. Mathis, *Supra*).

Después de la transformación, pueden cultivarse las células en medio selectivo durante un periodo de tiempo y cultivarse entonces para permitir la formación de brotes, seguido de sistemas de raíces y entonces plantones. Se ha desarrollado un procedimiento de transformación de cebada exitoso por Funatsuki y Kihara, (*Supra*), en que la transformación de protoplastos de cebada por PEG con vectores de expresión que contienen neomicina fosfotransferasa y la posterior selección en neomicina proporcionaron plantas fértiles que contenían el transgén. Se ha mostrado que el transgén se integraba en el genoma y que la mayoría de las plantas transgénicas expresaban la proteína codificada por el transgén. Estas plantas transgénicas eran también capaces de transmitir y expresar el transgén después de cruces.

Se entiende que son conocidos una variedad de procedimientos de transformación, vectores de expresión, promotores, marcadores seleccionables y similares y son útiles para la transformación de cebada.

**Mutagénesis de cebada:** El gen *lox-1* puede orientarse a mutagénesis específica de sitio usando oligonucleótidos de ARN/ADN quiméricos. Se ha mostrado que estos oligonucleótidos de ARN/ADN quiméricos introducen exitosamente mutaciones en células vegetales (Zhu *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8768-8773 y Beetham *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8774-8778) y células de mamífero (Yoon *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 2071-2076) en localizaciones deseadas. Los oligonucleótidos de ARN/ADN quiméricos pueden transformarse en protoplastos o células de cebada de interés en una variedad de formas, por ejemplo, usando los procedimientos de transformación mediada por PEG o mediada por bombardeo de partículas descritos anteriormente. Los protoplastos o células individuales pueden regenerarse entonces mediante cultivo celular hasta plantas fértiles enteras, y puede confirmarse el evento mutacional y seguirse, por ejemplo, usando un enfoque basado en PCR como se detalla en los ejemplos siguientes.

Este procedimiento de mutagénesis dirigida a sitio puede aplicarse a mutar residuos específicos del gen *lox-1*. El gen *lox-1* puede estar mutado en una o más posiciones nucleotídicas en la región promotora para regular negativamente o anular la transcripción de *lox-1*. Puede aplicarse también una mutagénesis específica para introducir cambios en la región de codificación de *lox-1* que, por ejemplo, reduzcan la actividad enzimática. Dichas mutaciones incluyen, pero sin limitación, inserciones, deleciones y sustituciones que dan como resultado un desplazamiento de fase, truncamiento de la proteína LOX-1 y/o una alteración de la naturaleza neutra e hidrófoba de la cavidad de sustrato de la enzima.

**Expresión anticodificante:** La reducción de la expresión de *lox-1* puede lograrse también mediante la expresión de un constructo anticodificante de *lox-1* en células de cebada. Se han notificado procedimientos para la expresión de constructos anticodificantes en cebada para reducir la expresión de una proteína diana, por ejemplo, en Gilpin, M.J. *et al.*, 1998, en: "Photosynthesis: Mechanisms and Effects", G. Garab, ed., vol. IV, 2983-2986; Kjærulff *et al.*, 1995, en: "Photosynthesis: from Light to Biosphere", P. Mathis, Ed., vol. II, 151-154.

Las células de cebada pueden transformarse con un constructo de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico anticodificante. El constructo de expresión produce una molécula de ARN anticodificante capaz de unirse específicamente al menos a una porción del ARNm producido por el gen *lox-1* de tipo silvestre, mediante apareamiento de bases complementarias, y capaz de desestabilizar el corte y empalme del pre-ARNm o la traducción de este ARNm. Un promotor constitutivo o específico de tejido/temporal, por ejemplo, el promotor *lox-1* de cebada descrito anteriormente, puede dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico anticodificante.

**Mutagénesis química.** El mutágeno químico azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) se ha usado habitualmente para la mutagénesis de cebada y es conocido por inducir mutaciones estables en la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) del genoma de cebada (Olsen *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8043-8047). Pueden usarse también otros mutágenos químicos, por ejemplo, metanosulfonato de etilo (EMS), azidoglicerol (AG, 3-azido-1,2-propanodiol), metilnitrosourea (MNU) e hidrazida maleica (MH) para inducir las mutaciones de ADN (Rank, J. *et al.*, 1997, Mutat. Res. 390: 121-7), así como irradiación UV.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, se trató el grano de los cultivares (cv) de cebada Vintage y Caruso con azida de sodio y se propagó por autofertilización hasta la 3ª generación (M3).

#### 4. Identificación y selección de cebada pobre en lipooxigenasa

Puede conseguirse la identificación y selección de plantas de cebada que tienen una actividad reducida de la isoenzima lipooxigenasa, por ejemplo, mediante análisis de la actividad lipooxigenasa. Pueden usarse ensayos enzimáticos para determinar la actividad de las dos lipooxigenasas principales conocidas por estar presentes en grano maduro o en germinación, LOX-1 y LOX-2. Dichos ensayos deben distinguir la actividad LOX-1 de la LOX-2.

Un ensayo selectivo de LOX-1 y LOX-2 está basado en la oxidación de un ácido graso poliinsaturado por lipooxigenasa y la detección espectrofotométrica del producto hidroperóxido de dicha oxidación. La especificidad de este ensayo por LOX-1 aprovecha la insensibilidad comparativa de LOX-1 hacia un inhibidor, por ejemplo NDGA, respecto a LOX-2.

Puede conseguirse también un ensayo selectivo usando la inmunoprecipitación para eliminar selectivamente LOX-1 o LOX-2 del ensayo. Pueden prepararse anticuerpos específicos anti-LOX-1 y anti-LOX-2, por ejemplo anticuerpos monoclonales, a partir de LOX-1 y LOX-2 purificadas como se describe en Holtman *et. al.*, 1996, *Supra*.

Estos procedimientos de ensayo pueden adaptarse a procedimientos de ensayo de placa de microvaloración, u otros formatos de ensayo de alto rendimiento repetitivos conocidos, permitiendo el cribado rápido de muchas muestras. Estos ensayos pueden validarse cribando puntas de hoja de grano en germinación de manera no destructiva, de tal modo que las plántulas seleccionadas en el cribado puedan propagarse posteriormente.

La pérdida de la actividad LOX-1 en presuntos mutantes puede confirmarse mediante el ensayo de la actividad enzimática. Por ejemplo, los extractos de grano pueden incubarse con ácido linoleico y analizarse los productos de oxidación del ácido linoleico, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa. Las cantidades relativas de 9-HPOD y 13-HPOD formadas a partir de ácido linoleico proporcionan una medida de la actividad LOX-1, cuyo producto mayoritario es 9-HPOD.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, se cribó en aproximadamente 20.000 granos de la generación M3 de cv Vintage y cv Caruso mutagenizados la actividad LOX-1 y LOX-2 mediante ensayo de oxidación en presencia de inhibidor y también mediante ensayos de inmunoprecipitación. Usando estos procedimientos de cribado, se encontró que un mutante del cv Vintage tenía la mayor reducción de la actividad LOX-1, y se denominó línea G. El fenotipo mutante se heredó en las generaciones M4 y M5.

Se depositaron semillas producidas por cebada de la línea G el 4 de enero de 2001 en las "National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria" (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB243RY, Escocia, RU, bajo los términos del tratado de Budapest con el número de acceso NCIMB 41078.

## 5. Secuencias genéticas

Una descripción precisa de la alteración genotípica que da cuenta del fenotipo pobre en lipooxigenasa en plantas de cebada de la invención es útil para identificar plantas que tengan esta alteración genética y para cruzar este carácter genético con otros cultivares de cebada en un programa de reproducción. Puede usarse una variedad de procedimientos moleculares y bioquímicos conocidos para determinar la base genética del fenotipo pobre en lipooxigenasa.

Se reconoce en general que tanto las secuencias que actúan en cis como las que actúan en trans pueden determinar la expresión de un gen dado en el genoma y la actividad del producto génico. Los puntos de control de la expresión génica incluyen la regulación del desarrollo temporal, la especificidad de tejido y la tasa de transcripción génica, la estabilidad del transcrito y la tasa de traducción del transcrito. Tanto el nivel de expresión génica como la estabilidad y actividad específica de la enzima codificada determinarán el nivel de actividad enzimática detectado en un tejido.

Las alteraciones en una secuencia génica vegetal pueden determinarse mediante la secuenciación de ADN de partes relevantes conocidas del genoma, mientras que el análisis Northern proporciona una herramienta para monitorizar los niveles de transcrito estables en un tejido vegetal dado. La enzima expresada en tejido vegetal puede evaluarse extrayendo la enzima del tejido y midiendo la actividad enzimática.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, se determinó la identidad de los cambios genéticos que determinan el fenotipo pobre en lipooxigenasa del mutante de línea G inducido en el cv Vintage de la siguiente manera. Se amplificó el gen estructural que codifica la proteína LOX-1, tanto en el cv Vintage original como en la línea G, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se secuenciaron las secuencias promotoras en dirección 5', que regulan la expresión del gen, así como la secuencia de codificación completa que comprende secuencias intrónicas y extrónicas.

La comparación de las secuencias nucleotídicas del gen *lox-1* de la línea G y del cv Vintage de tipo silvestre reveló 2 sustituciones nucleotídicas en 2 exones, de las cuales una (en posición + 2347) conducía a una sustitución aminoacídica no conservativa (glicina<sup>368</sup>→aspartato) en la proteína expresada.

La Figura 22 muestra un alineamiento de las lipooxigenasas de soja (Gm: *Glycine max* L) LOX1 (nº de acc. P08170), LOX2 (nº de acc. P08170), LOX3 (nº de acc. AAB41272) y las lipooxigenasas de cebada (hv: *Hordeum vulgare*) LOX1 (nº de acc. P29114) y LOX2 (nº de acc. AAB70865.1). Los residuos aminoacídicos conservados y sustituciones conservativas de residuos cargados se muestran en negrita. Las asignaciones de estructura secundaria para LOX3 de soja *Glycine max*, en que H=hélices  $\alpha$  y E= láminas  $\beta$ , se muestran arriba del alineamiento, y se muestran los residuos relevantes para la función enzimática (identificados por un asterisco o círculo negro), como se describe en Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1997, Proteins 29:15-31.

Los residuos aminoacídicos que participan en la unión de hierro no hemo o esenciales para catálisis (\*) en LOX3 de soja incluyen: H<sub>518</sub>, H<sub>523</sub>, H<sub>709</sub> [3 átomos de N]; N<sub>713</sub>, I<sub>847</sub>. Los residuos equivalentes en LOX-1 de cebada son H<sub>517</sub>, H<sub>522</sub>, H<sub>708</sub>, N<sub>712</sub> e I<sub>862</sub>. Los residuos en LOX-3 de soja con un papel predicho en la catálisis (\*) son: H<sub>266</sub>, H<sub>513</sub>, H<sub>776</sub>, F<sub>264</sub>, F<sub>272</sub>, F<sub>714</sub>, W<sub>519</sub>, R<sub>552</sub>, R<sub>726</sub>, D<sub>766</sub>, D<sub>779</sub>, K<sub>278</sub>. Los residuos equivalentes en LOX-1 de cebada son: H<sub>261</sub>, H<sub>512</sub>, H<sub>775</sub>, F<sub>259</sub>, F<sub>267</sub>, F<sub>713</sub>, W<sub>518</sub>, R<sub>551</sub>, R<sub>725</sub>, D<sub>778</sub> y K<sub>273</sub>.

Los residuos de prolina (P<sub>86</sub>, 109, 167, 171, 223, 234, 291, 311, 324, 343, 345, 371, 381, 382, 486, 541, 548, 600, 616, 627, 685, 726, 734, 788, 829, 833, 839, 857) y glicina (G<sub>49</sub>, 67, 68, 70, 91, 107, 137, 187, 192, 210, 217, 218, 260, 306, 307, 336, 392, 409, 458, 474, 490, 569, 607, 674, 676, 720, 736, 783, 828, 850, 855) (+) localizados en bucles y posiciones de extremo de hélices en estructuras secundarias de proteína, pueden facilitar giros bruscos y el plegamiento de la cadena principal peptídica.

El alineamiento de las lipooxigenasas vegetales relacionadas indicó que la glicina 368 en LOX-1 de cebada está altamente conservada. Además, este residuo, que corresponde a la glicina 353 en *lox-1* de soja es uno de los 35 residuos altamente conservados de un total de 58 residuos que recubren la cavidad de sustrato II de la enzima, como se observa en su estructura cristalina. Estos residuos conservados están destacados (encuadrados) en el alineamiento de las secuencias de lipooxigenasas vegetales mostrado en la Figura 22 (Minor *et al.*, 1996, Biochemistry 35: 10687-10701) e incluyen los siguientes residuos de LOX-1 de cebada: Y<sub>224</sub>, L<sub>268</sub>, W<sub>355</sub>, E<sub>364</sub>, G<sub>368</sub>, V<sub>369</sub>, N<sub>370</sub>, I<sub>374</sub>, L<sub>424</sub>, L<sub>499</sub>, K<sub>501</sub>, A<sub>502</sub>, V<sub>504</sub>, D<sub>508</sub>, S<sub>509</sub>, H<sub>512</sub>, Q<sub>513</sub>, L<sub>514</sub>, H<sub>517</sub>, W<sub>518</sub>, H<sub>522</sub>, I<sub>556</sub>, L<sub>559</sub>, A<sub>560</sub>, L<sub>564</sub>, I<sub>565</sub>, I<sub>570</sub>, T<sub>574</sub>, S<sub>585</sub>, Q<sub>715</sub>, Y<sub>718</sub>, N<sub>724</sub>, R<sub>725</sub>, P<sub>726</sub>, T<sub>727</sub>, I<sub>772</sub> y I<sub>862</sub>. Todos menos 7 de los 35 residuos conservados son residuos neutros o hidrófobos. La sustitución de un residuo cargado en la posición de glicina 368 de cebada o en otro residuo neutro o hidrófobo conservado que recubre la cavidad de sustrato II, es probable que desestabilice las propiedades estructurales y funcionales de la enzima. La mutación G→D<sub>368</sub> en LOX1 de línea G de cebada (♦) está localizada entre la hélice  $\alpha$  H6 y la lámina  $\beta$  E12.

Como se muestra en la Figura 22, la familia de enzimas lipooxigenasas comparte un alto grado de conservación de secuencia, que se refleja en su estructura secundaria conservada, determinada para varios miembros de la familia de lipooxigenasas vegetales incluyendo LOX1 y LOX3 de soja (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1997, *supra*). La LOX 1 de cebada comparte un 56,9% de identidad de secuencia y un 67,8% de similitud de secuencia con la LOX3 de soja. Se han identificado varios residuos aminoacídicos en la isoenzima LOX3 de soja como ligandos del hierro no hemo, o



se sugiere que son esenciales para su actividad (denominado \*). En vista de la alta conservación de secuencia entre la LOX1 de cebada y la LOX3 de soja, es razonable predecir que los residuos en la secuencia de LOX1 de cebada que son homólogos de los identificados como importantes para la función de LOX3 pueden ser también esenciales para la actividad enzimática. Por tanto, es probable que las sustituciones aminoacídicas no conservativas en cualquiera de estas posiciones, incluyendo las sustituciones de aquellos residuos de LOX1 de cebada correspondientes a los 35 residuos altamente conservados de LOX3 de soja que recubren la cavidad de sustrato y en otras posiciones esenciales para la actividad enzimática, reduzcan la actividad lipooxigenasa.

Los residuos aminoacídicos prolina y glicina son conocidos por facilitar los giros en la cadena principal peptídica cuando están localizados entre elementos de estructura secundaria, lo que permite a la proteína asumir una estructura terciaria plegada. Los residuos de prolina y glicina son también comunes en motivos de extremo de hélice (Parker y Hefford, 1997, Protein Eng., 10: 487-496, <http://www.expasy.ch>). La sustitución no conservativa individual en LOX1 de línea G, en que se reemplazó por aspartato una glicina localizada entre dos elementos estructurales predichos, condujo a una pérdida significativa de actividad enzimática. Se predice por tanto que la mutación del gen *lox-1* que causa sustituciones no conservativas en uno o más residuos de prolina o glicina en LOX1 de cebada, localizadas en regiones fuera de los elementos estructurales, puede evitar de forma similar el plegamiento de la proteína nativa y en consecuencia reducir la actividad de la enzima codificada.

Por tanto, en una realización, una planta de cebada mutante útil de la invención que tiene una actividad lipooxigenasa 1 reducida contiene una secuencia de ácido nucleico mutada que altera la naturaleza neutra o hidrófoba de la cavidad de sustrato de la enzima mediante la inserción de uno o más aminoácidos ácidos, básicos o polares. La secuencia de ácido nucleico útil [SEQ ID NO: 11] codifica una proteína LOX-1 de cebada [SEQ ID NO: 12] que tiene una sustitución en el aminoácido 368 de glicina a Xaa, en que Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, triptófano, asparagina o glutamina. Es una secuencia aminoacídica específica de LOX-1 mutante de cebada de la invención cuando Xaa es ácido aspártico, por ejemplo, la línea G.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, los cambios genotípicos en la línea G no tuvieron una influencia detectable en la expresión del gen *lox-1*, pero la actividad LOX-1 detectada en grano maduro y en germinación de la línea G era aproximadamente un 9% de la detectada en grano de la línea original, el cv Vintage. Para proporcionar una prueba directa de que la mutación aminoacídica en LOX-1 de la línea G era la responsable del fenotipo de pobre en LOX-1, se expresó transitoriamente la secuencia de codificación de *lox-1* de la línea G y *lox-1* del cv Vintage en protoplastos de aleurona de cebada, y se mostró que la actividad de la enzima LOX-1 mutante estaba reducida en gran medida en comparación con la enzima LOX-1 de tipo silvestre.

## 6. Transferencia entre líneas reproductoras

La detección de alteraciones en el carácter genético de las plantas de cebada del genotipo de la invención es útil para identificar la presencia de un carácter genético específico en una línea de cebada, y para facilitar la transferencia de este carácter entre líneas reproductoras en un programa de reproducción. Están disponibles una variedad de herramientas moleculares para la detección de alteraciones en la secuencia genómica. Dichos procedimientos incluyen, pero sin limitación, la detección de polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (Gebhardt y Salamini 1992, Int. Rev. Cytology, 135: 201-237) y procedimientos de detección cuantitativos basados en PCR tales como amplificación usando cebadores fluorescentes, por ejemplo, los sistemas de sonda de cebador TaqMan (Ibrahim *et al.*, 1998, Anal. Chem. 70, 2013-2017). La elección del procedimiento de detección dependerá del carácter genético específico, pero debe ser preferiblemente rápido y proporcionar datos claramente interpretables.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, se proporcionó un ensayo de PCR-sitio polimórfico amplificado por escisión (PCR-CAPS) para la detección del gen de lipooxigenasa 1 mutante de la línea G. La sustitución nucleotídica en el gen *lox-1* de la línea G en posición +2347 introdujo un sitio adicional de reconocimiento por la endonucleasa de restricción *AatII* que puede detectarse mediante el ensayo de PCR-CAPS. Los procedimientos de detección adecuados para *lox-1* no están limitados a este ensayo, sino que pueden estar basados igualmente en tecnología TaqMan y otros procedimientos de detección conocidos.

Se muestra también en los ejemplos siguientes que se aplicó el ensayo PCR-CAPS a 4 generaciones de material reproductivo de un programa de retrocruzamiento, en que el fenotipo pobre en lipooxigenasa de la línea G se retrocruzó sistemáticamente en el cv Alexis. Se mostró que la herencia del fenotipo pobre en lipooxigenasa seguía la herencia del gen *lox-1*, se identificó el fenotipo como recesivo y observado solo en líneas homocigóticas del gen *lox-1*.

Por consiguiente, la progenie vegetal de la invención incluye líneas reproductivas, por ejemplo, derivadas de un programa de retrocruzamiento, que contienen *lox-1* mutante y expresan un fenotipo pobre en lipooxigenasa.

## 7. Fabricación de cerveza

Se demuestra en la presente memoria que las plantas de cebada de la invención, incluyendo partes de planta, progenie vegetal, grano, malta y mosto, que tienen baja actividad lipooxigenasa 1, son útiles para la fabricación de

una bebida que tiene niveles reducidos de trans-2-nonenal libre durante un periodo de tiempo medido, o en condiciones de elevada temperatura de almacenamiento, en comparación con una bebida producida a partir de una variedad de cebada de control de tipo silvestre. Con el fin de estas comparaciones, se controla el contenido de sulfito de la cerveza a 5 ppm o menos, puesto que se reconoce que niveles de sulfito mayores en el momento del embotellado retardarán temporalmente la aparición de trans-2-nonenal libre. Por ejemplo, la cerveza fabricada a partir de malta derivada de la línea G de cebada mutada descrita en la presente memoria poseía propiedades organolépticas estabilizadas durante un periodo medido de tiempo en comparación con la cerveza fabricada a partir de malta derivada de una cebada de control no mutada.

Los ensayos de fabricación de cerveza y de evaluación de la cerveza embotellada proporcionan el mejor procedimiento para la evaluación de la influencia de los diferentes ingredientes sobre la calidad y estabilidad de la cerveza acabada. Para ensayar la influencia de las diferentes maltas de cebada, se necesita suficiente grano de cebada para efectuar los ensayos de malteado y fabricación de cerveza a escala piloto y escala semi-industrial. Durante el periodo de propagación de cebada, puede evaluarse el rendimiento de campo de la línea de cebada. Pueden evaluarse las propiedades de malteado de una línea de cebada durante el malteado a escala piloto o industrial, y preferiblemente deben encontrarse dentro de las recomendaciones de calidad de malteado nacionales, por ejemplo, las recomendaciones de la European Brewing Convention para la calidad del malteado (Analytica-EBC/European Brewing Convention, 1998, Publ. Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Alemania). Después de la fabricación de cerveza a escala piloto o semi-industrial, se envasa la cerveza en botellas marrones y se enfría a 5°C para un almacenamiento óptimo. En esta etapa, puede analizarse la cerveza fresca por paneles de degustación entrenados para detectar aromas de cerveza específicos, incluyendo el compuesto de aroma desagradable trans-2-nonenal. Adicionalmente, se analizan químicamente en la cerveza los componentes aromáticos principales, incluyendo trans-2-nonenal. Estos procedimientos de análisis de calidad de la cerveza se repiten entonces en la cerveza después de diversas condiciones de almacenamiento conocidas por revelar la estabilidad al almacenamiento a largo plazo de la cerveza, por ejemplo, tratamientos de envejecimiento forzado.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, se propagó cebada de línea G en el campo durante varias estaciones para maltear 10 ton de esta línea en una maltería industrial. Se maltearon en condiciones similares las variedades de cebada de control de cv Vintage y cv Nevada, ambas con el fenotipo LOX-1 de tipo silvestre. La malta horneada de la línea G y cultivares de cebada de control se encontraba dentro de las especificaciones necesarias para los ensayos de fabricación de cerveza a escala semi-industrial.

Se efectuaron ensayos de fabricación de cerveza a escala de 30 hl y una evaluación de las cervezas recién embotelladas reveló que las cervezas fabricadas a partir de malta tanto de la línea G como de los cultivares de control tenían un contenido de trans-2-nonenal inferior al umbral de gusto y se consideraron satisfactorias por un panel de degustación. Se usaron dos tratamientos de envejecimiento forzoso, almacenamiento a 37°C durante 7 días o almacenamiento durante 6 a 12 semanas a 30°C, para evaluar la estabilidad aromática de la cerveza. Se encontró que la estabilidad aromática de la cerveza fabricada a partir de malta de la línea G era superior a la de la malta de control, tanto con respecto a la evaluación del panel de degustación como al nivel de trans-2-nonenal libre, y se encontró que la mejora era estadísticamente significativa.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### **Cribado y selección de mutantes de isoenzima lipooxigenasa a partir de cebada mutagenizada**

##### **1. Mutagénesis de cebada**

Se mutagenizaron granos de cebada, *Hordeum vulgare* cv Vintage y cv Caruso, con azida de sodio según un procedimiento publicado (Kleinhofs *et al.*, 1978 *Mutation Research* 51: 29-35). La mutagénesis introduce mutaciones puntuales en el ADN genómico que pueden dar como resultado, por ejemplo, cambios aminoacídicos en las proteínas codificadas. Se propagaron los granos de M1 mutados en invernadero a lo largo de dos generaciones, y se recogió el grano de M3 para cribado. La frecuencia observada de mutantes del rasgo génico individual en la generación M2, según Kleinhofs *et al.*, 1978, *supra*, es de 1,0-2,7 mutantes por 10.000 granos de la generación M2. Puesto que la mayoría de las mutaciones génicas son recesivas y solo detectables en el estado homocigótico, se crió la población mutagenizada en la generación M3, en que la proporción esperada de grano mutante homocigótico sería mayor. Se esperaba una frecuencia de mutación de 0,9-2,3 por 10.000 granos en el material mutagenizado en M3.

##### **2. Un ensayo no destructivo de la actividad lipooxigenasa 1 (LOX-1) y lipooxigenasa 2 (LOX-2) en grano mutagenizado en M3**

Se desarrolló un procedimiento de cribado rápido para la detección de grano de cebada mutante con actividad LOX-1 reducida con los siguientes criterios: el procedimiento de cribado no debe evitar la propagación del grano/plántula; el grano/tejido de plántula seleccionado debe expresar niveles cuantificables de actividad lipooxigenasa; el ensayo debe distinguir la actividad LOX-1 de la LOX-2 y el procedimiento de ensayo debe englobar múltiples muestras.

Se ensayaron los niveles de actividad lipooxigenasa total en diferentes tejidos de grano en germinación, a saber brote, raíz y tejido de escutelo de embrión y endosperma como sigue: Se prepararon extractos de tejido de plántula de cebada homogeneizando el tejido con Tris-HCl 20 mM enfriado con hielo a pH 7,5, que contiene NaN<sub>3</sub> 2 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM (PMSF), seguido de la retirada del material insoluble mediante centrifugación a 1000 g durante 10 minutos. Se ensayó la actividad lipooxigenasa en un extracto de 100 µl a 25°C mediante la adición de 2,9 ml de sustrato ácido linoleico 20 mM, preparado dispersando 35 µl de ácido linoleico (ácido libre, L-1376, Sigma, EE.UU.) en 5 ml de H<sub>2</sub>O que contiene 1% de Tween 20. Se siguió espectrofotométricamente la reacción, en que la tasa de aumento de absorbancia a 234 nm (A<sub>234 nm</sub>), debida a la formación de dieno conjugado en el producto hidroperóxido, es proporcional a la actividad enzimática presente. Una unidad de actividad lipooxigenasa se define como ΔA<sub>234</sub>= 0,001 por minuto en una reacción de 3 ml, equivalente a la oxidación de 0,12 µmol de ácido linoleico.

El tejido de hoja de grano germinado durante 4 días en la oscuridad tenía los niveles mayores detectados de actividad lipooxigenasa (Holtman *et al.*, 1996, Plant Physiology 111: 569-576). Se seleccionaron por tanto puntas de hoja de plántulas de 4 días para el ensayo de cribado no destructivo de lipooxigenasa. Se ensayó el pH óptimo de la actividad lipooxigenasa de cebada total a entre pH 4,5 y pH 9,0 y se encontró que era de pH 6,5. Por tanto, se seleccionó un tampón HEPES 25 mM (pH 6,5) que contenía ácido bórico 0,2 M para el ensayo de cribado.

Puesto que tanto la enzima LOX-1 como LOX-2 se inmutodetectaron en brotes de plántulas de 4 días (Holtman *et al.*, 1996, *supra*), se usó un ensayo específico de LOX-1 y LOX-2. Se encontró que el inhibidor de lipooxigenasa ácido nordihidroguayarático (NDGA), identificado por Eskin *et al.*, 1977, Crit. Rev. Food, Science and Nutrition 9: 1-40, era un inhibidor selectivo de lipooxigenasas de cebada. NDGA a 1 x 10<sup>-5</sup> M inhibía fuertemente LOX-2 de cebada purificada, mientras que LOX-1 retenía un 47% de actividad (**Figura 1**). Se ensayó la selectividad de este inhibidor en el ensayo de punta de hoja, determinando la relación de 9-hidroperoxioctadecanoide (9-HPOD) a 13-hidroperoxioctadecanoide (13-HPOD), que son el resultado de la oxidación de ácido linoleico por LOX-1 y LOX-2, respectivamente. En el ensayo de lipooxigenasa de puntas de hoja del cv Vintage, la proporción de 13-HPOD formado cayó de 24,5% a 9,5% tras la adición de NDGA 1 x 10<sup>-5</sup> M.

Se basó un ensayo selectivo de actividad LOX-2 en extractos de punta de hoja en el uso de un anticuerpo monoclonal específico de LOX-1 (5D2) (Holtman *et al.*, 1996, *supra*) para inmunoprecipitar la LOX-1 presente en los extractos. La actividad lipooxigenasa residual detectada en los extractos después de la precipitación de LOX-1 proporcionó una medida de la actividad LOX-2. Se evaluó la eficacia de esta inmunoprecipitación (descrita a continuación) cuantificando la LOX-1 y LOX-2 residual en el sobrenadante del extracto mediante ensayo ELISA, usando anticuerpos monoclonales específicos frente a LOX-1 (denominado 5D2) y LOX-2 (denominado 5.8) (Holtman *et al.*, 1996, *supra*). La inmunoprecipitación de LOX-1 de extractos de punta de hoja del cv Vintage retiró un 85% de proteína LOX-1 y un 15% de proteína LOX-2.

Se efectuó la inmunoprecipitación en una placa de 96 pocillos de fondo en V añadiendo 5 µl de Dynabeads recubiertos con 5D2 (Dynal) y 75 µl de tampón [Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, 1% v/v de suero de ternero (HyClone)] a 20 µl de cada extracto de punta de hoja. Se incubó la placa en un agitador de placa de valoración (MTS4, IKA, Labor Technik) durante 1 hora a 4°C. Se sedimentó el inmunoprecipitado mediante centrifugación a 4°C en una centrífuga Sigma 302-K durante 10 minutos a 2000 rpm. Se ensayó en el sobrenadante (70 µl) de cada muestra la actividad lipooxigenasa en una placa de 96 pocillos de fondo plano, como se describe a continuación, pero con la adición de 100 µl de tampón de ensayo (HEPES 25 mM, ácido bórico 0,2 M, pH 6,5).

Se adaptaron los ensayos de LOX-1 y LOX-2 para un procedimiento de cribado de alto rendimiento. Se homogeneizaron individualmente puntas de hoja (1 cm) de 8 granos germinados 4 días en 150 µl de tampón enfriado con hielo (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) durante 2 x 30 segundos en un homogeneizador multipocillos (Berg *et al.*, 1992, Electrophoresis 13: 76-81). Después de la centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm, se transfirieron 40 µl del sobrenadante de cada extracto a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron a cada pocillo 170 µl de tampón (HEPES 25 mM, ácido bórico 0,2 M, pH 6,5, NDGA 1 x 10<sup>-5</sup> M) y 10 µl de sustrato (ácido linoleico 20 mM) y se incubaron entonces durante 20 minutos a 25°C. Se terminó la reacción mediante la adición de 20 µl de solución saturada de yoduro de potasio (KI) y se incubó durante 8 minutos adicionales a 25°C. La reacción redox entre hidroperoxidienos y KI proporcionó I<sub>2</sub>, que se monitorizó por su máximo de extinción a 350 nm en un lector de microplaca (Multiskan MCC/340).

### 3. Identificación de mutantes de lipooxigenasa 1 potenciales en grano de M3 y M4 de cebada mutagenizada

Se almacenó grano de la generación M3 del cv Vintage y el cv Caruso a 45°C durante 6,5 días para interrumpir la dormancia, asegurando una frecuencia de germinación de un 95%. Se germinó grano M3 de cv Vintage (9318) y de cv Caruso (9633) y se cribaron las líneas cuya actividad LOX-1 fuera un 15% o menor que la del grano de tipo silvestre. Se propagaron las presuntas líneas mutantes (50 líneas de cv Vintage y 42 de cv Caruso) hasta la generación M4, se recogieron y se volvió a cribar el grano germinado. Se confirmó el fenotipo LOX-1 mutante en una línea de cv Vintage y en 6 líneas de cv Caruso, después de medir la actividad lipooxigenasa en extractos de 5 puntas de hoja de cada línea. Cuando se examinaron las actividades LOX-1 y LOX-2 en embriones en germinación de estos 7 presuntos mutantes, solo el mutante de cv Vintage (denominado línea G) mostraba una reducción importante de LOX-1. En grano quiescente maduro, la actividad lipooxigenasa presente en el embrión es casi

exclusivamente actividad LOX-1, debido al patrón de expresión diferencial de las dos isoenzimas (Schmitt y van Mechelen, 1997, Plant Sci. 128: 141-150). La actividad lipooxigenasa total en extractos de embriones de grano seco maduro de la línea G (generación M5) era de  $0,06 \pm 0,04$  U/mg de proteína en comparación con  $0,74 \pm 0,44$  U/mg de proteína en extractos de embrión del cv Vintage, como se determina mediante el ensayo espectrofotométrico de lipooxigenasa descrito en la sección 2 del ejemplo 1. Se encontró que la actividad lipooxigenasa residual en los embriones maduros de la línea G tanto de la generación M4 como M5 era de aproximadamente un 9% de la línea original.

## Ejemplo 2

### La línea G es un mutante del cv Vintage con un fenotipo pobre en lipooxigenasa

Se analizaron las propiedades agronómicas y el fenotipo mutante de la línea G en material de la generación M5. Los análisis iniciales se realizaron para confirmar que el material de M5 analizado era homocigótico del fenotipo mutante. El fenotipo pobre en LOX-1 de la línea G, detectado en la generación M3, podría ser el resultado de una mutación dominante o recesiva. Si la línea G seleccionada en la generación M3 fuera heterocigótica de una mutación dominante, entonces las generaciones posteriores mostrarían segregación por el fenotipo. Se midió la actividad lipooxigenasa en 26 embriones individuales de la línea G de grano quiescente de la generación M5 y se comparó con embriones de tipo silvestre del cv Vintage. La actividad de lipooxigenasa en todos los embriones de la línea G era muy baja, con una media de  $0,06 \pm 0,04$  U de lipooxigenasa por mg de proteína, en comparación con  $0,74 \pm 0,44$  U de lipooxigenasa por mg de proteína en embriones de cv Vintage de tipo silvestre. Estos datos confirmaron que la línea G en la generación M5 era homocigótica del rasgo pobre en lipooxigenasa.

#### 1. La línea G tiene una fisiología de crecimiento de planta y desarrollo de grano de tipo silvestre

Se germinó grano de la línea G y del cv Vintage y se cultivó en una cámara climatizada con 16 horas de luz a 15°C y 8 horas de oscuridad a 12°C a una humedad relativa de un 80%. Las características de crecimiento de las plantas de la línea G y del cv Vintage fueron similares con respecto a la altura de planta, número de vástagos por planta, inicio de floración y número de granos por espiga. El peso húmedo (**Figura 2**) y peso seco (**Figura 3**) del grano de línea G y del cv Vintage durante el desarrollo desde 5 días después de la floración (DDF) hasta la maduración completa, aproximadamente 90 DDF, fueron muy similares.

#### 2. El grano de línea G tiene un fenotipo pobre en lipooxigenasa 1 a lo largo del desarrollo

Se midió la actividad lipooxigenasa en extractos de grano de cebada en desarrollo de línea G (generación M5) y cv Vintage de tipo silvestre. Se homogeneizó el grano en tampón Tris-HCl 20 mM enfriado en hielo a pH 7,5 que contenía 0,1% (v/v) de Nonidet P-40, un detergente no iónico que potencia la extracción de lipooxigenasa, y se centrifugó a 15.000 g durante 20 minutos para retirar el material insoluble. Se midió polarográficamente la actividad lipooxigenasa en los extractos en 200  $\mu$ l de tampón saturado con oxígeno (ácido bórico 0,2 M, HEPES 25 mM, pH 6,5) que contenía ácido linoleico 1,2 mM a 25°C, usando un electrodo de tipo Clark para medir el consumo de oxígeno. La actividad lipooxigenasa aumentó durante los primeros 20 días de desarrollo de grano tanto en grano de línea G como de tipo silvestre, pero solo en la línea G cayó el nivel de actividad durante la maduración de grano (**Figura 4**).

Las cantidades relativas de 9-HPOD y 13-HPOD formadas durante la oxidación de ácido linoleico proporcionan una medida de los niveles de actividad LOX-1 y LOX-2 en los extractos de grano. En este caso, se omitió Nonidet P-40 del tampón de extracción de grano para evitar la coextracción de enzimas consumidoras de hidropéroxido. Se incubaron los extractos (100  $\mu$ l), mezclados con 10 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 6,5, que contenían ácido linoleico 200  $\mu$ M, durante 20 minutos. Se terminó la reacción ajustando el pH a 3,5, y se añadió un patrón interno. Se unieron los hidropéroxidos formados en el ensayo con una columna en fase sólida de octadecilo (Bakerbond, Baker) y se eluyeron con metanol. Se separaron entonces 9-HPOD y 13-HPOD mediante HPLC en fase inversa en una columna C-18 con un disolvente de elución isocrática (tetrahidrofurano:metanol:H<sub>2</sub>O:ácido acético; 25:30:44.9:0,1 (v/v) ajustado a pH 5,5 con amoniaco concentrado) a un caudal de 0,5 ml/minuto como se describe por Aarle *et al.*, 1991, FEBS Letters 280: 159-162. Se detectaron los hidropéroxidos a 234 nm y se corrigieron los picos de HPOD frente al patrón estándar, prostaglandina B2.

La **Figura 5** muestra que el 13-HPOD era el producto principal de actividad lipooxigenasa presente en grano durante los primeros 20 DDF, mientras que el 9-HPOD se formaba por lipooxigenasas activas durante la maduración de grano. Aunque tanto los extractos de grano de línea G como de tipo silvestre compartían un perfil similar de actividad sintetizadora de 13-HPOD, la línea G no mostraba el aumento de actividad sintetizadora de 9-HPOD del tipo silvestre. Estos datos son consistentes con la pérdida de actividad LOX-1 en grano de cebada de línea G en maduración.

#### 3. El grano de línea G tiene un fenotipo pobre en lipooxigenasa 1 en germinación

Se ensayó la actividad lipooxigenasa en extractos de embriones de grano germinados a 15°C como se describe en el ejemplo 1. La actividad lipooxigenasa presente en grano de tipo silvestre quiescente se redujo durante los

primeros 4 días de germinación y aumentó después (**Figura 6**). En la línea G, la actividad lipooxigenasa en grano quiescente era muy baja pero aumentó después de 4 días.

El análisis de los HPOD formados por la actividad lipooxigenasa en embriones en germinación mostró que el 9-HPOD era el producto principal de las lipooxigenasas presente en grano de tipo silvestre quiescente (**Figure 7**). El nivel de formación de 9-HPOD cayó con la reducción de la actividad lipooxigenasa en los extractos. El aumento de actividad lipooxigenasa después de 4 días estuvo acompañado por la formación tanto de 9-HPOD como de 13-HPOD. La baja actividad lipooxigenasa de grano quiescente de línea G estaba asociada a la ausencia de formación de HPOD, mientras que el aumento de actividad después de 4 días produjo principalmente 13-HPOD. Estos datos proporcionan pruebas de que la actividad LOX-1 que conduce a la formación de 9-HPOD está reducida en gran medida en los embriones tanto de grano de cebada en desarrollo, quiescente, como en germinación de la línea G, mientras que la actividad LOX-2 que conduce a la formación de 13-HPOD está intacta en la línea G.

### Ejemplo 3

#### La línea G tiene un gen de lipooxigenasa 1 (*lox-1*) mutante que causa un fenotipo pobre en lipooxigenasa

Se investigó la base molecular del fenotipo de pobre en LOX-1 de la línea G para proporcionar una descripción completa del mutante. Se efectuaron los siguientes análisis para proporcionar una caracterización completa del fenotipo:

##### 1. Se sintetiza lipooxigenasa 1 en grano en desarrollo y en germinación de la línea G

Se efectuaron análisis mediante Western blot de extractos de embriones de grano de cebada en desarrollo y en germinación en paralelo con la medida de la actividad lipooxigenasa, como se describe en el ejemplo 2. Se separaron los extractos brutos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) según Laemmli, 1970, Nature 227: 680-685. Se transfirieron las proteínas separadas a nitrocelulosa mediante transferencia semiseca, según Towbin *et al.*, (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354. Se sondeó la transferencia con el anticuerpo monoclonal específico de LOX-1, 5D2, como se describe en Holtman *et al.*, 1996, Plant Physiology 111: 569-576, a una dilución de 500x, seguido de la incubación con anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado con fosfatasa alcalina, y se detectó con los sustratos de fosfatasa alcalina nitroazul de tetrazolio y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo como se describe en Holtman *et al.*, 1996, Plant Physiol. 111: 569-576. Los análisis Western revelaron que la proteína LOX-1 se detectaba en grano en desarrollo desde 10 DDF en embriones del cv Vintage y que el nivel aumentaba durante la maduración del grano (**Figura 8**). La proteína estaba también presente en el embrión de grano quiescente del cv Vintage, pero se reducía lentamente durante la germinación (**Figura 9**). Aunque se reconoce LOX-1 en extractos de embriones de línea G y migra en PAGE-SDS como una proteína de tamaño similar a LOX-1 del cv Vintage, los niveles inmunodetectables de proteína en la línea G fueron ligeramente menores que en el cv Vintage.

##### 2. El gen *lox-1* se expresa en el grano en desarrollo y en germinación de la línea G

Se aisló ARN total de embriones de grano de cebada en desarrollo y en germinación según el procedimiento de Hensgens y van Os-Ruygrok, 1989, Rice Genet. Newslett. 6: 163-168, en paralelo con la medida de la actividad lipooxigenasa descrito en el ejemplo 2. Se separaron las muestras de ARN (7,5 µg) en geles de agarosa desnaturizante y sometieron a transferencias Northern como se describe en Sambrook *et al.*, 1989 en "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY. Se hibridaron las transferencias con una sonda marcada con <sup>32</sup>P generada a partir de la región 3' no traducida de cebada, nucleótidos 2659-2801 [SEQ ID NO:1] del ADNc de *lox-1* (nº de acceso EMBL L35931) como se describe en Holtman *et al.*, 1996 Plant Physiol. 111: 569-576, usando el kit Amersham Random Prime.

Se detectaron transcritos de *lox-1* que codifican LOX-1 en embriones de grano en desarrollo y maduro del cv Vintage y línea G desde 30 DDF (**Figura 10**). El nivel de transcritos de *lox-1* aumentaba durante la germinación tanto en embriones del cv Vintage como de línea G, indicando la expresión *de novo* del gen *lox-1* (**Figura 11**). Puesto que los niveles detectables de transcritos de *lox-1* eran similares en embriones de línea G y del cv Vintage, ni una transcripción de *lox-1* reducida ni una estabilidad de transcrito reducida pueden dar cuenta del fenotipo pobre en lipooxigenasa de la línea G.

##### 3. El gen *lox-1* de la línea G codifica una forma mutante de lipooxigenasa 1

Se analizaron la secuencia nucleotídica del gen *lox-1* de la línea G y del cv Vintage y se compararon para determinar la base molecular del fenotipo pobre en LOX-1 de la línea G, que se caracteriza por una transcripción normal del gen *lox-1*, pero con una acumulación y actividad reducida en la enzima lipooxigenasa expresada en grano.

Se aisló ADN genómico de la línea G y del cv Vintage de tipo silvestre a partir de tejido de hoja de plántula según un procedimiento descrito por Pich y Schubert 1993, Nucleic Acids Res. 21: 3328. Se amplificó el gen *lox-1* en las preparaciones de ADN genómico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores basados en la secuencia del gen *lox-1* de cebada (van Mechelen *et al.* 1995, BBA 1254: 221-225; Rouster *et al.*, 1997, Plant

J. 11: 513-523). La posición y secuencia de los cebadores oligonucleotídicos usados para amplificar el promotor de *lox-1* y las regiones de codificación, indicadas en la **Figura 12**, fueron las siguientes

Se usaron el cebador sentido 5'-GAA AAG CTT GGA GGT AGA CGC TGC-3' [**SEQ ID NO:2**] y el cebador antisentido 5'-TAT AGG ATC CTT GTT CTT GGC CTC CTC TCC TCG-3' [**SEQ ID NO:3**] para amplificar por PCR el dominio promotor de *lox-1* (-361 a +68) de *lox-1* de la línea G y del cv Vintage.

Se usaron el cebador sentido 5'-ACT GAA AAA CAG TGT GCT GGT G-3' [**SEQ ID NO:4**] y el cebador antisentido 5'-GGC TTA AAG AGC AAC TGC TGA-3' [**SEQ ID NO:5**] para amplificar por PCR la región de codificación de *lox-1* de la línea G.

Se usaron el cebador sentido 5'-CAA GAT GCA TAT GCT GCT GGG AG-3' [**SEQ ID NO:6**] y el cebador antisentido 5'-CGA TGG TTT AAA TTA GAT GGA GAT GCT GT-3' [**SEQ ID NO:7**] para amplificar por PCR la región de codificación de *lox-1* del cv Vintage.

Las reacciones PCR consistían en 250 ng de ADN genómico en un volumen de 50 µl que contenía 50 pmol de cebador y 2 U de ADN polimerasa Pfu (Promega) según las instrucciones de los suministradores de enzima. Se llevaron a cabo las amplificaciones por PCR en un Robocycler de Stratagene: 1 minuto a 94°C, 1 ciclo; 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 62°C y 5 minutos a 72°C, 30 ciclos; 10 minutos a 72°C, 1 ciclo. Se separaron los productos de PCR en geles de agarosa al 1,2%. Se purificaron los fragmentos de ADN correspondientes en longitud a la región amplificada usando el kit de extracción en gel Qiax II (Qiagen) y se clonaron en el plásmido pcDNA2.1 (Invitrogen). Se determinó la secuencia nucleotídica de ambas hebras del promotor de *lox-1* clonado y de las regiones de codificación usando la reacción de terminación de cadena didesoxinucleotídica con cebadores oligonucleotídicos específicos, y se analizaron en un analizador genético ABI PRISM® 310 (PE Biosystems). Se efectuaron las comparaciones de secuencia usando el paquete de software de análisis de secuencia DNA STAR (DNA STAR Inc., EE.UU.).

Se muestran la región promotora y la estructura intrónica-extrónica de la región codificante de *lox-1* de cebada en la **Figura 13**, y se dedujeron a partir de una comparación de la secuencia nucleotídica de las secuencias genómicas y de ADNc de *lox-1* de tipo silvestre (**Figura 12**). La región secuenciada de la región promotora de *lox-1* de -363 a +68, (numerada respecto al sitio de inicio de la transcripción determinado; van Mechelen *et al.*, 1995, **BBA** 1254: 221-225), es suficiente para dirigir la expresión génica específica de embrión y regulada temporalmente característica del gen nativo (Rouster *et al.*, 1998, **Plant J.** 15: 435-440). La región promotora y transcrita del gen *lox-1* de tipo silvestre [**SEQ ID NO:8**] es de 4663 nt de longitud y contiene 6 intrones de entre 82 nt y 634 nt de longitud, que están ausentes del ADNc respectivo [**SEQ ID NO:10**] y por lo tanto deben retirarse durante el corte y empalme del transcrito de ARN.

La comparación de la secuencia nucleotídica de *lox-1* de la línea G con la del tipo silvestre (**Figura 12**) mostró que el alelo *lox-1* de la línea G tiene dos mutaciones puntuales. Una es una sustitución C→T silenciosa en posición 221 del exón 1, y la segunda es una sustitución G→A en posición 2347 del exón 3 (**Figura 13**). El gen *lox-1* de cebada de tipo silvestre codifica una proteína de 862 residuos aminoacídicos [**SEQ ID NO:9**], mientras que la mutación en posición 2347 en el alelo *lox-1* de la línea G causa una sustitución aminoacídica de glicina por ácido aspártico en el residuo 368 de la proteína codificada.

El alineamiento de lipooxigenasas vegetales relacionadas indicó que la glicina 368 en LOX-1 de cebada está altamente conservada. Además, este residuo, que corresponde a la glicina 353 en LOX-1 de soja, es uno de los 51 residuos neutros o hidrófobos que recubren la cavidad de sustrato de la enzima, como se observa en su estructura cristalina (Minor *et al.*, 1996, **Biochemistry** 35: 10687-10701) y se muestra en la Figura 22. La inserción de un residuo aminoacídico cargado en esta posición es por tanto posible que perturbe las propiedades estructurales y funcionales de la enzima.

#### **4. La proteína LOX-1 mutada codificada por el alelo *lox-1* de la línea G tiene una baja actividad enzimática y es responsable del fenotipo pobre en lipooxigenasa de la línea G**

La mutagénesis por azida de sodio de grano del cv Vintage, que introducía el alelo *lox-1* mutado en la línea G, puede haber inducido mutaciones adicionales en el genoma de la línea G. Se han tomados dos enfoques experimentales para demostrar que el alelo *lox-1* mutante en la línea G es responsable de su fenotipo pobre en lipooxigenasa, en lugar de otras mutaciones en el genoma. Se ha determinado la actividad enzimática de LOX-1 codificada por el alelo *lox-1* mutante y de tipo silvestre para probar que la sustitución de glicina→ácido aspártico en la enzima mutante causa la estabilidad y actividad reducidas. Se expresaron transitoriamente los dos genes *lox-1* en protoplastos de aleurona aislados de grano maduro embebido, puesto que se esperaba que el nivel de expresión endógena de lipooxigenasa en estas células estuviera por debajo de los límites de detección. No se detectan en el tejido de aleurona ninguno de los genes de lipooxigenasa de cebada identificados, que se expresan en cebada en germinación (van Mechelen *et al.*, 1999 *supra*). Para dirigir la expresión directa del gen *lox-1* en protoplastos de aleurona, se fusionaron por traducción sus regiones codificantes con un promotor constitutivo conocido por ser activo en estos protoplastos.

Se escindieron mediante la digestión de los sitios *KpnI* y *EcoRV* en un sitio de clonaje múltiple vectorial las regiones codificantes del gen *lox-1* mutante (posiciones de secuencia +1 a +4350) y de tipo silvestre (posiciones de secuencia +69 a +4230) y el ADNc de *lox-1* de tipo silvestre (posiciones de secuencia +69 a +2654), clonadas cada una en el plásmido pcDNA2.1 (véase la sección 3). Se clonaron las regiones codificantes en el plásmido pUBARN (Jensen *et al.*, 1998, *Hereditas* 129: 215-225) entre el promotor de ubiquitina de maíz constitutivamente activo Ubi (como se describe en la patente de EE.UU. n° 005510474A) y el terminador *Nos*, en lugar del gen *bar* que codifica la fosfotricina acetiltransferasa (**Figura 14**).

Se aislaron protoplastos del tejido de aleurona de *Hordeum vulgare* cv Himalaya embebida según el protocolo de Skriver *et al.* 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7266-7270. Se transfectaron alícuotas de  $2 \times 10^5$  protoplastos a 0°C con ~100 µg de ADN de plásmido (cantidades equimolares de cada plásmido) mediante la captación de ADN mediada por polietilenglicol (PEG) (Lee *et al.*, 1997, *Plant Mol. Biol.* 13: 21-29), y se incubaron entonces en medio de cultivo de protoplastos de aleurona a 25°C como se describe anteriormente (Skriver *et al.*, 1991 *supra*). Después de 48 horas de incubación, se retiró cuidadosamente el medio de cultivo, se resuspendieron los protoplastos y se homogeneizaron en 300 µl de tampón de ensayo de lipooxigenasa (ácido bórico 0,2 mM, HEPES 25 mM, pH 6,5). Se centrifugaron los homogeneizados a 15.000 g durante 5 minutos para sedimentar el material insoluble, y se ensayó posteriormente en los sobrenadantes (10 µl) la actividad lipooxigenasa total usando el ensayo de cribado rápido descrito en el ejemplo 1, sección 1, pero con la omisión del inhibidor NDGA. Se midió el contenido de proteína de los extractos de protoplasto mediante un ensayo de unión a tinte de Bradford (Bradford 1976, *Anal. Biochem.* 72: 248) suministrado por Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU., y se expresó la actividad lipooxigenasa por mg de proteína en el extracto.

Los protoplastos transfectados con el plásmido de control, pUBI-GUS, en que el promotor de maíz ubiquitina 1 dirige la expresión del gen informador de β-glucuronidasa, no dieron actividad lipooxigenasa detectable. Las expresiones transitorias del gen *lox-1* de tipo silvestre y del ADNc en protoplastos dieron ambas altos niveles de actividad lipooxigenasa en los extractos de protoplasto (**Figura 15**). La mayor expresión del ADNc de *lox-1* de tipo silvestre en comparación con la secuencia genómica puede ser debida a una mayor frecuencia de transfección para el menor plásmido de expresión de ADNc de *lox-1* (4929 pb frente al constructo génico *lox-1* de 6505 pb). La expresión transitoria del gen *lox-1* mutante dio bajos niveles de actividad lipooxigenasa, ~10% de la actividad lipooxigenasa de tipo silvestre. Estos datos demuestran claramente que el gen *lox-1* mutante de la línea G codifica una lipooxigenasa con actividad reducida en gran medida, que da cuenta del fenotipo pobre en lipooxigenasa.

#### 30 Ejemplo 4

##### Ensayo de PCR-sitio polimórfico amplificado por escisión (PCR-CAPS): un procedimiento usado para la identificación del gen *lox-1* mutante

Se desarrolló un procedimiento analítico que permitía la identificación del gen *lox-1* mutante de la línea G en cualquier fondo genético basándose en el ensayo de PCR-CAPS. El ensayo implica una amplificación por PCR de fragmentos de ADN genómico, seguido de la digestión de las secuencias amplificadas con una endonucleasa de restricción específica para exponer un polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP).

La secuencia codificante del gen *lox-1* mutante alberga dos mutaciones puntuales (véase el ejemplo 3), en que la mutación en la posición 2347 (**Figura 12**) introduce un sitio de escisión de endonucleasa de restricción *Aat* II adicional no encontrado en el gen *lox-1* de tipo silvestre (**Figura 16**). El siguiente ensayo de PCR-CAPS, basado en el polimorfismo creado por la presencia de este sitio de restricción en el gen *lox-1*, se muestra que discrimina entre un gen *lox-1* de tipo silvestre y un gen *lox-1* mutado.

Se aisló ADN genómico de hojas jóvenes de plántulas M6 de *Hordeum vulgare*, L. cv Vintage y de línea G según el procedimiento de Pich y Schubert (1993, *supra*). Se amplificó por PCR la secuencia de ADN que engloba la posición 2347 (sitio de mutación del gen *lox-1* de la línea G), usando cebadores específicos del gen *lox-1* [**SEQ ID NO:8**]. Se muestran en la **Figura 17** los fragmentos de ADN amplificados por el cebador de codificación 5'-CGCTACGACGTCTACAACGA-3' [**SEQ ID NO:13**] y el cebador inverso 5'-AGACTACTTTTGGCGGGA-3' [**SEQ ID NO:14**] seleccionados. Se llevaron a cabo las reacciones de PCR con 250 ng de ADN genómico en un volumen de 50 µl que contenía 50 pmol de cada cebador y 1 unidad de ADN polimerasa Taq (Promega) según las instrucciones de los suministradores. Se llevaron a cabo las amplificaciones por PCR en un Robocycler de Stratagene como sigue: 1 minuto a 94°C, 1 ciclo; 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos a 60°C y 2 minutos a 72°C, 30 ciclos; 10 minutos a 72°C, 1 ciclo. Los fragmentos amplificados del gen *lox-1* mutante y de tipo silvestre eran de ~650 pb (**Figura 18**), correspondientes al tamaño esperado (**Figura 17**). Se digirieron los productos de PCR, purificados en una columna de centrifugación (Qiagen), con 25 unidades de endonucleasa de restricción *Aat* II durante 24 horas a 37°C y se analizaron en un gel de agarosa al 1,2%.

La digestión del producto de PCR de *lox-1* de tipo silvestre proporcionó fragmentos de ADN de 10, 179, y 462 pb, y los fragmentos del producto de PCR de *lox-1* mutante fueron de 10, 149, 179 y 313 pb, en que los fragmentos de ADN adicionales fueron debidos a la digestión parcial del producto de PCR de *lox-1* (**Figura 19**). El patrón de fragmentos corresponde al RFLP resultante de esta mutación, en que el fragmento de 313 pb es único del *lox-1* mutante. Este ensayo PCR-CAPS proporciona una herramienta reproducible y específica para la identificación del

alelo *lox-1* en cebada y por tanto puede explotarse en programas de reproducción de cebada orientados a introducir este gen en nuevas variedades de cebada.

#### Ejemplo 5

#### 5 El retrocruzamiento del fenotipo pobre en lipooxigenasa de la línea G con el cv Alexis demuestra un ligamiento genético con el gen *lox-1* mutante

Se usó el retrocruzamiento repetido para transferir el fenotipo pobre en lipooxigenasa de la línea G a un original recurrente (en este caso el cv Alexis). El programa de retrocruzamiento mostrado en la **Figura 20**, combinado con la selección del fenotipo pobre en lipooxigenasa, sustituye progresivamente el genoma de la línea G por el genoma original recurrente. Además, se eliminarán otras mutaciones introducidas en el genoma de la línea G durante el tratamiento de mutagénesis con azida de sodio. En el primer retrocruzamiento de la línea G pobre en lipooxigenasa homocigótica (denominado genotipo *ll*) con el cv Alexis (denominado genotipo *LL*), las líneas de progenie serán heterocigóticas (denominado genotipo *Ll*). No será detectable un fenotipo pobre en lipooxigenasa en las líneas heterocigóticas de la mutación debido a una mutación recesiva. La progenie se autopoliniza y dará una población segregada mendeliana normal, a saber 1 *LL*:2 *Ll*:1 *ll*. El genotipo *ll* homocigótico pobre en *lox* resultante del primer retrocruzamiento tendrá un 50% del fondo genético del cv Alexis. Después de 10 rondas de retrocruzamiento, el fondo original recurrente será aproximadamente de un 99,9%.

Se propagaron *Hordeum vulgare*, L. cv Alexis y la línea G en invernadero a lo largo del programa de retrocruzamiento. Se germinaron los granos de progenie retrocruzados en placas Petri sobre papel de filtro empapado con 4 ml de H<sub>2</sub>O durante 3 días a 22°C en la oscuridad. Se cribaron las líneas pobres en lipooxigenasa midiendo la actividad lipooxigenasa total en extractos del coleóptilo (7 mm superiores) de plántulas en germinación, como se describe en el ejemplo 1. Se analizó también en la progenie del 3º y 4º retrocruzamiento la herencia del gen *lox-1* mutante usando el ensayo PCR-CAPS descrito en el ejemplo 4.

La frecuencia esperada de fenotipo pobre en lipooxigenasa en la progenie segregada de las cuatro generaciones retrocruzadas era de un 25% para una mutación recesiva. La frecuencia observada de la actividad pobre en lipooxigenasa en la progenie (24 granos) de las cuatro generaciones retrocruzadas está de acuerdo con la frecuencia esperada (**Figura 20**). Cuando se analizaron la progenie del 3º y 4º retrocruzamiento, que tenían el genotipo *ll* homocigótico pobre en *lox*, con el ensayo PCR-CAPS, se encontró que todas tenían el fragmento de 313 pb distintivo, mientras que la progenie con actividad lipooxigenasa de tipo silvestre carecía de este fragmento (**Figura 21**).

El programa de retrocruzamiento demuestra que el alelo *lox-1* mutante puede transferirse a un nuevo fondo genético y se hereda de manera monofactorial recesiva siguiendo la segregación mendeliana. Puesto que el fondo original recurrente es de un 93,8% en la progenie del 4º retrocruzamiento, la herencia conjunta del gen *lox-1* mutante y el fenotipo pobre en lipooxigenasa proporciona la confirmación de su ligamiento genético.

#### Ejemplo 6

#### 35 La cerveza fabricada a partir de malta de cebada de la línea G acumula menos trans-2-nonanal durante el almacenamiento, dando una estabilidad aromática mejorada

Se propagaron *Hordeum vulgare* L cv Vintage y la línea G en el campo durante varias temporadas para proporcionar suficiente grano para malteado industrial. Se efectuaron los siguientes ensayos de malteado y fabricación de cerveza a escala industrial, así como los análisis de la cerveza acabada, para demostrar el valor de la cebada pobre en lipooxigenasa de la línea G para una estabilidad aromática mejorada.

#### 1. Malteado y horneado industrial de la línea G y el cv Vintage

Se efectuó el malteado a escala de 10 ton en una maltería industrial en dos ensayos como sigue:

#### Ensayo 1: Grano de cebada de la línea G (cosecha de 1996)

Condiciones de maceración: 8 horas húmedo, 14 horas seco, 8 horas húmedo, 10 horas seco, 4 horas húmedo en agua de maceración a 16°C. Condiciones de malteado: 12 horas a 18°C, 24 horas a 16°C, 24 horas a 14°C, 60 horas a 12°C. Condiciones de horneado: 12 horas a 60°C, 3 horas a 68°C, 4 horas a 74°C, 3 horas a 80°C.

#### Ensayo 2: cv Vintage y línea G (cosecha de 1996/1997)

Condiciones de maceración: 8 horas húmedo, 10 horas seco, 6 horas húmedo, 15 horas seco, 4 horas húmedo en agua de maceración a 15°C. Condiciones de malteado: 5 días con entrada de aire a 15°C y pulverización para mantener el nivel de humedad. Condiciones de horneado: 10 horas a 50°C, 2 horas a 60°C, 2,5 horas a 80°C.

Los análisis de malteado de dos muestras de malta de la línea G del ensayo 1 en comparación con la malta de control, el cv Nevada (Tabla 1) y del ensayo 2 en comparación con el cv Vintage (Tabla 2) confirmaron que la malta de la línea G era adecuada para ensayos de fabricación de cerveza.



TABLA 1

ENSAYO DE MALTEADO 1				
Variedad de cebada		cv Nevada	Línea G	Línea G
Año de cosecha		1996	1996	1996
Análisis de malta				
Contenido de humedad	%	4,7	4,3	4,4
Extracto fino como tal	% ia	76,9	76,1	75,3
Extracto fino en m.s.	% m.s.	81,4	79,5	78,7
Tiempo de sacarificación	Min	<10	<10	<10
Potencia diastática	%WK	252	373	365
Color	EBC	2,8	4,4	3,8
pH		6,16	5,97	5,99
Turbidez	EBC	9,0	2,5	2,4
Proteína total en m.s.	%	10,35	10,74	12,03
Nitrógeno soluble	mg/l	647	787	765
% de proteína soluble en la malta en m.s.	% m.s.	3,7	4,4	4,3
Kolbach		35,3	40,8	35,4
Amino nitrógeno libre	mg/l	97	125	118
Friabilidad	%	89,5	85,6	89,5
Granos completamente no modificados	%	1,1	0,6	0,5
Granos parcialmente no modificados	%	2,3	1,0	0,6
$\beta$ -glucano en mosto	mg/l	114	66	36
$\beta$ -glucano en malta	% p/p	0,24	0,11	0,05
S-metilmetionina/eq. de DMS	$\mu$ g/g	2,4	6,4	8,4
DMS libre	$\mu$ g/g	1,0	6,6	4,7
NDMA	$\mu$ g/kg	n.d.	0,3/0,6	0,3/0,3

TABLA 2

ENSAYO DE MALTEADO 2				
Variedad de cebada		Vintage	Línea G	Línea G
Año de cosecha		1996	1996	1997
Contenido de humedad	%	4,1	4,1	4,3
Extracto fino como tal	% ia	77,0	75,6	77,5
Extracto fino en m.s.	% m.s.	80,3	78,8	80,9
Diferencia fino/grueso	% m.s.	0,7	1,6	1,7
Tiempo de sacarificación	Min	-	-	<10
Potencia diastática	%WK	343	342	268
Color	EBC	2,5	2,8	3,4
pH		6,05	6,01	6,12
Turbidez	EBC	1,5	1,3	2,5
Proteína total en m.s.	%	10,98	12,22	9,82
Nitrógeno soluble	mg/l	696	741	610
% de proteína soluble en la malta en m.s.	% m.s.	3,9	4,1	3,4
Kolbach		35,2	33,7	34,6
Amino nitrógeno libre	mg/l	110	117	100
Friabilidad	%	91,3	81,8	89,5
Granos completamente no modificados	%	0,7	1,1	1,3
Granos parcialmente no modificados	%	1,0	2,7	2,7
$\beta$ -glucano en mosto	mg/l	97	172	117
$\beta$ -glucano en malta	% p/p	-	-	0,3
S-metilmetionina/eq. de DMS	$\mu$ g/g	-	-	-
DMS libre	$\mu$ g/g	-	-	-

## 2. Fabricación de cerveza industrial con malta de línea G, cv Vintage y malta de control de cv Nevada

5 Se efectuaron dos ensayos de fabricación de cerveza, usando mosto preparado a partir de malta de línea G y malta de control del cv Nevada en el ensayo 1 y de línea G y de malta de control del cv Vintage en el ensayo 2.

10 Se fabricó la cerveza a escala industrial de 30 hl con 475 kg de malta según el siguiente esquema: trituración a 50°C, 30 minutos a 50°C, calentamiento de 30 minutos a 50-70°C, 15 minutos a 70°C. Se calentó una porción del mosto durante 20 minutos a 70-100°C y durante 5 minutos a 100°C, mientras que la masa principal se mantenía a 70°C durante otros 25 minutos, y se combinaron entonces las dos masas y se mantuvieron durante 10 minutos a 76°C. Las etapas de fabricación de cerveza de cocción de mosto, separación del grano gastado por centrifugación, enfriamiento, fermentación, reposo y envasado en botellas de vidrio marrones fueron según la práctica cervecera estándar.

## 3. Estabilidad aromática y contenido de T2N de la cerveza fabricada a partir de malta de línea G, cv Vintage y malta de control de cv Nevada

Se almacenó cerveza recién embotellada a 5°C y se analizó al cabo de 2 meses de la producción. Se evaluó la estabilidad aromática de la cerveza fresca y almacenada en dos laboratorios independientes siguiendo dos tipos diferentes de condiciones de almacenamiento. En el laboratorio A, se sometió la cerveza a un proceso de envejecimiento forzado, en que la cerveza se almacenó a 37°C durante un periodo de 7 días, mientras que en el laboratorio B se almacenaba a 30°C durante 6 y 12 semanas. Se determinaron los niveles de trans-2-nonenal en la cerveza mediante cromatografía de gases y detección espectrométrica de masas después de la derivatización de carbonilos con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina esencialmente como se describe por Grönqvist *et al.* 1993 "Proceedings of the 24th EBC Congress", Oslo, 421-428. Un panel de degustación entrenado evaluó la puntuación de aroma global de la cerveza, que incluye la detección de un aroma acartonado indicativo de trans-2-nonenal libre en la cerveza.

**Laboratorio A: Tolerancia al envejecimiento forzado**

La comparación de la cerveza fabricada a partir de malta de la línea G y de control, del cv Nevada, en el primer ensayo de fabricación de cerveza (**Tabla 3**) demostró que la cerveza de la línea G tenía una mayor estabilidad aromática y un menor contenido de trans-2-nonenal después de un envejecimiento forzado en comparación con los controles. El segundo ensayo, que compara la cerveza fabricada a partir de malta de la línea G con cerveza fabricada a partir de malta del cv Vintage, el cultivar original, confirmó los datos iniciales (**Tabla 4**).

**TABLA 3**

<b>ENSAYO DE FABRICACIÓN DE CERVEZA 1</b>		
Malta de cebada	cv Nevada	Línea G
Contenido de SO <sub>2</sub> (mg/ml)	1	1
T2N** (ppb)- cerveza fresca	0,009	0,005
T2N** (ppb)- cerveza envejecida (37°C/7 días)	0,117	0,025
Aroma*- cerveza fresca	5,9	5,3
Aroma*- cerveza envejecida (37°C/7 días)	1,3	5,1
*Escala de evaluación del aroma de 1 a 10 por calidad creciente; **trans-2-nonenal.		

**TABLA 4**

<b>ENSAYO DE FABRICACIÓN DE CERVEZA 2</b>		
Malta de cebada	cv Nevada	Línea G
Contenido de SO <sub>2</sub> (mg/ml)	2	2,5
T2N** (ppb)- cerveza fresca	0,023	0,019
T2N** (ppb)- cerveza envejecida (37°C/7 días)	0,078	0,035
Aroma*- cerveza fresca	5,5	6,1
Aroma*- cerveza envejecida (37°C/7 días)	2,9	5,9
*Escala de evaluación del aroma de 1 a 10 por calidad creciente; **trans-2-nonenal.		

**20 Laboratorio B: Tolerancia al almacenamiento a 30°C**

La cerveza fabricada a partir de malta de la línea G tenía menores niveles de trans-2-nonenal después de 6 y 12 semanas a la temperatura de almacenamiento elevada de 30°C cuando se comparaba con la cerveza fabricada a partir de cualquiera de la maltas de referencia (Tablas 5 y 6), y tenía una mejor estabilidad aromática a juzgar por un panel de degustación. El umbral de gusto para el trans-2-nonenal en estas cervezas analizadas se encuentra cercano a 0,08 ppb.

**TABLA 5**

<b>ENSAYO DE FABRICACIÓN DE CERVEZA 1</b>		
Malta de cebada	cv Nevada	Línea G
trans-2-nonenal (ppb)- cerveza fresca	0,050	0,044
trans-2-nonenal (ppb)- 30°C/6 semanas	0,072	0,037
trans-2-nonenal (ppb)- 30°C/12 semanas	0,095	0,046
Aroma a trans-2-nonenal* - cerveza fresca	0,6	0,3
Aroma a trans-2-nonenal* - 30°C/6 semanas	3,7	1,4
Aroma a trans-2-nonenal* - 30°C/12 semanas	2,5	0,6
*puntuación de detección del aroma a trans-2-nonenal en una escala de 1 a 10		

**TABLA 6**

<b>ENSAYO DE FABRICACIÓN DE CERVEZA 2</b>		
Malta de cebada	cv Vintage	Línea G
trans-2-nonenal (ppb)- cerveza fresca	0,070	0,062
trans-2-nonenal (ppb)- 30°C/6 semanas	0,093	0,070
trans-2-nonenal (ppb)- 30°C/12 semanas	0,133	0,080
Aroma a trans-2-nonenal* - cerveza fresca	0,3	0,9
Aroma a trans-2-nonenal* - 30°C/6 semanas	2,5	1,7
Aroma a trans-2-nonenal* - 30°C/12 semanas	2,2	1,3
*puntuación de detección del aroma a trans-2-nonenal en una escala de 1 a 10		

5 Se muestra que la estabilidad aromática mejorada de la cerveza fabricada a partir de malta de la línea G, medida por los niveles de trans-2-nonenal detectados en la cerveza después del almacenamiento a 30°C de los datos de ensayo de fabricación de cerveza combinados, es estadísticamente significativa (Tabla 7).

**TABLA 7**

<b>TRAN-2-NONENAL EN CERVEZA ALMACENADA</b>					
<b>Fresca</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Diferencia</b>	<b>P bilateral</b>	<b>Significativo (p&lt; 0,05)</b>
Referencia	0,060	0,012	0,007	0,34	No
Línea G	0,053	0,011			
<b>6 semanas, 30°C</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Diferencia</b>	<b>P bilateral</b>	<b>Significativo (p&lt; 0,05)</b>
Referencia	0,083	0,013	0,029	0,031	Sí
Línea G	0,054	0,021			
<b>12 semanas, 30°C</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Diferencia</b>	<b>P bilateral</b>	<b>Significativo (p&lt; 0,05)</b>
Referencia	0,114	0,023	0,051	0,003	Sí
Línea G	0,063	0,020			

Puesto que los niveles de sulfito natural eran bajos en ambos ensayos de fabricación de cerveza, los niveles de trans-2-nonenal libre en la cerveza envejecida reflejarían estrechamente el potencial de trans-2-nonenal de las diferentes cervezas, a saber, el nivel de aductos de trans-2-nonenal presentes en la cerveza fresca. La adición de sulfito puede retardar temporalmente el proceso de enranciamiento, al complejar el trans-2-nonenal libre, hasta que los niveles de sulfito se reducen por la oxidación debida al intercambio gaseoso a través del envasado.

Los ensayos de fabricación de cerveza descritos con malta de cebada pobre en LOX-1 proporcionan la primera evidencia inequívoca de que la actividad LOX-1 en la cebada durante el proceso de malteado y fabricación de cerveza es un determinante clave de la aparición del compuesto de aroma desagradable

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Douma, Anneke  
     Doderer, Albert  
     Cameron-Mills, Verena  
     Skadhauge, Birgitte  
     Bech, Lene
- 15 <120> CEBADA POBRE EN LIPOOXIGENASA 1  
     <130> 11225.12wo01  
     <160> 18  
     <170> PatentIn versión 3.0  
     <210> 1
- 20 <211> 143  
     <212> ADN  
     <213> *Hordeum vulgare*  
     <400> 1  
     **ctaagccatc ggcaaccatg gatgaataaa gggcgttcgc cacgtacgaa acttgctcgag 60**  
     **agattgggtgt agtgtgtgtc tgtgacagta ctatgtcagc agttgctctt taagccgaat 120**  
     **aaataaagca gatttgcttc caa 143**
- 25 <210> 2  
     <211> 24  
     <212> ADN  
     <213> *Hordeum vulgare*  
     <400> 2
- 30 **gaaaagcttg gaggtagacg ctgc 24**  
     <210> 3  
     <211> 33  
     <212> ADN  
     <213> *Hordeum vulgare*
- 35 <400> 3  
     **tataggatcc ttgttcttgg cctcctctcc tcg 33**

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> *Hordeum vulgare*  
 5 <400> 4  
     **agtgaaaaac agtgtgctgg tg**           22  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> *Hordeum vulgare*  
     <400> 5  
     **ggcttaaaga gcaactgctg a**           21  
 <210> 6  
 <211> 23  
 15 <212> ADN  
     <213> *Hordeum vulgare*  
     <400> 6  
     **caagatgcat atgctgctgg gag**       23  
     <210> 7  
 20 <211> 29  
     <212> ADN  
     <213> *Hordeum vulgare*  
     <400> 7  
     **cgatggitta aattagatgg agatgctgt**   29  
 25 <210> 8  
     <211> 4663  
     <212> ADN  
     <213> *Hordeum vulgare*  
     <400> 8

ES 2 376 415 T3

cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60  
 atgggcatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgcg aagcacgagg agggcacgtc 120  
 accgtccgcg cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180  
 gcgccacacc accgggaccg gacccggacc ggcctataaa ttgcccggac cgagctgcaa 240  
 gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300  
 tgtgctggtg ccattggttg gagcagtgaag agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360  
 tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccgg ctcaagggca 420  
 cggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480  
 acggcatcgg cgagttcctc ggcaagggcg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccg 540  
 tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ctttctcctc tgtttacaag atatagtatt 600  
 tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660  
 aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa 720  
 gagacaacag catgcatgca tggtgcgcg accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780  
 gacaaagcaa cacacaagc aaggacgaca cgtcaaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840  
 cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat 900  
 cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960  
 gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020  
 agggtagctg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtagc 1080  
 tggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggagcg gaggcggagc tggagcagtg 1140  
 ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg 1200  
 ggaggtggag aagctcgggg tgccgggagc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga 1260  
 gttcctgctt aaaacatca cctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt 1320  
 cgtcgccaac tcatggatct accccggcgc caactaccga tacagccgag tcttcttcgc 1380  
 caacgacgtg cgtggatctt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca 1440

ES 2 376 415 T3

ttcattggtcg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca 1500  
 ctttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga 1560  
 tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat 1620  
 aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt 1680  
 ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaaacgatt aaattaagca 1740  
 taaaaagaaa aggaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt 1800  
 agatatgcaa tatttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaatat aagacatttg 1860  
 taagatttca ctatggacaa catacgaaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt 1920  
 atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca 1980  
 taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga 2040  
 tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgcgt ggcgacgacc 2100  
 agcagggccc gtaccaggag cagcaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg 2160  
 gcgagggccg ccccatcctc ggcggcaact ccgaccacc ttaccgcgc cgcgccgca 2220  
 cggagcgcaa gcccaacgcc agcagcccgga gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc 2280  
 agatctacgt gccgcgggac gagaagttcg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct 2340  
 actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca 2400  
 cccccggcga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcataaagc 2460  
 tgcccaagggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg 2520  
 acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg 2580  
 agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggagggtgct gccggcgtca 2640  
 acccggctcat gatcacgcgt ctcacggtga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta 2700  
 tgggtgtccat ggtgagaaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct 2760  
 gcatgcatgc aggagtccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac 2820  
 accagcacca tcacggcggga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag 2880  
 gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta 2940  
 gataatttgg cttcgttgca attaatltga tycctggccga tcaagtgatc gtattggggt 3000  
 tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc 3060  
 atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cacgaggacc 3120  
 ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggtc acgcccgtcg ccatcgagct gagcgagccc 3180  
 atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggg gccagcggc 3240  
 tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg 3300  
 tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacggt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga 3360



ES 2 376 415 T3

tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420  
 gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa 3480  
 gctgctgagc ccgcactacc gcgacacccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540  
 catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccg ggcaagtctg cgttggggat 3600  
 gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660  
 caagaggtag gtacctggtg aatggtatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgtctca 3720  
 ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggaccg gtcgagcccg 3780  
 tacaaggtgc ggttgcctgt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg 3840  
 cacgccattg agcagtacgt gagcagtagc ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900  
 ctgcagggcg atacggaggt gcaggcgtgg tggaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960  
 gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020  
 tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtag 4080  
 ccctacgcgg ggttctctcc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc 4140  
 ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccgggagc gggccttcat ccacaccatc 4200  
 acgagccaga tccagacccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260  
 tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgcccggag ggacctcgga cccaaaggcc 4320  
 ctggaggtgt tcaagcgggt cagcagaccg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc 4380  
 atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgg ctaagtttcc ctacatgctg 4440  
 ctctaccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500  
 cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560  
 gccacgtacg aaacttgtcg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca 4620  
 gcagttgctc ttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

<210> 9

<211> 862

<212> PRT

5 <213> *Hordeum vulgare*

<400> 9

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp  
 20 25 30

ES 2 376 415 T3

Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu  
 35 40 45  
 Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln  
 50 55 60  
 Asp Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly  
 85 90 95  
 Leu Thr Phe Asp Trp Glu Val Glu Lys Leu Gly Val Pro Gly Ala Ile  
 100 105 110  
 Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr  
 115 120 125  
 Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn  
 130 135 140  
 Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe  
 145 150 155 160  
 Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro  
 165 170 175  
 Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly  
 180 185 190  
 Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp  
 195 200 205  
 Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr  
 210 215 220  
 Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp  
 245 250 255  
 Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile  
 260 265 270  
 Lys Ala Ile Thr Gln Gly Ile Leu Pro Ala Val Arg Thr Tyr Val Asp  
 275 280 285  
 Thr Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Ile Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300  
 Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Lys Val Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Lys Gln Phe Pro Leu Gln Leu Ile Lys Asp Leu Leu Pro Val Gly Gly  
 325 330 335  
 Asp Ser Leu Leu Lys Leu Pro Val Pro His Ile Ile Gln Glu Asn Lys  
 340 345 350  
 Gln Ala Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Val Leu Ala Gly  
 355 360 365  
 Val Asn Pro Val Met Ile Thr Arg Leu Thr Glu Phe Pro Pro Lys Ser





acccgagcct	ggagagcccg	ctgtcgctgc	tggagcagat	ctacgtgccg	cgggacgaga	840
agttcggcca	cctcaagacg	tccgacttcc	tgggctactc	catcaaggcc	atcacgcagg	900
gcatcctgcc	ggccgtgcgc	acctacgtgg	acaccacccc	cggcgagttc	gactccttcc	960
aggacatcat	caacctctat	gagggcggca	tcaagctgcc	caaggtggcc	gccctggagg	1020
agctccgtaa	gcagttcccg	ctccagctca	tcaaggacct	cctccccgtc	ggcggcgact	1080
ccctgcttaa	gctccccgtg	ccccacatca	tccaggagaa	caagcaggcg	tggaggaccg	1140
acgaggagtt	cgcacgggag	gtgctcgccg	gcgtcaacct	ggcatgatc	acgcgtctca	1200
cggagttccc	gccaaaaagt	agtctggacc	ctagcaagtt	tggtgaccac	accagcacca	1260
tcacggcggg	gcacatagag	aagaacctcg	agggcctcac	ggtgcagcag	gcgctggaaa	1320
gcaacaggct	gtacatcctt	gatcaccatg	accggttcat	gccgttctcg	atcgacgtca	1380
acaacctgcc	cggcaacttc	atctacgcc	cgaggacctt	cttcttctcg	cgcgggcgacg	1440
gcaggctcac	gccgctcgcc	atcgagctga	gcgagcccat	catccagggc	ggccttacca	1500
cggccaagag	caaggtttac	acgccggtgc	ccagcggctc	cgtcgaaggc	tgggtgtggg	1560
agctcgccaa	ggcctacgtc	gccgtcaatg	actccgggtg	gcaccagctc	gtcagccact	1620
ggctgaacac	tcacgcggtg	atggagccgt	tcgtgatctc	gacgaaccgg	caccttagcg	1680
tgacgcaccc	ggtgcacaag	ctgctgagcc	cgcactaccg	cgacaccatg	accatcaacg	1740
cgctggcgcg	gcagacgctc	atcaacgccg	gcggcatctt	cgagatgacg	gtgttcccgg	1800
gcaagttcgc	gttggggatg	tcggccgtgg	tgtacaagga	ctggaagttc	accgagcagg	1860
gactgccgga	cgatctcctc	aagaggggca	tggcgggtga	ggaccctcg	agcccgtaca	1920
aggtgcgggt	gctggtgtcg	gactaccctg	acgcggcgga	cgggctggcg	atctggcacg	1980
ccattgagca	gtacgtgagc	gagtacctgg	ccatctacta	cccgaacgac	ggcgtgctgc	2040
agggcgatac	ggaggtgcag	gcgtggtgga	aggagacgcg	cgaggtcggg	cacggcgacc	2100
tcaaggacgc	cccatggtgg	cccaagatgc	aaagtgtgcc	ggagctggcc	aaggcgtgca	2160
ccaccatcat	ctggatcggg	tcggcgctgc	atgcggcagt	caacttcggg	cagtaccctt	2220
acgcgggggt	cctcccgaac	cggccgacgg	tgagccggcg	ccgatgccg	gagcccggca	2280
cggaggagta	cgcgagctg	gagcgcgacc	cggagcgggc	cttcatccac	accatcacga	2340
gdcagatcca	gaccatcctc	ggcgtgtcgc	tgctggaggt	gctgtcgaag	cactcctccg	2400
acgagctgta	cctcgggcag	cgggacacgc	cggagtggac	ctcggacca	aaggccctgg	2460
aggtgttcaa	gcggttcagc	gaccggctgg	tggagatcga	gagcaagggtg	gtgggcatga	2520
accatgacct	ggagctcaag	aaccgcaacg	gcccggctaa	gtttccctac	atgctgctct	2580
accccaacac	ctccgaccac	aagggcgccg	ctgccgggct	taccgccaag	ggcatcccca	2640
acagcatctc	catctaattc	aagccatcgg	caaccatgga	tgaataaagg	gcgttcgcca	2700

cgtacgaaac ttgtcgagag attggtgtag tgtgtgtctg tgacagtact atgtcagcag 2760  
 ttgctcttta agccgaataa ataaagcaga tttgcttcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2818

<210> 11

<211> 4663

<212> ADN

5 <213> *Hordeum vulgare*

<220>

<221> variación

<222> (2346)..(2348)

<223> "n" es a, c, t, o g que codifican un aminoácido ácido, básico o polar

10 <400> 11

cagcccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60  
 atgggcatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgag aagcacgagg agggcacgtc 120  
 accgtccgag cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180  
 gcgccacacc accgggaccg gaccgggacc ggcctataaa ttgcccggac cgagctgcaa 240  
 gcagctctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300  
 tgtgtggtg ccattggtg gagcagtga agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360  
 tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccgg ctcaagggca 420  
 cggtggtgct catgacgcaag aacgtgctgg acctcaacga ctccggcgcc accatcatcg 480  
 acggcatcgg cgagttctc ggcaagggtg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccc 540  
 tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ccttctctc tgtttacaag atatagtatt 600  
 tctttcgtg gggccggcgg ccatggatgg atggatgtg ctggatcggc taaagaagat 660  
 aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcataatg atcgaaaaaa 720  
 gagacaacag catgcatgca tgggtgcgag accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780  
 gacaaagcaa cacacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840  
 cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat 900  
 cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960  
 gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020  
 agggtagctg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtacg 1080

ES 2 376 415 T3

tgggtggtgca gacaacggcg gtcgCGggaa ggtgggCGcg gaggcggagc tggagcagtg 1140  
 ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg 1200  
 ggaggtggag aagctcgggg tgccgggCGc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga 1260  
 gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt 1320  
 cgtcgccaac tcatggatct accccgCGc caactaccga tacagcCGc tcttcttcgc 1380  
 caacgacgtg cgtggatttt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca 1440  
 ttcattggtc atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca 1500  
 cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga 1560  
 tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat 1620  
 aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt 1680  
 ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaacgatt aaattaagca 1740  
 taaaaagaaa aggaaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt 1800  
 agatatgcaa tatttatctt acatctaac ctttcttcat tcttaaataat aagacatttg 1860  
 taagatttca ctatggacaa catacgaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt 1920  
 atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca 1980  
 taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga 2040  
 tgccggcggc gctgaagccg taccgCGc acgagctccg gaacctgCGt ggcgacgacc 2100  
 agcagggccc gtaccaggag cacgaccgca tctaccgcta cgcagctctac aacgacctcg 2160  
 gcgagggccc ccccatcctc ggcggcaact ccgaccacc ttaccCGc cgcggccgca 2220  
 cggagcGcaa gcccaacgcc agcGaccgca gcctggagag ccggctgCGt ctgctggagc 2280  
 agatctacgt gccgCGggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcttgggct 2340  
 actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca 2400  
 cccccggcga gttcGactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcattcaagc 2460  
 tgcccaagggt ggccgcccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcattcaagg 2520  
 acctcctccc cgtcggCGc gactcctcgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg 2580  
 agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggaggtgctc gccnngtca 2640  
 acccggctcat gatcacgCGt ctcacggtga gtcagcGatt atttGttcat tgtgtgtgta 2700  
 tgggtgtccat ggtgagaaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcGcatg cacgcatgct 2760  
 gcatgcatgc aggagtccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac 2820  
 accagcacca tcacggCGga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag 2880  
 gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta 2940  
 gataatttgg cttcGttgca attaatttga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt 3000

ES 2 376 415 T3

tgaaatattgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc 3060  
 atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cacgaggacc 3120  
 ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc 3180  
 atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggt gccagcggc 3240  
 tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg 3300  
 tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacggt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga 3360  
 tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420  
 gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa 3480  
 gctgctgagc ccgcaactacc gcgacaccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540  
 catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccg ggcaagttcg cgttggggat 3600  
 gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660  
 caagaggtac gtacctggta aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720  
 ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcgg tggaggacct gtcgagcccg 3780  
 tacaaggtgc ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg 3840  
 cacgccattg agcagtacgt gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900  
 ctgcagggcg atacggaggt gcaggcgtgg tggaaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960  
 gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020  
 tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtac 4080  
 ccctacgcgg ggttctctcc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc 4140  
 ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc gggccttcat ccacaccatc 4200  
 acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260  
 tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgccggagt ggacctcga cccaaggcc 4320  
 ctggaggtgt tcaagcgggt cagcgaccgg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtggc 4380  
 atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgg ctaagtttcc ctacatgctg 4440  
 ctctacccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccc ggcttaccgc caagggcatc 4500  
 cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560  
 gccacgtacg aaacttgctg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca 4620  
 gcagttgctc ttttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

<210> 12

<211> 862

<212> PRT

5 <213> *Hordeum vulgare*



<220>

<221> variación

<222> (368)..(368)

<223> "Xaa" es un aminoácido ácido, básico o polar

5 <400> 12

```

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser
 1          5          10
Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp
          20          25          30
Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu
          35          40          45
Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln
 50          55          60
Asp Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Glu Gln
 65          70          75          80
Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly
          85          90          95
Leu Thr Phe Asp Trp Glu Val Glu Lys Leu Gly Val Pro Gly Ala Ile
          100          105          110
Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr
          115          120          125
Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn
          130          135          140
Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe
          145          150          155          160
Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro
          165          170          175
Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly
          180          185          190
Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp
          195          200          205
Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr
          210          215          220
Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser
          225          230          235          240
Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp
          245          250          255
Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile

```

ES 2 376 415 T3

			260					265				270			
Lys	Ala	Ile	Thr	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Ala	Val	Arg	Thr	Tyr	Val	Asp
		275					280					285			
Thr	Thr	Pro	Gly	Glu	Phe	Asp	Ser	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Asn	Leu	Tyr
	290					295					300				
Glu	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Pro	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg
305					310					315					320
Lys	Gln	Phe	Pro	Leu	Gln	Leu	Ile	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Val	Gly	Gly
				325					330					335	
Asp	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	His	Ile	Ile	Gln	Glu	Asn	Lys
			340					345					350		
Gln	Ala	Trp	Arg	Thr	Asp	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Glu	Val	Leu	Ala	Xaa
		355					360					365			
Val	Asn	Pro	Val	Met	Ile	Thr	Arg	Leu	Thr	Glu	Phe	Pro	Pro	Lys	Ser
	370					375					380				
Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Phe	Gly	Asp	His	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala
385					390					395					400
Glu	His	Ile	Glu	Lys	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Val	Gln	Gln	Ala	Leu
				405					410					415	
Glu	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr	Ile	Leu	Asp	His	His	Asp	Arg	Phe	Met	Pro
			420					425					430		
Phe	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Asn	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe	Ile	Tyr	Ala	Thr
		435					440					445			
Arg	Thr	Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Asp	Gly	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Ala
	450					455					460				
Ile	Glu	Leu	Ser	Glu	Pro	Ile	Ile	Gln	Gly	Gly	Leu	Thr	Thr	Ala	Lys
465					470					475					480
Ser	Lys	Val	Tyr	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Glu	Gly	Trp	Val
				485					490					495	
Trp	Glu	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Val	Ala	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Trp	His
			500					505					510		
Gln	Leu	Val	Ser	His	Trp	Leu	Asn	Thr	His	Ala	Val	Met	Glu	Pro	Phe
		515					520					525			
Val	Ile	Ser	Thr	Asn	Arg	His	Leu	Ser	Val	Thr	His	Pro	Val	His	Lys
	530					535					540				
Leu	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Arg	Asp	Thr	Met	Thr	Ile	Asn	Ala	Leu	Ala
545					550					555					560
Arg	Gln	Thr	Leu	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Val	Phe
				565					570					575	
Pro	Gly	Lys	Phe	Ala	Leu	Gly	Met	Ser	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Asp	Trp
			580					585					590		
Lys	Phe	Thr	Glu	Gln	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Leu	Ile	Lys	Arg	Gly	Met
		595					600					605			

Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser  
 610 615 620  
 Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu  
 625 630 635 640  
 Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val  
 645 650 655  
 Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu  
 660 665 670  
 Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln  
 675 680 685  
 Ser Val Pro Glu Leu Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly  
 690 695 700  
 Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly  
 705 710 715 720  
 Phe Leu Pro Asn Arg Pro Thr Val Ser Arg Arg Arg Met Pro Glu Pro  
 725 730 735  
 Gly Thr Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Arg Ala Phe  
 740 745 750  
 Ile His Thr Ile Thr Ser Gln Ile Gln Thr Ile Ile Gly Val Ser Leu  
 755 760 765  
 Leu Glu Val Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gln  
 770 775 780  
 Arg Asp Thr Pro Glu Trp Thr Ser Asp Pro Lys Ala Leu Glu Val Phe  
 785 790 795 800  
 Lys Arg Phe Ser Asp Arg Leu Val Glu Ile Glu Ser Lys Val Val Gly  
 805 810 815  
 Met Asn His Asp Pro Glu Leu Lys Asn Arg Asn Gly Pro Ala Lys Phe  
 820 825 830  
 Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Lys Gly Ala Ala  
 835 840 845  
 Ala Gly Leu Thr Ala Lys Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile  
 850 855 860

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

5 <213> *Hordeum vulgare*

<400> 13

cgctacgacg tctacaacga 20

<210> 14

ES 2 376 415 T3

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> *Hordeum vulgare*  
 <400> 14

5 cagactactt tttggcggga 20

<210> 15  
 <211> 839  
 <212> PRT  
 <213> *Glycine max*

10 <400> 15  
 Met Phe Ser Ala Gly His Lys Ile Lys Gly Thr Val Val Leu Met Pro  
 1 5 10 15  
 Lys Asn Glu Leu Glu Val Asn Pro Asp Gly Ser Ala Val Asp Asn Leu  
 20 25 30  
 Asn Ala Phe Leu Gly Arg Ser Val Ser Leu Gln Leu Ile Ser Ala Thr  
 35 40 45  
 Lys Ala Asp Ala His Gly Lys Gly Lys Val Gly Lys Asp Thr Phe Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Ile Asn Thr Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Glu Ser Ala  
 65 70 75 80  
 Phe Asn Ile His Phe Glu Trp Asp Gly Ser Met Gly Ile Pro Gly Ala  
 85 90 95  
 Phe Tyr Ile Lys Asn Tyr Met Gln Val Glu Phe Phe Leu Lys Ser Leu  
 100 105 110  
 Thr Leu Glu Ala Ile Ser Asn Gln Gly Thr Ile Arg Phe Val Cys Asn  
 115 120 125  
 Ser Trp Val Tyr Asn Thr Lys Leu Tyr Lys Ser Val Arg Ile Phe Phe  
 130 135 140  
 Ala Asn His Thr Tyr Val Pro Ser Glu Thr Pro Ala Pro Leu Val Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Glu Glu Glu Leu Lys Ser Leu Arg Gly Asn Gly Thr Gly Glu  
 165 170 175  
 Arg Lys Glu Tyr Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn Asp Leu  
 180 185 190  
 Gly Asn Pro Asp Lys Ser Glu Lys Leu Ala Arg Pro Val Leu Gly Gly  
 195 200 205

Ser Ser Thr Phe Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Pro  
 210 215 220  
 Thr Val Thr Asp Pro Asn Thr Glu Lys Gln Gly Glu Val Phe Tyr Val  
 225 230 235 240  
 Pro Arg Asp Glu Asn Leu Gly His Leu Lys Ser Lys Asp Ala Leu Glu  
 245 250 255  
 Ile Gly Thr Lys Ser Leu Ser Gln Ile Val Gln Pro Ala Phe Glu Ser  
 260 265 270  
 Ala Phe Asp Leu Lys Ser Thr Pro Ile Glu Phe His Ser Phe Gln Asp  
 275 280 285  
 Val His Asp Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Arg Asp Val Ile  
 290 295 300  
 Ser Thr Ile Ile Pro Leu Pro Val Ile Lys Glu Leu Tyr Arg Thr Asp  
 305 310 315 320  
 Gly Gln His Ile Leu Lys Phe Pro Gln Pro His Val Val Gln Val Ser  
 325 330 335  
 Gln Ser Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met Ile Ala  
 340 345 350  
 Gly Val Asn Pro Cys Val Ile Arg Gly Leu Glu Glu Phe Pro Pro Lys  
 355 360 365  
 Ser Asn Leu Asp Pro Ala Ile Tyr Gly Asp Gln Ser Ser Lys Ile Thr  
 370 375 380  
 Ala Asp Ser Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Thr Met Asp Glu Ala Leu Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Arg Arg Leu Phe Met Leu Asp Tyr His Asp Ile Phe Met Pro Tyr  
 405 410 415  
 Val Arg Gln Ile Asn Gln Leu Asn Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Thr Arg  
 420 425 430  
 Thr Ile Leu Phe Leu Arg Glu Asp Gly Thr Leu Lys Pro Val Ala Ile  
 435 440 445  
 Glu Leu Ser Leu Pro His Ser Ala Gly Asp Leu Ser Ala Ala Val Ser  
 450 455 460  
 Gln Val Val Leu Pro Ala Lys Glu Gly Val Glu Ser Thr Ile Trp Leu  
 465 470 475 480  
 Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ile Val Asn Asp Ser Cys Tyr His Gln Leu  
 485 490 495  
 Met Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Ala Met Glu Pro Phe Val Ile  
 500 505 510  
 Ala Thr His Arg His Leu Ser Val Leu His Pro Ile Tyr Lys Leu Leu  
 515 520 525  
 Thr Pro His Tyr Arg Asn Asn Met Asn Ile Asn Ala Leu Ala Arg Gln  
 530 535 540  
 Ser Leu Ile Asn Ala Asn Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Leu Pro Ser



ES 2 376 415 T3

Met Phe Ser Val Pro Gly Val Ser Gly Ile Leu Asn Arg Gly Gly Gly  
 1 5 10 15  
 His Lys Ile Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Phe Asn Ser Val Ala Asp Leu Thr Lys Gly Asn Val Gly Gly Leu Ile  
 35 40 45  
 Gly Thr Gly Leu Asn Val Val Gly Ser Thr Leu Asp Asn Leu Thr Ala  
 50 55 60  
 Phe Leu Gly Arg Ser Val Ala Leu Gln Leu Ile Ser Ala Thr Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Asn Gly Lys Gly Lys Val Gly Lys Asp Thr Phe Leu Glu Gly  
 85 90 95  
 Ile Ile Val Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Glu Ser Ala Phe Asn  
 100 105 110  
 Ile Gln Phe Glu Trp Asp Glu Ser Met Gly Ile Pro Gly Ala Phe Tyr  
 115 120 125  
 Ile Lys Asn Tyr Met Gln Val Glu Phe Tyr Leu Lys Ser Leu Thr Leu  
 130 135 140  
 Glu Asp Val Pro Asn Gln Gly Thr Ile Arg Phe Val Cys Asn Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Val Tyr Asn Thr Lys Leu Tyr Lys Ser Val Arg Ile Phe Phe Ala Asn  
 165 170 175  
 His Thr Tyr Val Pro Ser Glu Thr Pro Ala Ala Leu Val Gly Tyr Arg  
 180 185 190  
 Glu Glu Glu Leu Lys Asn Leu Arg Gly Asp Gly Lys Gly Glu Arg Lys  
 195 200 205  
 Glu His Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn Asp Leu Gly Asn  
 210 215 220  
 Pro Asp His Gly Glu Asn Phe Ala Arg Pro Ile Leu Gly Gly Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Thr His Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Tyr Pro Thr Arg  
 245 250 255  
 Lys Asp Gln Asn Ser Glu Lys Pro Gly Glu Val Tyr Val Pro Arg Asp  
 260 265 270  
 Glu Asn Phe Gly His Leu Lys Ser Ser Asp Phe Leu Ala Tyr Gly Ile  
 275 280 285  
 Lys Ser Leu Ser Gln Tyr Val Leu Pro Ala Phe Glu Ser Val Phe Asp  
 290 295 300  
 Leu Asn Phe Thr Pro Asn Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Val Arg Asp  
 305 310 315 320

Leu His Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Thr Glu Val Ile Ser Thr Ile  
 325 330 335  
 Met Pro Leu Pro Val Val Lys Glu Leu Phe Arg Thr Asp Gly Glu Gln  
 340 345 350  
 Val Leu Lys Phe Pro Pro Pro His Val Ile Gln Val Ser Lys Ser Ala  
 355 360 365  
 Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met Val Ala Gly Val Asn  
 370 375 380  
 Pro Cys Val Ile Arg Gly Leu Gln Glu Phe Pro Pro Lys Ser Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Pro Thr Ile Tyr Gly Glu Gln Thr Ser Lys Ile Thr Ala Asp Ala  
 405 410 415  
 Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Ser Arg Arg  
 420 425 430  
 Leu Phe Met Leu Asp Tyr His Asp Val Phe Met Pro Tyr Ile Arg Arg  
 435 440 445  
 Ile Asn Gln Thr Tyr Ala Lys Ala Tyr Ala Thr Arg Thr Ile Leu Phe  
 450 455 460  
 Leu Arg Glu Asn Gly Thr Leu Lys Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Leu  
 465 470 475 480  
 Pro His Pro Ala Gly Asp Leu Ser Gly Ala Val Ser Gln Val Ile Leu  
 485 490 495  
 Pro Ala Lys Glu Gly Val Glu Ser Thr Ile Trp Leu Leu Ala Lys Ala  
 500 505 510  
 Tyr Val Val Val Asn Asp Ser Cys Tyr His Gln Leu Met Ser His Trp  
 515 520 525  
 Leu Asn Thr His Ala Val Ile Glu Pro Phe Ile Ile Ala Thr Asn Arg  
 530 535 540  
 His Leu Ser Ala Leu His Pro Ile Tyr Lys Leu Leu Thr Pro His Tyr  
 545 550 555 560  
 Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala Leu Ala Arg Gln Ser Leu Ile Asn  
 565 570 575  
 Ala Asp Gly Ile Ile Glu Lys Ser Phe Leu Pro Ser Lys His Ser Val  
 580 585 590  
 Glu Met Ser Ser Ala Val Tyr Lys Asn Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala  
 595 600 605  
 Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly Val Ala Ile Lys Asp Pro Ser  
 610 615 620  
 Ala Pro His Gly Leu Arg Leu Leu Ile Glu Asp Tyr Pro Tyr Ala Val  
 625 630 635 640  
 Asp Gly Leu Glu Ile Trp Ala Ala Ile Lys Thr Trp Val Gln Glu Tyr  
 645 650 655  
 Val Ser Leu Tyr Tyr Ala Arg Asp Asp Asp Val Lys Pro Asp Ser Glu





ES 2 376 415 T3

Ala Thr Lys Ala Asp Ala Asn Gly Lys Gly Lys Leu Gly Lys Ala Thr  
65 70 75 80  
Phe Leu Glu Gly Ile Ile Thr Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Gln  
85 90 95  
Ser Ala Phe Lys Ile Asn Phe Glu Trp Asp Asp Gly Ser Gly Ile Pro  
100 105 110  
Gly Ala Phe Tyr Ile Lys Asn Phe Met Gln Thr Glu Phe Phe Leu Val  
115 120 125  
Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ile Pro Asn His Gly Ser Ile His Phe Val  
130 135 140  
Cys Asn Ser Trp Ile Tyr Asn Ala Lys Leu Phe Lys Ser Asp Arg Ile  
145 150 155 160  
Phe Phe Ala Asn Gln Thr Tyr Leu Pro Ser Glu Thr Pro Ala Pro Leu  
165 170 175  
Val Lys Tyr Arg Glu Glu Glu Leu His Asn Leu Arg Gly Asp Gly Thr  
180 185 190  
Gly Glu Arg Lys Glu Trp Glu Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn  
195 200 205  
Asp Leu Gly Asp Pro Asp Lys Gly Glu Asn His Ala Arg Pro Val Leu  
210 215 220  
Gly Gly Asn Asp Thr Phe Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg  
225 230 235 240  
Lys Pro Thr Arg Lys Asp Pro Asn Ser Glu Ser Arg Ser Asn Asp Val  
245 250 255  
Tyr Leu Pro Arg Asp Glu Ala Phe Gly His Leu Lys Ser Ser Asp Phe  
260 265 270  
Leu Thr Tyr Gly Leu Lys Ser Val Ser Gln Asn Val Leu Pro Leu Leu  
275 280 285  
Gln Ser Ala Phe Asp Leu Asn Phe Thr Pro Arg Glu Phe Asp Ser Phe  
290 295 300  
Asp Glu Val His Gly Leu Tyr Ser Gly Gly Ile Lys Leu Pro Thr Asp  
305 310 315 320  
Ile Ile Ser Lys Ile Ser Pro Leu Pro Val Leu Lys Glu Ile Phe Arg  
325 330 335  
Thr Asp Gly Glu Gln Ala Leu Lys Phe Pro Pro Pro Lys Val Ile Gln  
340 345 350  
Val Ser Lys Ser Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met  
355 360 365  
Leu Ala Gly Val Asn Pro Asn Leu Ile Arg Cys Leu Lys Asp Phe Pro  
370 375 380  
Pro Arg Ser Lys Leu Asp Ser Gln Val Tyr Gly Asp His Thr Ser Gln  
385 390 395 400

Ile Thr Lys Glu His Leu Glu Pro Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Glu Ala Ile Gln Asn Lys Arg Leu Phe Leu Leu Asp His His Asp Pro  
 420 425 430  
 Ile Met Pro Tyr Leu Arg Arg Ile Asn Ala Thr Ser Thr Lys Ala Tyr  
 435 440 445  
 Ala Thr Arg Thr Ile Leu Phe Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Arg Pro  
 450 455 460  
 Leu Ala Ile Glu Leu Ser Leu Pro His Pro Gln Gly Asp Gln Ser Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Phe Ser Gln Val Phe Leu Pro Ala Asp Glu Gly Val Glu Ser Ser  
 485 490 495  
 Ile Trp Leu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Val Val Asn Asp Ser Cys Tyr  
 500 505 510  
 His Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Val Glu Pro  
 515 520 525  
 Phe Ile Ile Ala Thr Asn Arg His Leu Ser Val Val His Pro Ile Tyr  
 530 535 540  
 Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Gly Leu  
 545 550 555 560  
 Ala Arg Leu Ser Leu Val Asn Asp Gly Gly Val Ile Glu Gln Thr Phe  
 565 570 575  
 Leu Trp Gly Arg Tyr Ser Val Glu Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp  
 580 585 590  
 Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly  
 595 600 605  
 Met Ala Ile Glu Asp Pro Ser Cys Pro His Gly Ile Arg Leu Val Ile  
 610 615 620  
 Glu Asp Tyr Pro Tyr Thr Val Asp Gly Leu Glu Ile Trp Asp Ala Ile  
 625 630 635 640  
 Lys Thr Trp Val His Glu Tyr Val Phe Leu Tyr Tyr Lys Ser Asp Asp  
 645 650 655  
 Thr Leu Arg Glu Asp Pro Glu Leu Gln Ala Cys Trp Lys Glu Leu Val  
 660 665 670  
 Glu Val Gly His Gly Asp Lys Lys Asn Glu Pro Trp Trp Pro Lys Met  
 675 680 685  
 Gln Thr Arg Glu Glu Leu Val Glu Ala Cys Ala Ile Ile Ile Trp Thr  
 690 695 700  
 Ala Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Gly  
 705 710 715 720  
 Gly Leu Ile Leu Asn Arg Pro Thr Leu Ser Arg Arg Phe Met Pro Glu  
 725 730 735  
 Lys Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Leu Arg Lys Asn Pro Gln Lys Ala

			740					745				750			
Tyr	Leu	Lys	Thr	Ile	Thr	Pro	Lys	Phe	Gln	Thr	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser
		755					760					765			
Val	Ile	Glu	Ile	Leu	Ser	Arg	His	Ala	Ser	Asp	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly
	770					775					780				
Glu	Arg	Asp	Asn	Pro	Asn	Trp	Thr	Ser	Asp	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala
785					790					795					800
Phe	Lys	Arg	Phe	Gly	Asn	Lys	Leu	Ala	Gln	Ile	Glu	Asn	Lys	Leu	Ser
				805					810					815	
Glu	Arg	Asn	Asn	Asp	Glu	Lys	Leu	Arg	Asn	Arg	Cys	Gly	Pro	Val	Gln
			820					825					830		
Met	Pro	Tyr	Thr	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Ser	Lys	Glu	Gly	Leu	Thr	Phe
		835					840					845			
Arg	Gly	Ile	Pro	Asn	Ser	Ile	Ser	Ile							
	850					855									

<210> 18

<211> 864

<212> PRT

5 <213> *Hordeum vulgare*

<400> 18

Met	Leu	Gly	Val	Gly	Gly	Ile	Val	Ser	Asp	Leu	Thr	Gly	Gly	Ile	Arg
1				5					10					15	
Gly	Ala	His	Leu	Lys	Gly	Ser	Val	Val	Leu	Met	Arg	Lys	Asn	Ala	Leu
			20					25					30		
Asp	Phe	Asn	Asp	Phe	Gly	Ala	His	Val	Met	Asp	Gly	Val	Thr	Glu	Leu
		35					40					45			
Leu	Gly	Arg	Gly	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Ile	Ser	Ser	Thr	Asn	Val	Asp
	50					55					60				
His	Asn	Asn	Gly	Gly	Arg	Gly	Lys	Val	Gly	Ala	Glu	Ala	Asn	Leu	Glu
65					70				75					80	
Gln	Trp	Leu	Leu	Pro	Thr	Asn	Leu	Pro	Phe	Ile	Thr	Thr	Gly	Glu	Asn
				85					90					95	
Lys	Phe	Ala	Val	Thr	Phe	Asp	Trp	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Gly	Val	Pro
			100					105					110		
Gly	Ala	Ile	Ile	Val	Lys	Asn	Asn	His	Ala	Ser	Glu	Phe	Phe	Leu	Lys
		115					120					125			
Thr	Ile	Thr	Leu	Asp	Asn	Val	Pro	Gly	Arg	Gly	Thr	Ile	Val	Phe	Val
	130					135					140				
Ala	Asn	Ser	Trp	Val	Tyr	Pro	Gln	Ala	Lys	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Arg	Val
145					150					155					160

Phe Phe Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro His Gln Met Pro Ala Ala Leu  
 165 170 175  
 Lys Pro Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln  
 180 185 190  
 Gln Gly Pro Tyr Leu Asp His Asp Arg Val Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr  
 195 200 205  
 Asn Asp Leu Gly Asp Ser Arg Asp Val Leu Gly Gly Ser Lys Asp Leu  
 210 215 220  
 Pro Tyr Pro Arg Arg Cys Arg Thr Gly Arg Lys Pro Ser Asp Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Asp His Glu Ser Arg Leu Leu Leu Leu Val Gln Asn Val Tyr Val  
 245 250 255  
 Leu Arg Asp Glu Leu Phe Gly His Leu Lys Gln Ser Asp Leu Leu Gly  
 260 265 270  
 Tyr Thr Leu Lys Gly Trp Leu Asp Gly Ile Ile Leu Ala Ile Arg Thr  
 275 280 285  
 Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu  
 290 295 300  
 Lys Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Asn Ile Pro Ala Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Val Arg Lys Arg Phe Pro Leu Gln Leu Val Lys Asp Leu Ile Pro  
 325 330 335  
 Lys Gly Gly Asp Phe Leu Leu Lys Leu Pro Lys Pro Glu Ile Ile Lys  
 340 345 350  
 Val Asp Gln Lys Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met  
 355 360 365  
 Leu Ala Gly Val Asn Pro Met Met Ile Lys Arg Leu Thr Glu Phe Pro  
 370 375 380  
 Pro Lys Ser Thr Leu Asp Pro Ser Lys Tyr Gly Asp His Thr Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Met Thr Glu Glu His Val Ala Lys Ser Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln  
 405 410 415  
 Gln Ala Leu Ala Gly Asn Arg Leu Tyr Ile Val Asp Gln His Asp Asn  
 420 425 430  
 Leu Met Pro Phe Leu Ile Asp Ile Asn Asn Leu Asp Ala Ser Phe Val  
 435 440 445  
 Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Phe Leu Arg Gly Asp Gly Thr Leu Ala  
 450 455 460  
 Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Gly Glu Leu Thr  
 465 470 475 480  
 Thr Ala Lys Ser Ala Val Tyr Thr Pro Gln His Ala Gly Val Glu Gly  
 485 490 495

Trp Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Ala Ser Val Asn Asp Tyr Gly  
 500 505 510  
 Trp His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu  
 515 520 525  
 Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Thr His Pro Val  
 530 535 540  
 Tyr Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala  
 545 550 555 560  
 Arg Ala Arg Gly Leu Leu Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Glu Met Thr  
 565 570 575  
 Val Phe Pro His Lys His Ala Met Pro Met Ser Ser Met Val Tyr Lys  
 580 585 590  
 His Trp Asn Phe Thr Glu Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg  
 595 600 605  
 Gly Met Ala Val Glu Asp Ala Ser Ser Pro His Lys Val Arg Leu Leu  
 610 615 620  
 Ile Lys Asp Tyr Pro Tyr Ala Thr Asp Gly Leu Ala Val Trp Asp Ala  
 625 630 635 640  
 Ile Glu Gln Trp Val Ser Asp Tyr Leu Thr Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp  
 645 650 655  
 Gly Val Leu Gln Gly Asp Val Glu Leu Gln Ala Trp Trp Lys Glu Val  
 660 665 670  
 Arg Glu Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Ala Trp Trp Pro Lys  
 675 680 685  
 Met Gln Thr Val Ala Glu Leu Ile Lys Ala Cys Ala Thr Ile Ile Trp  
 690 695 700  
 Thr Gly Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr  
 705 710 715 720  
 Ser Gly Tyr His Pro Asn Lys Pro Ser Ala Ser Arg Arg Pro Met Pro  
 725 730 735  
 Val Gln Gly Ser Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Lys  
 740 745 750  
 Ala Phe Ile Arg Thr Ile Thr Ser Gln Phe His Ala Leu Val Gly Ile  
 755 760 765  
 Ser Leu Met Glu Ile Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Val Tyr Leu  
 770 775 780  
 Gly Gln His Asp Thr Pro Ala Trp Thr Ser Asp Ala Lys Ala Leu Glu  
 785 790 795 800  
 Ala Phe Lys Arg Phe Gly Ala Lys Leu Glu Gly Ile Glu Lys Gln Val  
 805 810 815  
 Val Ala Met Asn Ser Asp Pro Gln Leu Lys Asn Arg Thr Gly Pro Ala  
 820 825 830  
 Lys Phe Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Thr Gly

ES 2 376 415 T3

		835					840					845					
Gln	Ala	Glu	Gly	Leu	Thr	Ala	Arg	Gly	Ile	Pro	Asn	Ser	Ile	Ser	Ile		
	850					855					860						

**REIVINDICACIONES**

1. Una planta de cebada o porción de la misma que comprende una proteína LOX-1 mutada, en la que la actividad LOX-1 de dicha planta o porción de planta está reducida o ausente en comparación con un control no mutado, en la que dicha proteína LOX-1 mutada comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 12, en la que Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, triptófano, asparagina o glutamina.
2. La planta de cebada o porción de la misma según la reivindicación 1, en la que la actividad LOX-1 comprende la catálisis de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados libres y esterificados y de ácidos grasos octadecanoicos poliinsaturados para formar derivados de ácidos grasos 9-hidroperoxidados.
3. La planta de cebada o porción de la misma según la reivindicación 1, en la que Xaa es ácido glutámico o ácido aspártico.
4. La planta de cebada o porción de la reivindicación 3, en la que Xaa es ácido aspártico.
5. Grano o progenie vegetal que comprende una proteína LOX-1 mutada, en los que la proteína LOX-1 mutada comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID No. 12, en la que Xaa es D, E, H, K, R, T, S, Y, W, N o Q, producida a partir de la planta de cebada o porción de planta de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Una malta o mosto que comprende una proteína LOX-1 mutada, en los que la proteína LOX-1 mutada comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID No. 12, en la que Xaa es D, E, H, K, R, T, S, Y, W, N o Q, producida a partir de la planta de cebada o porción de planta de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o a partir del grano o progenie vegetal de la reivindicación 5.
7. Uso de una malta o mosto según la reivindicación 6, para la preparación de una bebida que presenta cualidades organolépticas que permanecen estables durante un periodo de tiempo medido o a temperaturas de almacenamiento elevadas en comparación con una bebida preparada a partir de un producto vegetal de un control no mutado.
8. Uso de una planta de cebada o porción de la misma, grano o progenie vegetal, o malta o mosto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de una bebida.
9. Uso de una planta de cebada o porción de la misma, grano o progenie vegetal, o malta o mosto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de una malta o cerveza.
10. Uso de una planta de cebada o porción de la misma, grano o progenie vegetal, o malta o mosto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la estabilización de las propiedades organolépticas de un producto de la fabricación de cerveza durante un periodo de tiempo medido, en comparación con un producto de fabricación de la cerveza de control producido usando una planta de cebada no mutada o porción de la misma, grano o progenie vegetal, o producto vegetal.
11. Uso de una planta de cebada o porción de la misma, grano o progenie vegetal, o malta o mosto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de un producto de la fabricación de la cerveza que tiene niveles reducidos de trans-2-nonenal libre durante un periodo de tiempo medido o en condiciones de temperatura de almacenamiento elevada, en comparación con un producto de la fabricación de cerveza de control producido usando una planta de cebada no mutada o porción de la misma, grano o progenie vegetal, o producto vegetal.
12. Un proceso para la producción de cerveza a partir de cebada en el que la cebada o una porción de la misma comprende una proteína LOX-1 mutada, en el que la actividad LOX-1 de dicha planta o porción de planta está reducida o ausente en comparación con un control no mutado, y en el que dicha proteína LOX-1 mutada comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 12, en la que Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, triptófano, asparagina o glutamina.
13. Un proceso según la reivindicación 12, en el que Xaa es ácido glutámico o ácido aspártico.
14. Un proceso según la reivindicación 13, en el que Xaa es ácido aspártico.



FIG. 1

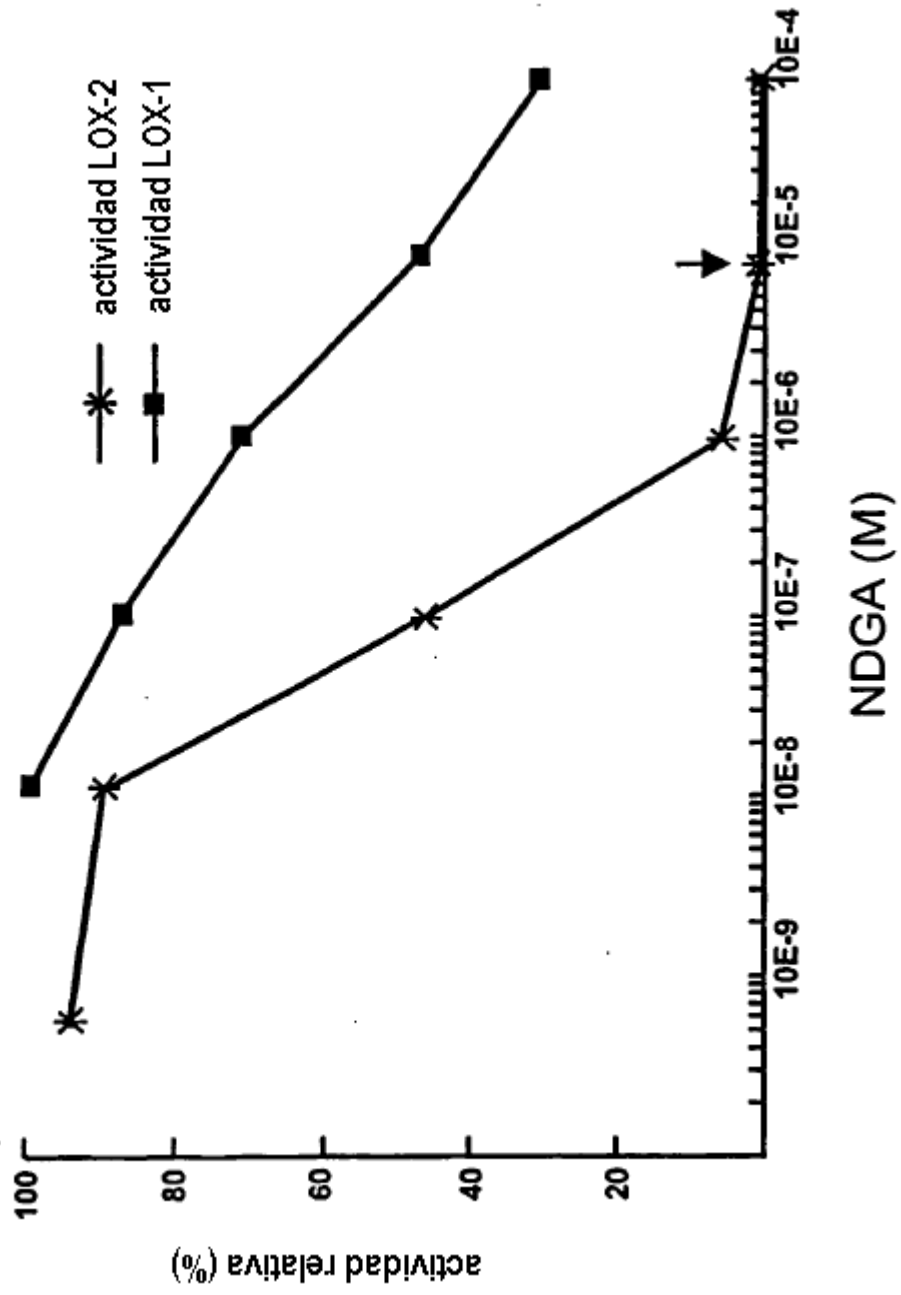


FIG. 2

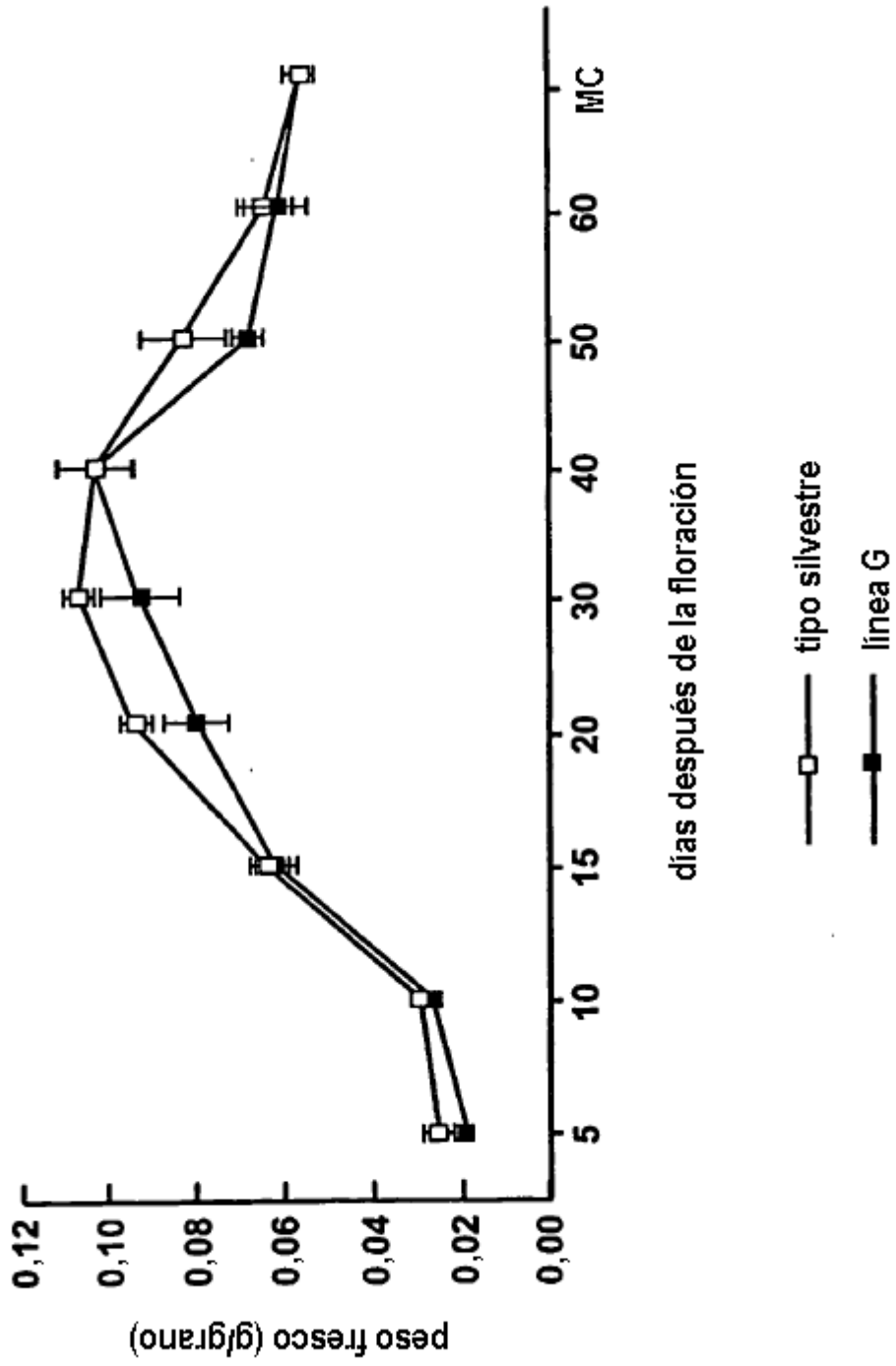


FIG. 3

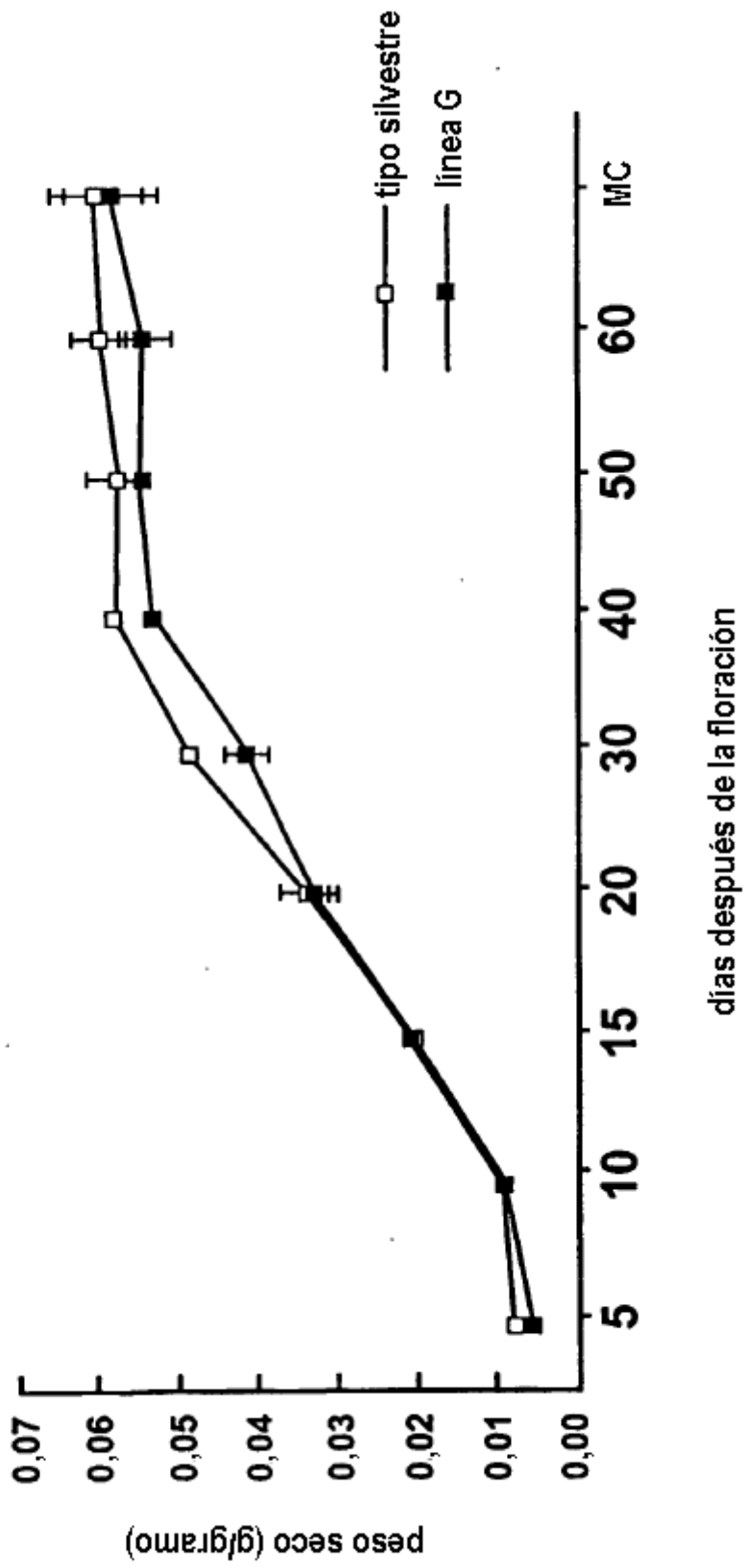
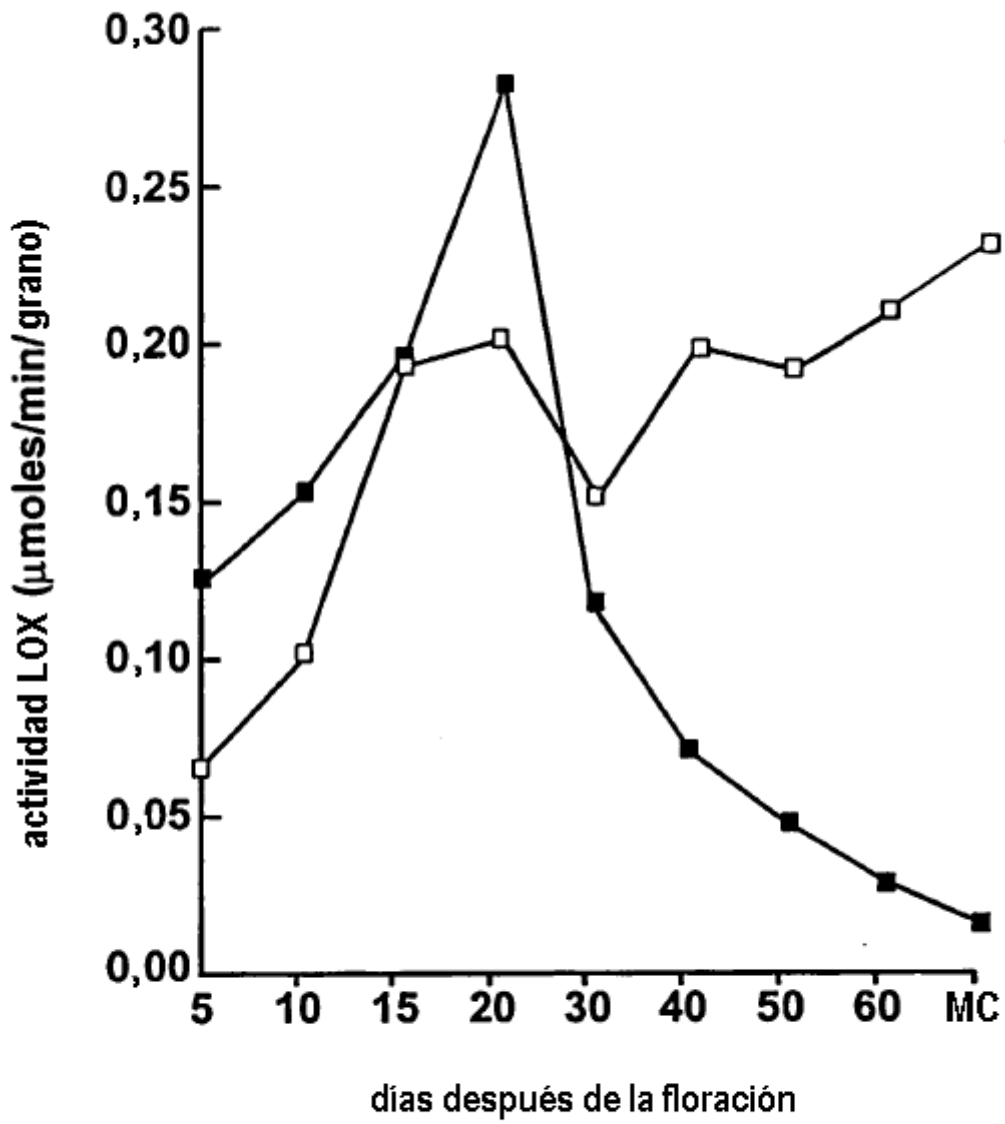
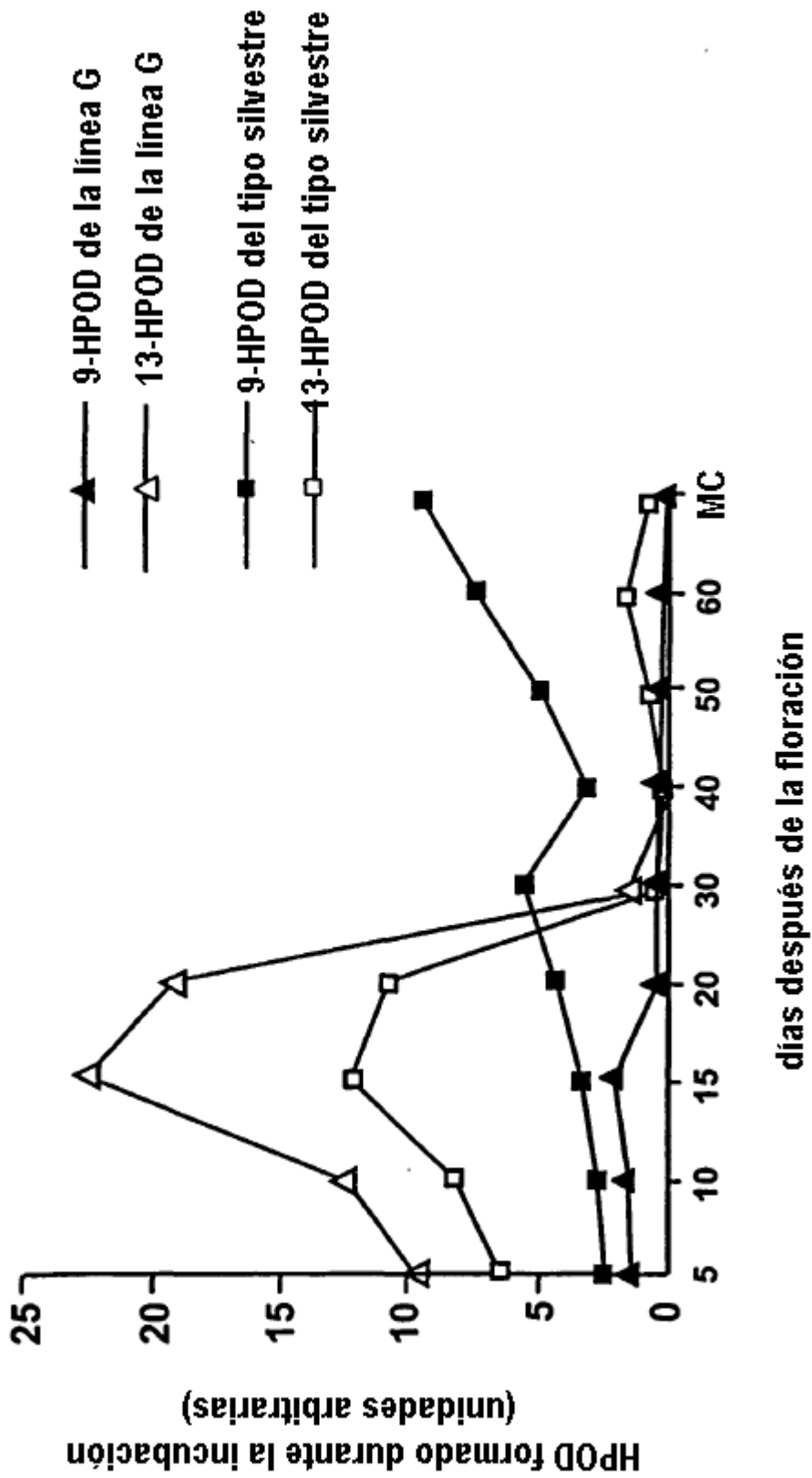


FIG. 4



—□— tipo silvestre  
 —■— línea G

FIG. 5



**FIG. 6**

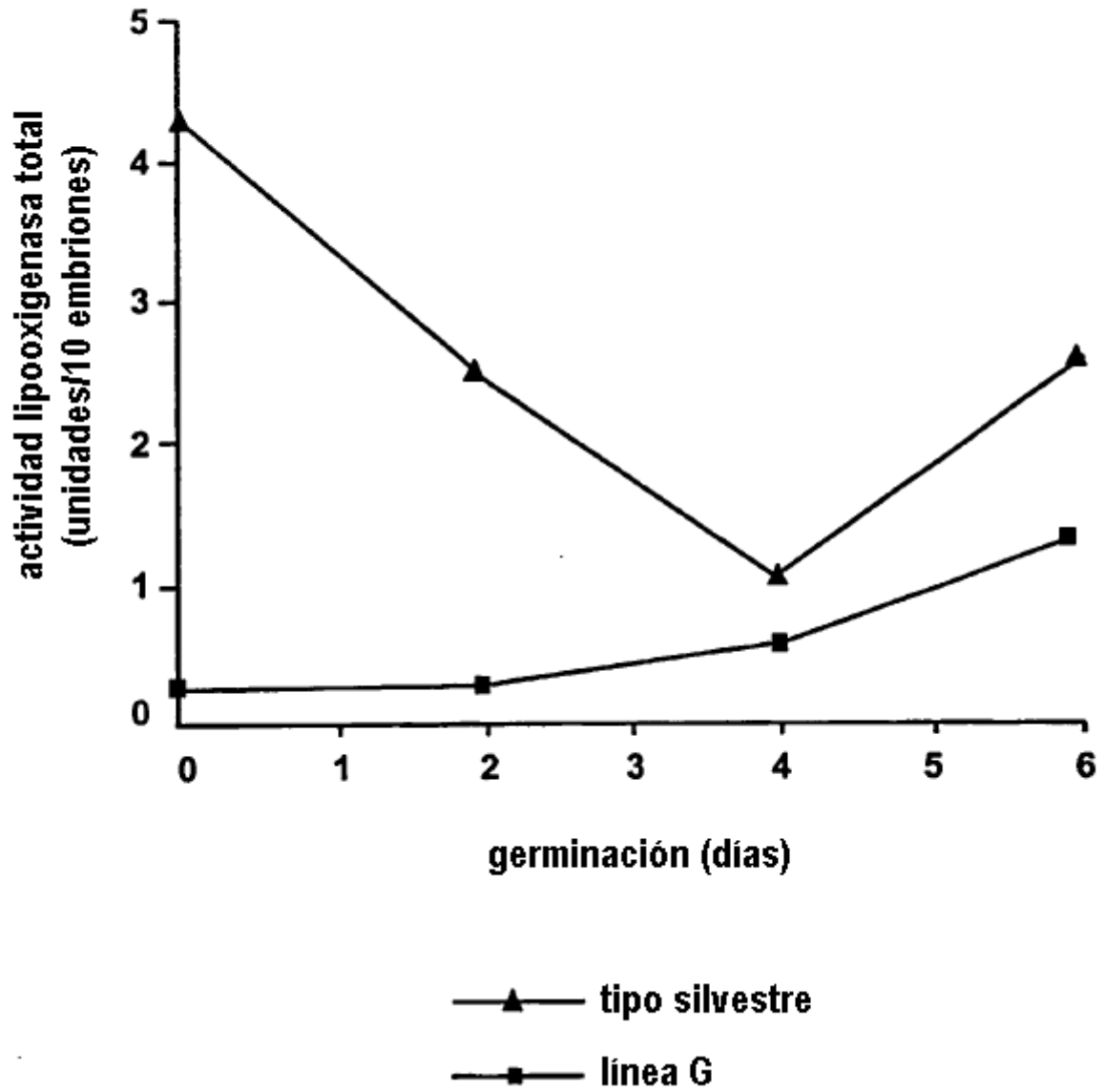


FIG. 7

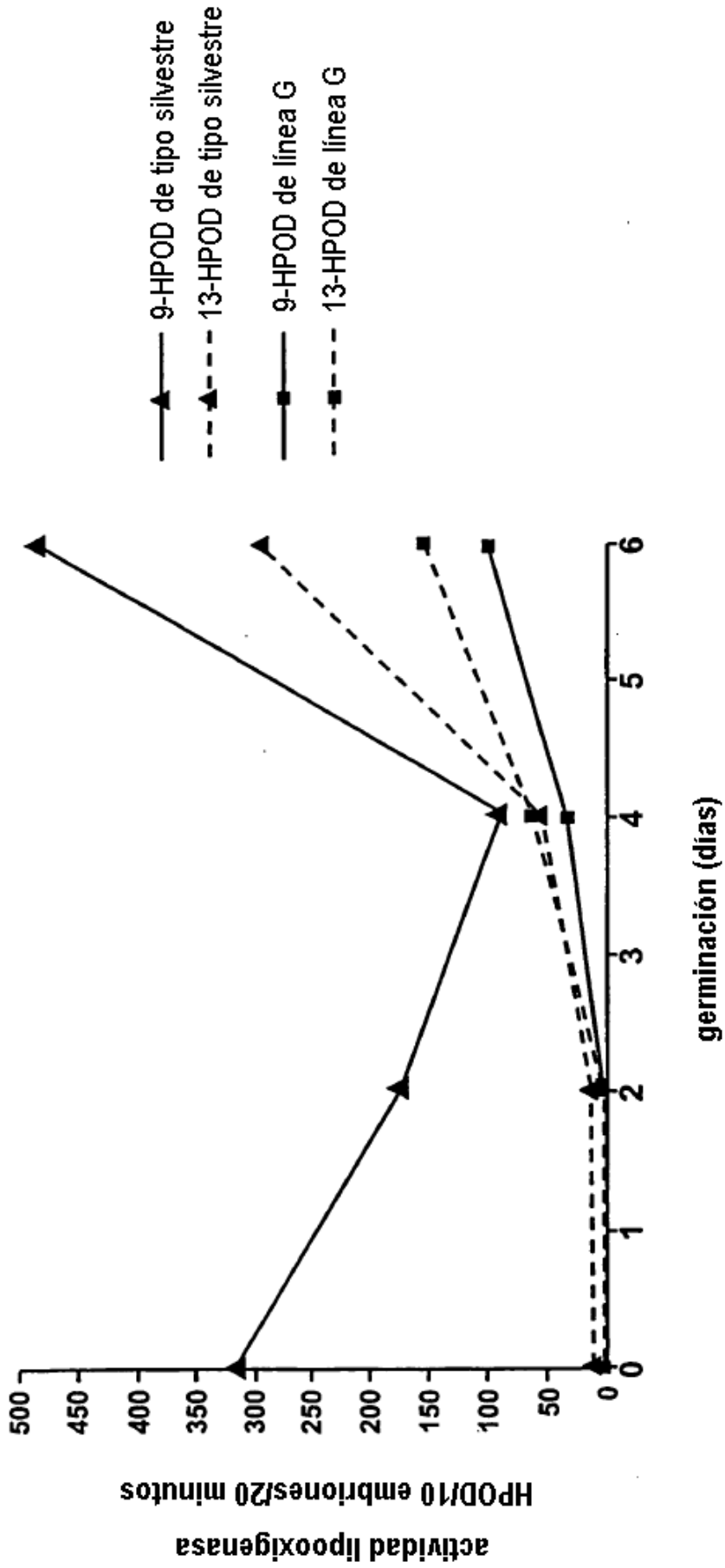


FIG. 8

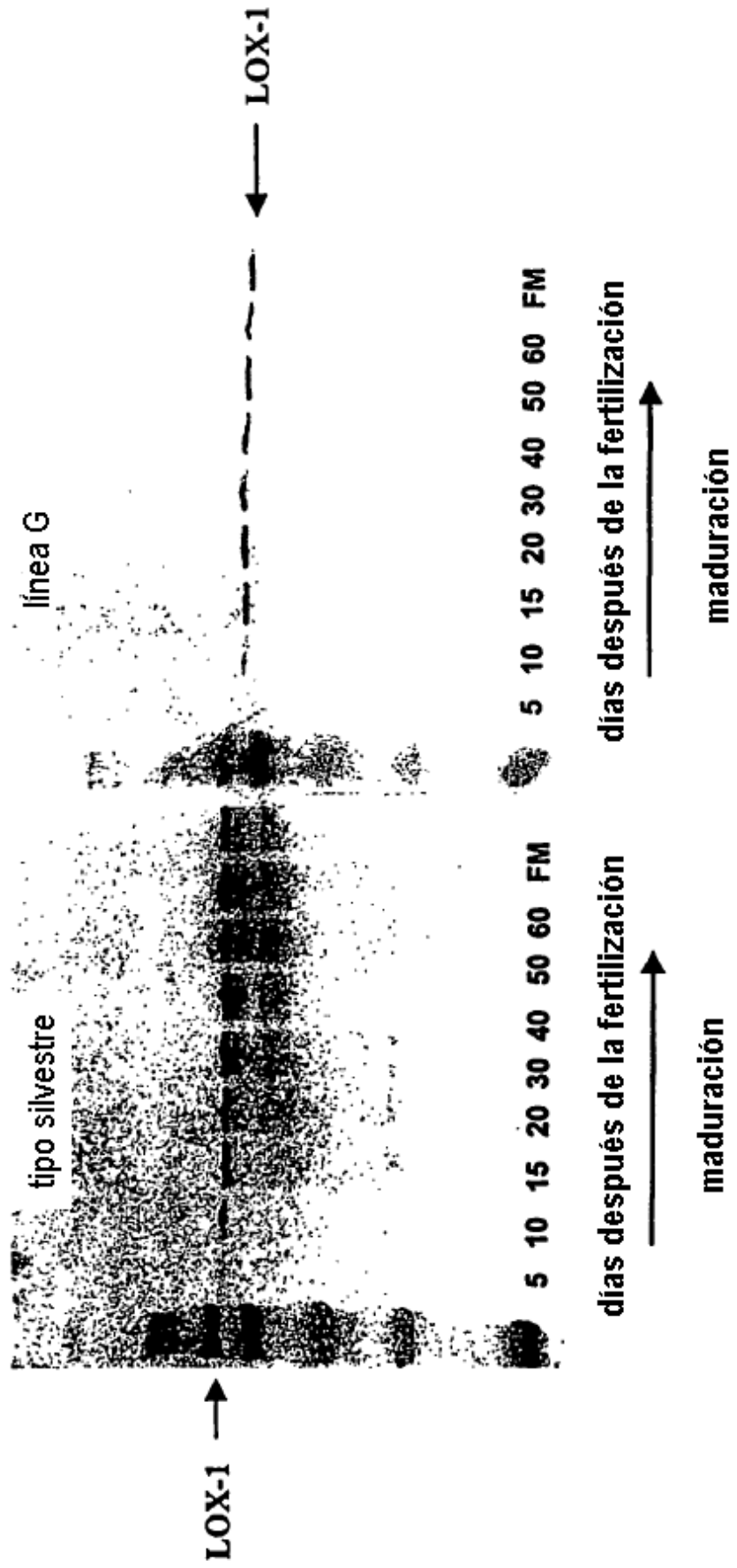
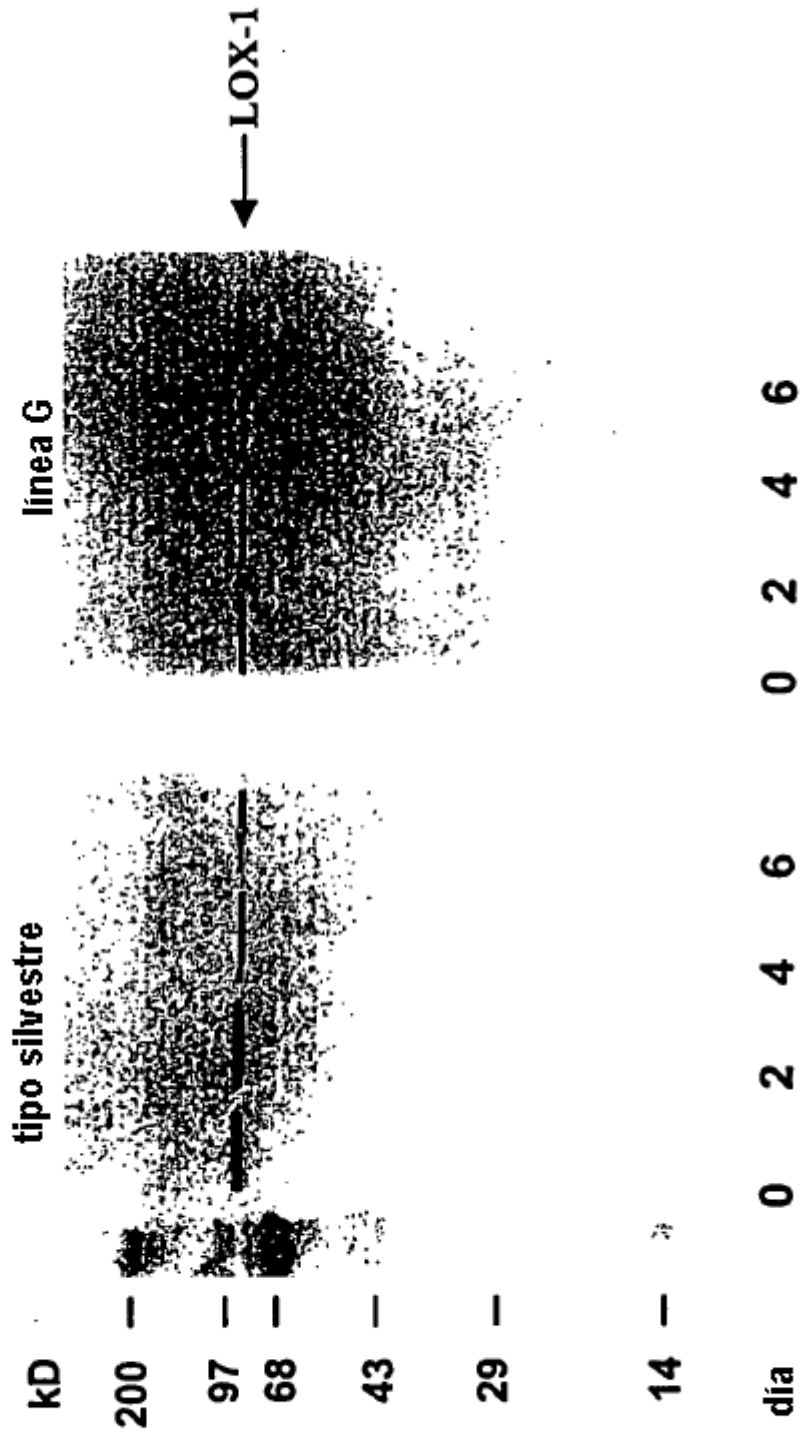




FIG. 9



**FIGURA 10**

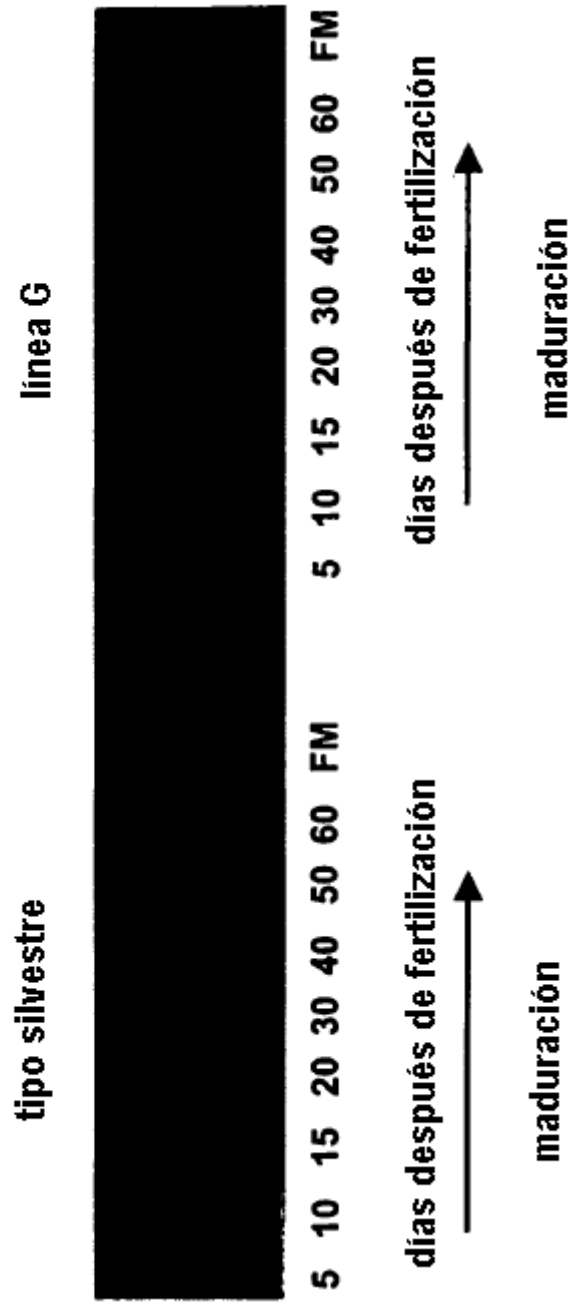
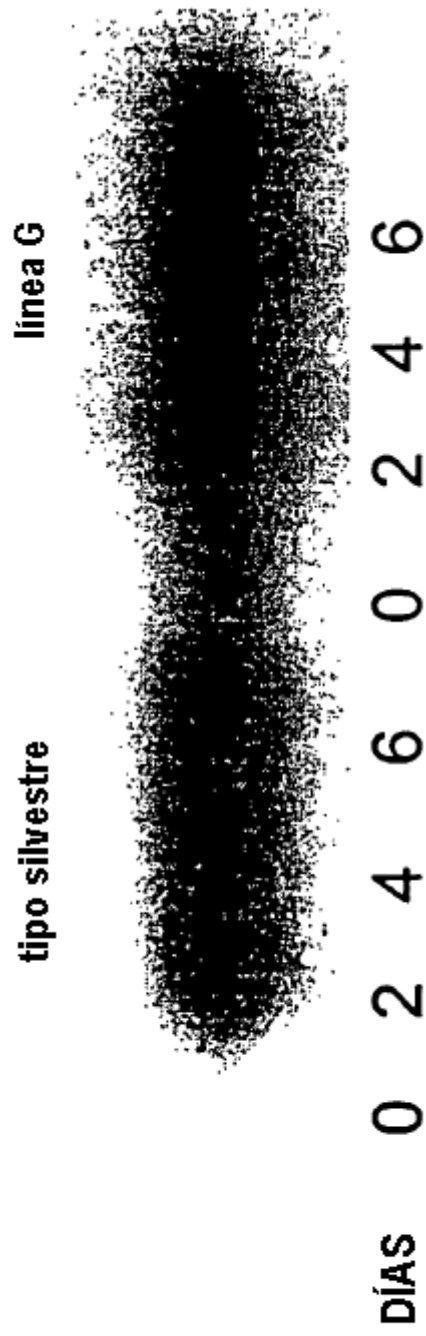


FIG. 11





**FIG. 12B**

**LG** CTGGATCGGCTAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCCGTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCCATCGAAAAAA 432  
**WT** CTGGATCGGCTAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCCGTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCCATCGAAAAAA

**LG** GAGACAAACAGCATGCATGGTGGCGCACCCAGACCAAGCAGAGCACCGGATGCTCGAGACAAAGCAAACAACAAGC 512  
**WT** GAGACAAACAGCATGCATGGTGGCGCACCCAGACCAAGCAGAGCACCCGGATGCTCGAGACAAAGCAAACAACAAGC

**LG** AAGGACGACACCGTCAAAAAGCAAACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAGCAAACAACAACCTTAAACTTAAAGCACAAAAGA 592  
**WT** AAGGACGACACCGTCAAAAAGCAAACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAGCAAACAACAACCTTAAACTTAAAGCACAAAAGA

**LG** CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCAAAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAGAGAGAGGAAAGGAA 672  
**WT** CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCAAAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAGAGAGGAAAGGAA

**LG** GTAGTAGCCATGAAAAATTAAATCACCGGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG 752  
**WT** GTAGTAGCCATGAAAAATTAAATCACCGGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG

**LG** TTCCTGTAAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAAGGTACGTGGTGGTCAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGGCGCG 832  
**WT** TTCCTGTAAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAAGGTACGTGGTGGTGCAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGGCGCG

**LG** GAGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTCGGCCCTCACCTTCGACTG 912  
**WT** GAGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTCGGCCCTCACCTTCGACTG

**LG** GGAGGTGGAGAAAGCTCGGGGTCCGGGCGCCATCGTGTCAACAACACTACCAAGCTCCGAGTTCCTGTCTTAAAAACCATCA 992  
**WT** GGAGGTGGAGAAAGCTCGGGGTCCGGGCGCCATCGTGTCAACAACAACACTACCAAGCTCCGAGTTCCTGTCTTAAAAACCATCA

**LG** CCCTCCACGACGTCCCCGGCCGACGGGCAACCTCACCTTCGTGCGCCAACCTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA 1072  
**WT** CCCTCCACGACGTCCCCGGCCGACGGGCAACCTCACCTTCGTGCGCCAACCTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA

## FIG. 12C

**LG** TACAGCCGGTCTTTCGCCAACGACGTGCGTGGATTTTCCTCTACTTTTCCTCTCCTTTTCATTTTCACCCGCCCTTCGTCA 1152  
**WT** TACAGCCGGTCTTTCGCCAACGACGTGCGTGGATTTTCCTCTACTTTTCCTCTCCTTTTCATTTTCACCCGCCCTTCGTCA  
  
**LG** TTCATGGTCGATCAATTAAGTCTTGCCAGGACAAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT 1232  
**WT** TTCATGGTCGATCAATTAAGTCTTGCCAGGACAAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT  
  
**LG** TTATTCCCGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAAGTTGCACCCGTGGCACCCGTG 1312  
**WT** TTATTCCCGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAAGTTGCACCCGTGGCACCCGTG  
  
**LG** GCAGCGTGGTAGGTGAAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCCACATGATGTTTTTCATGAAATAAACTTTTAAAGGATGTGT 1392  
**WT** GCAGCGTGGTAGGTGAAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCCACATGATGTTTTTCATGAAATAAACTTTTAAAGGATGTGT  
  
**LG** CTAGCCACATCTAGATGCATGTACATAAATATTGCATACCAAAACGATTAATAAAGCATAAAAGAAAAGGAAAAAAA 1472  
**WT** CTAGCCACATCTAGATGCATGTACATAAATATTGCATACCAAAACGATTAATAAAGCATAAAAGAAAAGGAAAAAAA  
  
**LG** TACTCACATATCTGACCGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT 1552  
**WT** TACTCACATATCTGACCGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT  
  
**LG** TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAAAATCAGTGGATCTCTCTATGCATTTCATT 1632  
**WT** TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAAAATCAGTGGATCTCTCTATGCATTTCATT  
  
**LG** ATGTAGTCTATAATAAAAATCTTTAAAGATCGTATAATTTTGCAACGGAGGGAGTAAAACATAAACTTTTAAATAGTAAATGT 1712  
**WT** ATGTAGTCTATAATAAAAATCTTTAAAGATCGTATAATTTTGCAACGGAGGGAGTAAAACATAAACTTTTAAATAGTAAATGT

**FIG. 12D**

**LG** TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACTCTGCCGAGCCAGATGCCCGGGCGCTGAAGCCGTACCCGGACGACGAGCTCCG 1792  
**WT** TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACTCTGCCGAGCCAGATGCCCGGGCGCTGAAGCCGTACCCGGACGACGAGCTCCG

**LG** GAACTGCGTGGCGACGACCAGCAGGGCCCGTACCAGGAGCACGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG 1872  
**WT** GAACTGCGTGGCGACGACCAGCAGGGCCCGTACCAGGAGCACGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG

**LG** GCGAGGGCCGCCCATCCTCGGGGCAACTCCGACCACTCCCTTACCCTGGCCGCGCAGGAGCGCAAGCCCAACGCC 1952  
**WT** GCGAGGGCCGCCCATCCTCGGGGCAACTCCGACCACTCCCTTACCCTGGCCGCGCAGGAGCGCAAGCCCAACGCC

**LG** AGCACCAGCCTGGAGAGCCGGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGGGACGAGAAAGTTCGGCCACCTCAA 2032  
**WT** AGCACCAGCCTGGAGAGCCGGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGGGACGAGAAAGTTCGGCCACCTCAA

**LG** GACGTCCGACTTCCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCAGCAGGGCATCCTGCCGGCGTGCGCACCTACGTGGACACCA 2112  
**WT** GACGTCCGACTTCCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCAGCAGGGCATCCTGCCGGCGTGCGCACCTACGTGGACACCA

**LG** CCCCCGGGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGTGCCTCAAGGTGGCCGCCCTG 2192  
**WT** CCCCCGGGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGTGCCTCAAGGTGGCCGCCCTG

**LG** GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCTCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCGGCGGACTCCCTGCTTAAGTCCC 2272  
**WT** GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCTCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCGGCGGACTCCCTGCTTAAGTCCC

**LG** CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAAGCAGGCGTGGAGGACCGACGAGGAGTTCGCACGGGAGGTGCTCGCCGA CGTCA 2352  
**WT** CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAAGCAGGCGTGGAGGACCGACGAGGAGTTCGCACGGGAGGTGCTCGCCGGCGTCA  
 (sitiu mutante) \*

**FIG. 12E**

**LG** ACCCGGTCAATGATCACCGGTCACCGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCATTTGTGTGTATGGTGTCCATGGTGAGAAAG 2432  
**WT** ACCCGGTCAATGATCACCGGTCACCGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCATTTGTGTGTATGGTGTCCATGGTGAGAAAG

**LG** TGCAGATCTTGATTTGGGTTGGGTCGCATGCACCGCATGCTGCATGCATGCAGGAGTTCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC 2512  
**WT** TGCAGATCTTGATTTGGGTTGGGTCGCATGCACCGCATGCTGCATGCATGCAGGAGTTCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC

**LG** CTAGCAAGTTTGGTGACCAACAGCACCATCACGGGGAGCACATAGAGAAGAACTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG 2592  
**WT** CTAGCAAGTTTGGTGACCAACAGCACCATCACGGGGAGCACATAGAGAAGAACTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG

**LG** GTAATTGGTCCAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCTAGGAGTAATTGGTAGCTGTAGATAAATTTGGCTTCGTTGCA 2672  
**WT** GTAATTGGTCCAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCTAGGAGTAATTGGTAGCTGTAGATAAATTTGGCTTCGTTGCA

**LG** ATTAATTTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTGCAGGCGCTGGAAGCAACAGGCTGTACATCC 2752  
**WT** ATTAATTTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTGCAGGCGCTGGAAGCAACAGGCTGTACATCC

**LG** TTGATCACCATGACCGGTTCAATGCCGTTCTTGATCGACGTCACAACCTGCCCGGCAACTTCACTACGCCACGAGGACC 2832  
**WT** TTGATCACCATGACCGGTTCAATGCCGTTCTTGATCGACGTCACAACCTGCCCGGCAACTTCACTACGCCACGAGGACC

**LG** CTCCTTCTCCTGCGGGGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGCGGCCCTTAC 2912  
**WT** CTCCTTCTCCTGCGGGGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGCGGCCCTTAC

**LG** CACGGCCAAGAGCAAGGTTTACACGCCGGTGCCACGGGCTCCGTCGAAGGCTGGGTGGGAGCTCGCCAAGGCCTACG 2992  
**WT** CACGGCCAAGAGCAAGGTTTACACGCCGGTGCCACGGGCTCCGTCGAAGGCTGGGTGGGAGCTCGCCAAGGCCTACG

**LG** TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTTCGATGATTCAGTCAGTCGA 3072  
**WT** TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTTCGATGATTCAGTCAGTCGA



## FIG. 12F

**LG** TGCACAACAACACTGATCGAAAATATGATTGATTGAAACCGCGCAGGCTGAACAACACTCACGCGGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT 3152  
**WT** TGCACAACAACACTGATCGAAAATATGATTGATTGAAACCGCGCAGGCTGAACAACACTCACGCGGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT

**LG** CGACGAACCGGCACCTTAGCGTGACGCACCCGGTGCACAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCCATGACCATCAAC 3232  
**WT** CGACGAACCGGCACCTTAGCGTGACGCACCCGGTGCACAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCCATGACCATCAAC

**LG** GCGCTGGCGGGCAGACGCTCATCAACGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACCGTGTTCGCCGGCAAGTTCGCCGTTGGGGAT 3312  
**WT** GCGCTGGCGGGCAGACGCTCATCAACGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACCGTGTTCGCCGGCAAGTTCGCCGTTGGGGAT

**LG** GTCGGCCGTGGTGACAAGGACTGGAAATTCAACCGAGCAGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA 3392  
**WT** GTCGGCCGTGGTGACAAGGACTGGAAATTCAACCGAGCAGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA

**LG** AATGTTATGAAATGTGTAAAACAAATTGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCAATGGCGG 3472  
**WT** AATGTTATGAAATGTGTAAAACAAATTGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCAATGGCGG

**LG** TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTCTCGGACTACCCGTACCGCGGCGGACGGGCTGGCGATCTGG 3552  
**WT** TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTCTCGGACTACCCGTACCGCGGCGGACGGGCTGGCGATCTGG

**LG** CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAAACGACGGCGTGTGCAGGGCGATACGGAGGT 3632  
**WT** CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAAACGACGGCGTGTGCAGGGCGATACGGAGGT

**LG** GCAGGCGTGGTGGAAAGGAGACGCGGAGGTGCGGACCGGCACTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCAAGATGCAAAAGTG 3712  
**WT** GCAGGCGTGGTGGAAAGGAGACGCGGAGGTGCGGACCGGCACTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCAAGATGCAAAAGTG

**FIG. 12G**

**LG** TGCCGGAGCTGGCCAAAGCGTGCACCCATCACTGGATCGGGTCGGCGTGCATGCCGAGTCAACTTCGGGCAGTAC 3792  
**WT** TGCCGGAGCTGGCCAAAGCGTGCACCCATCACTGGATCGGGTCGGCGTGCATGCCGAGTCAACTTCGGGCAGTAC

**LG** CCCTACGCGGGGTTCTCCCGAACCGGCCGACGGTGAAGCCGGCCGCGCATGCCGGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCCGGA 3872  
**WT** CCCTACGCGGGGTTCTCCCGAACCGGCCGACGGTGAAGCCGGCCGCGCATGCCGGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCCGGA

**LG** GCTGGAGCGGACCCGGAGCGGGCCCTTCATCCACACCATCACGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTGCTGG 3952  
**WT** GCTGGAGCGGACCCGGAGCGGGCCCTTCATCCACACCATCACGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTGCTGG

**LG** AGGTGCTGTGCGAAGCACTCCTCCGACGAGCTGTACTCCTGGGCAGCGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCCAAAGGCC 4032  
**WT** AGGTGCTGTGCGAAGCACTCCTCCGACGAGCTGTACTCCTGGGCAGCGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCCAAAGGCC

**LG** CTGGAGGTGTTCAAGCGGTTCAGCGACCGGCTGGTGGAGATCGAGAGCAAGGTGGTGGCATGAACCATGACCCGGAGCT 4112  
**WT** CTGGAGGTGTTCAAGCGGTTCAGCGACCGGCTGGTGGAGATCGAGAGCAAGGTGGTGGCATGAACCATGACCCGGAGCT

**LG** CAAGAACCGCAACGGCCCGGCTAAGTTTCCCTACATGCTGCTTACCCCAACACCTCCGACCCACAAGGGCCGCTGCCG 4192  
**WT** CAAGAACCGCAACGGCCCGGCTAAGTTTCCCTACATGCTGCTTACCCCAACACCTCCGACCCACAAGGGCCGCTGCCG

terminación de la traducción (4229)

**LG** GGCTTACCGCCAAGGGCATCCCAACAGCATCTCCATCTAACTAAGCCATCGGCAACCATGGATGAATAAAGGGCGTTC 4272  
**WT** GGCTTACCGCCAAGGGCATCCCAACAGCATCTCCATCTAACTAAGCCATCGGCAACCATGGATGAATAAAGGGCGTTC

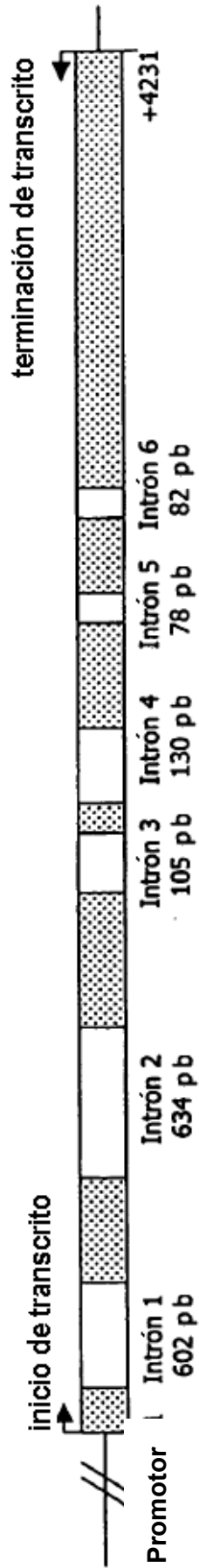
**LG** GCCACGTACGAAACTTGTGAGAGATTGGTGTAGTGTGTGTGACAGTACTATGTCAGCAGTTGCTCTTTAAGCCGA 4352  
**WT** GCCACGTACGAAACTTGTGAGAGATTGGTGTAGTGTGTGTGACAGTACTATGTCAGCAGTTGCTCTTTAAGCCGA

**LG** ATAAATAAAGCAGATTTGCTTCC  
**WT** ATAAATAAAGCAGATTTGCTTCC

4375

**FIG. 13**

**Estructura del gen *lox-1* de tipo silvestre**



**Estructura del gen *lox-1* de la línea G**

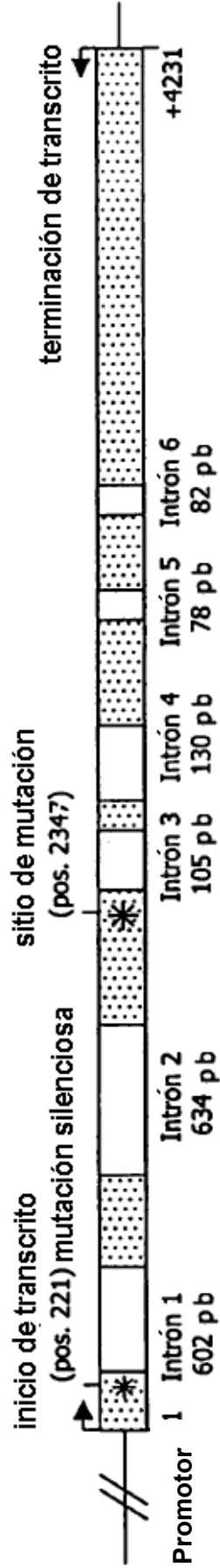


FIG. 14

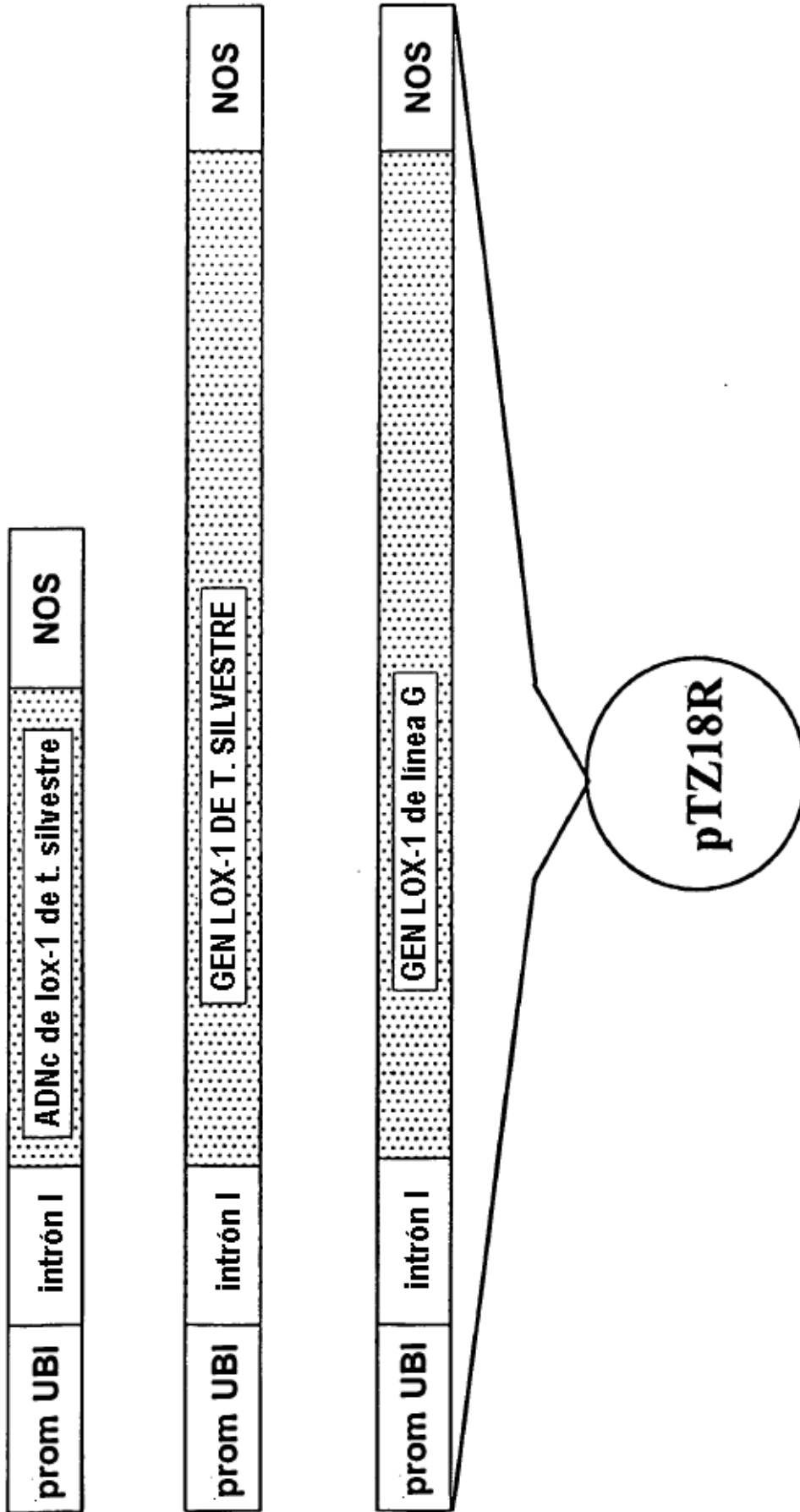


FIG. 15

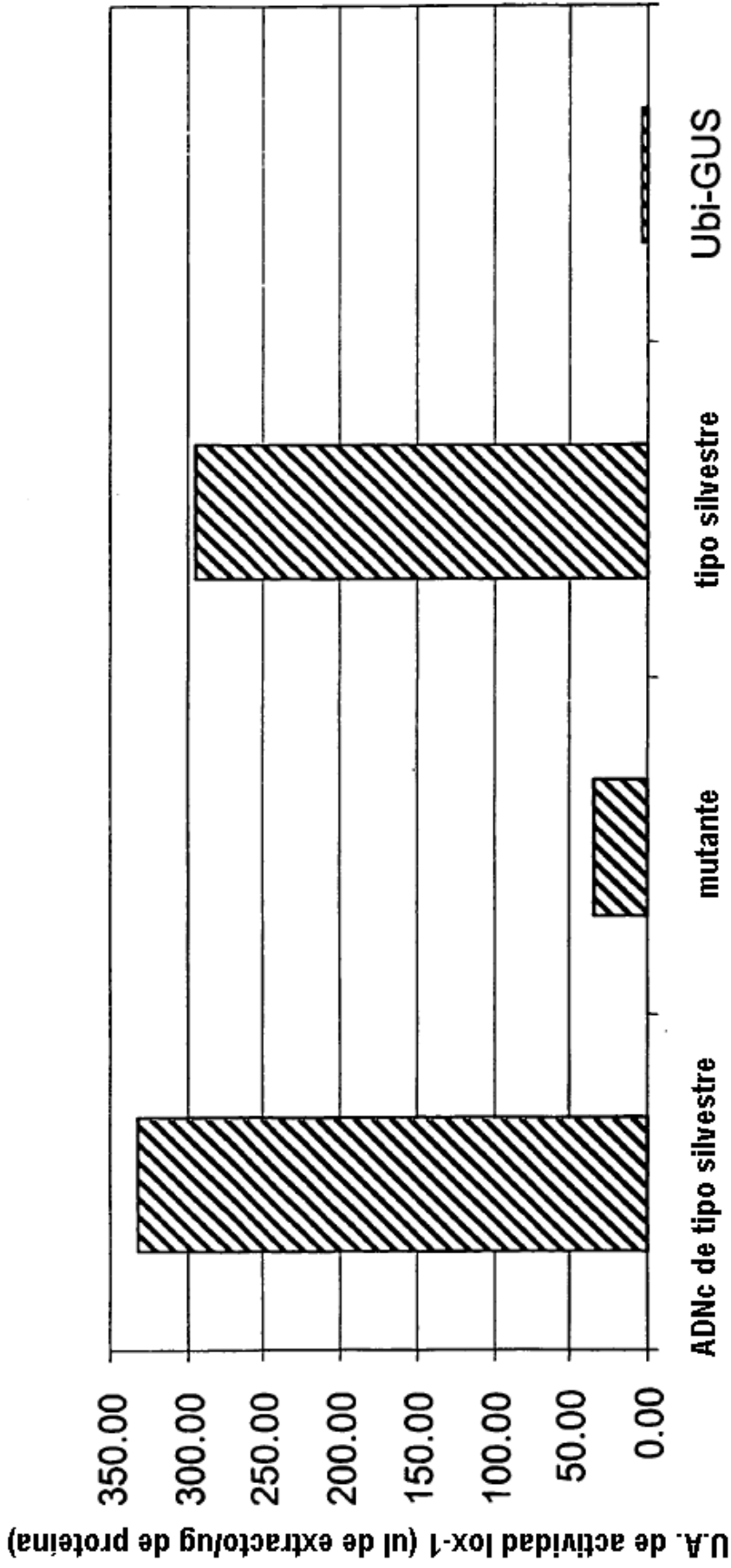


FIG. 16

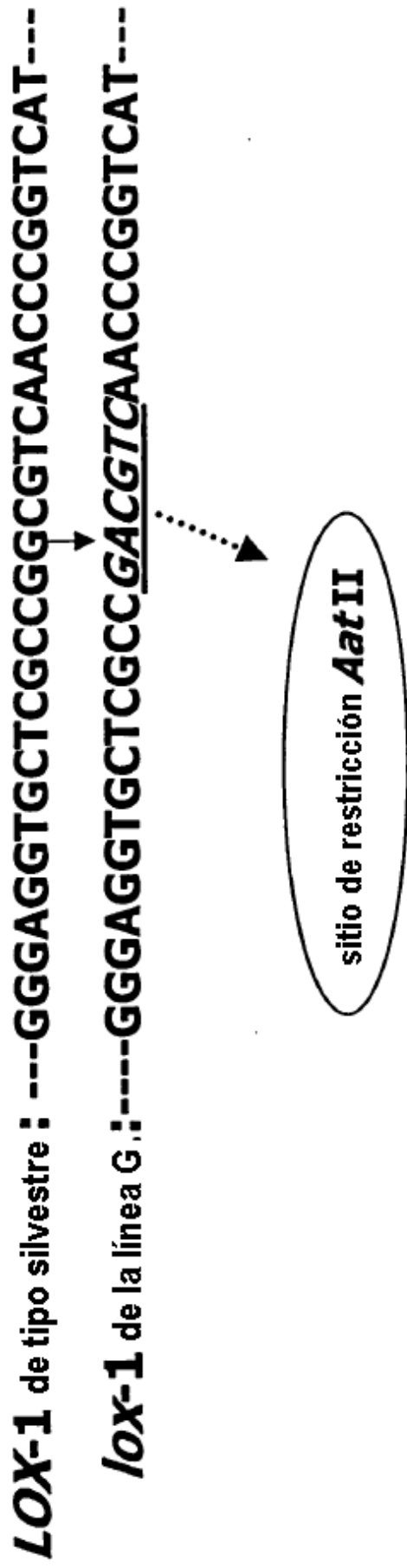




FIG. 18

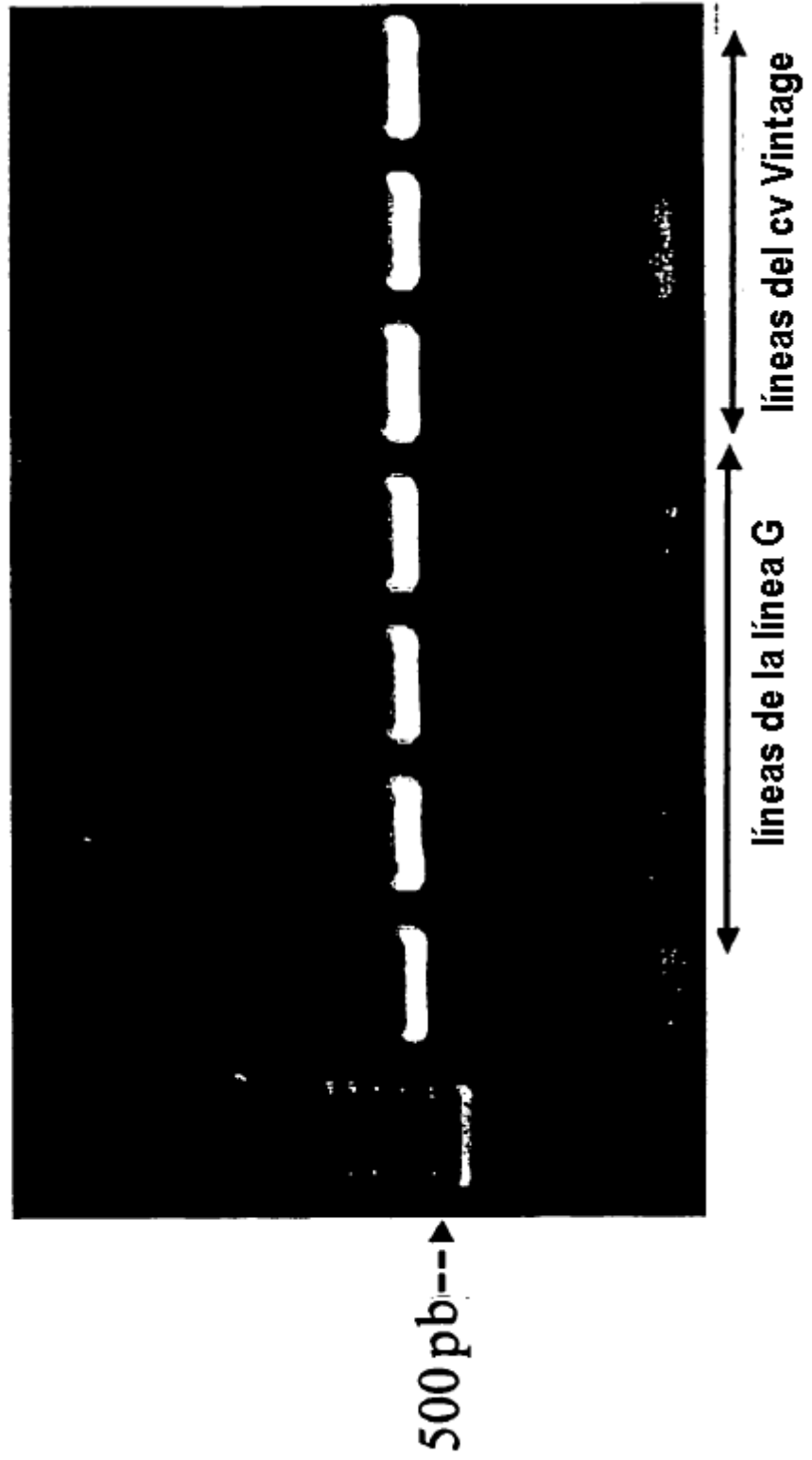
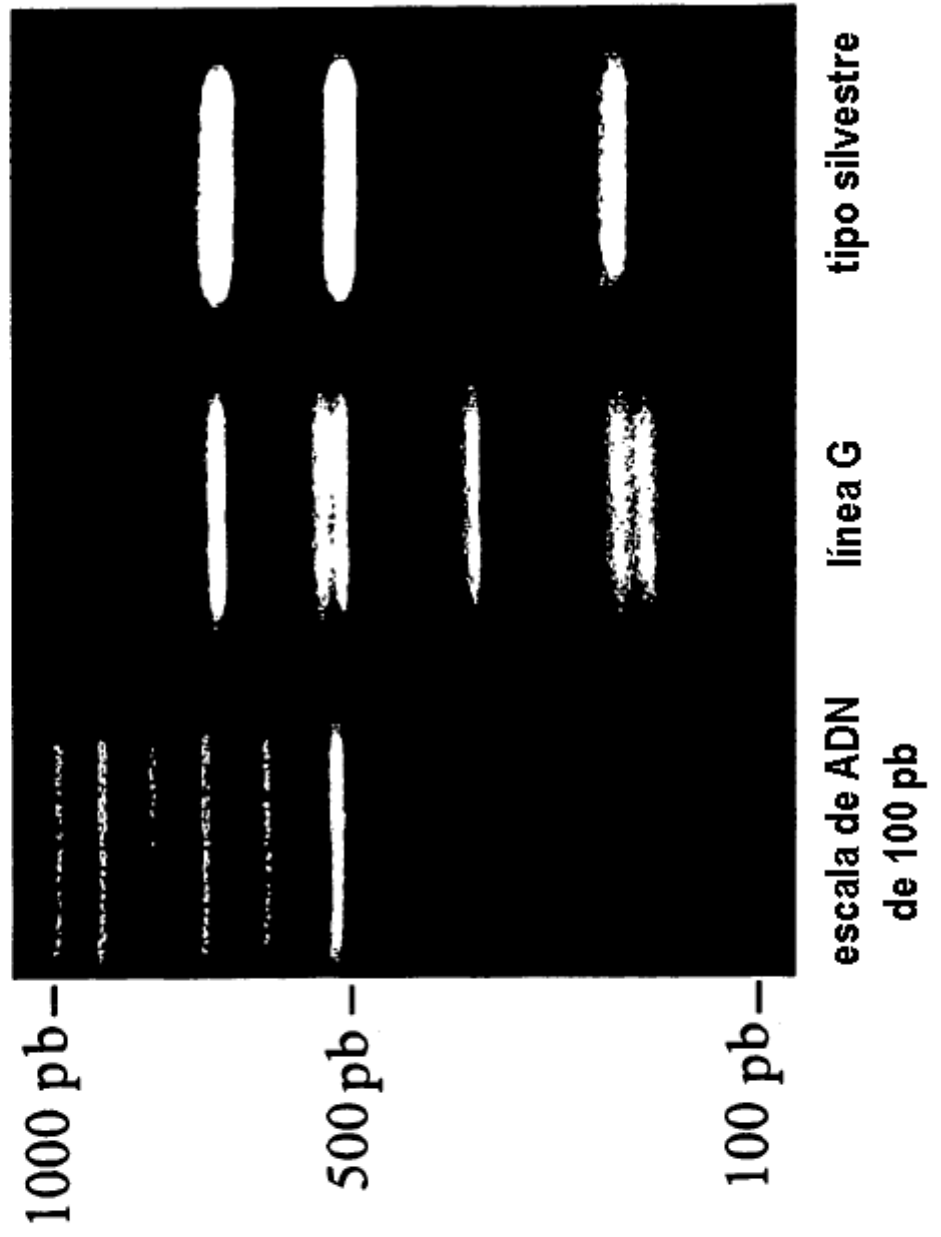




FIG. 19



**FIG. 20**  
Programa de retrocruzamiento de la línea G al cv Alexis

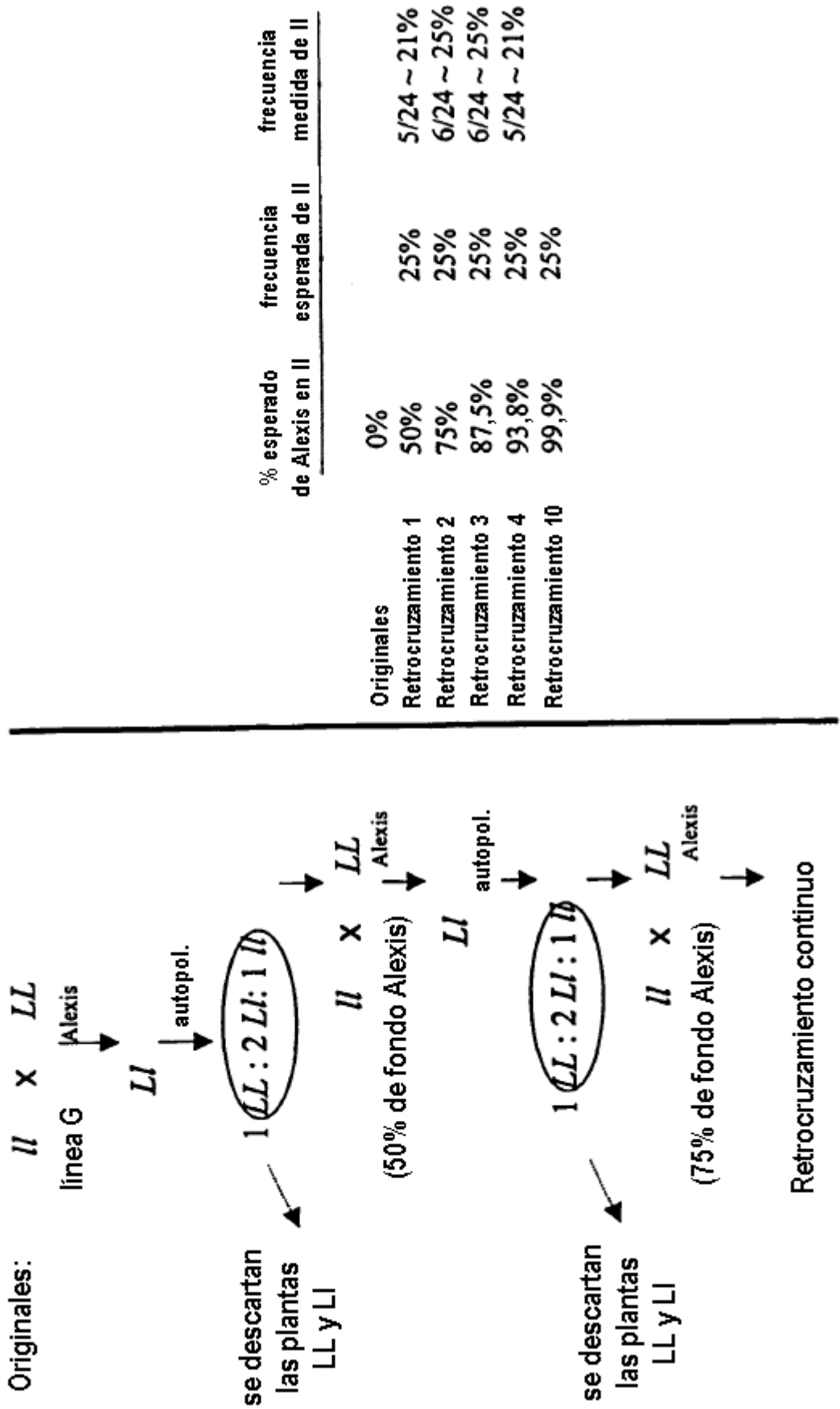


FIG. 21

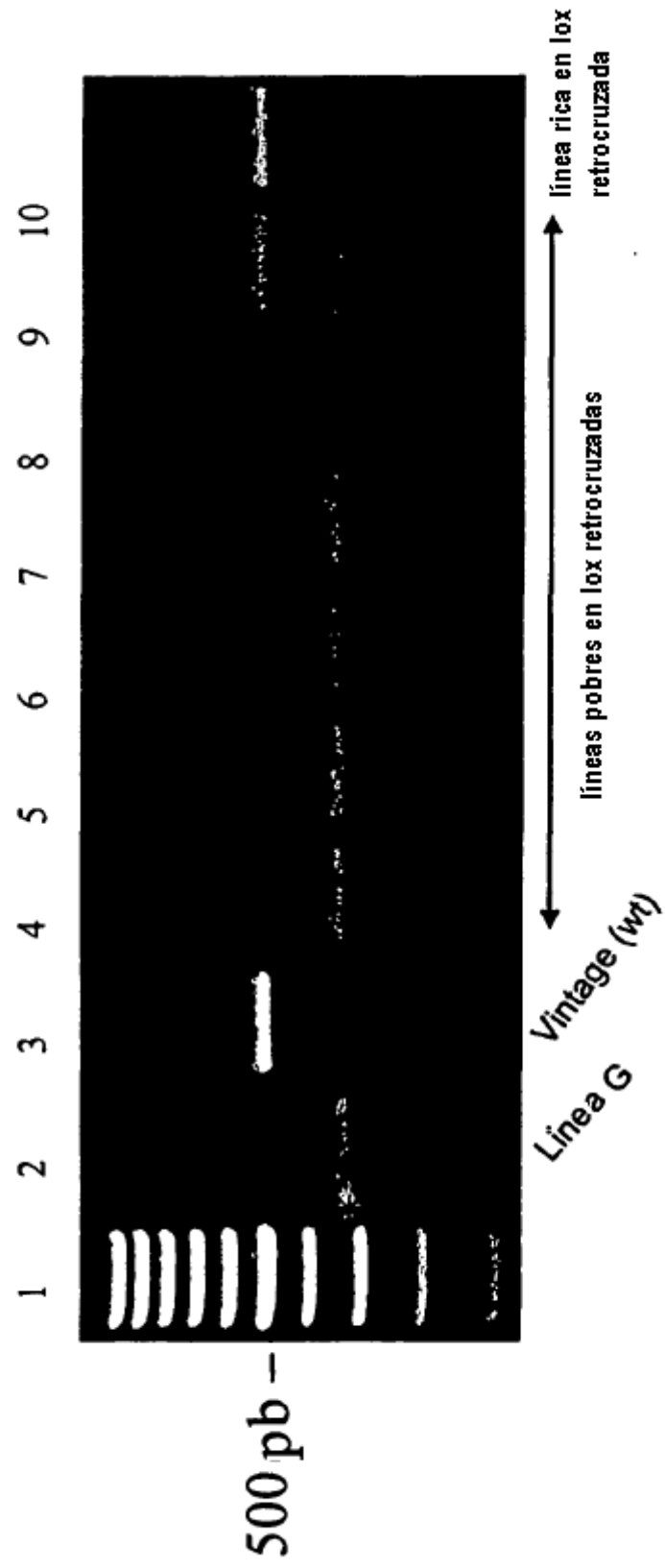
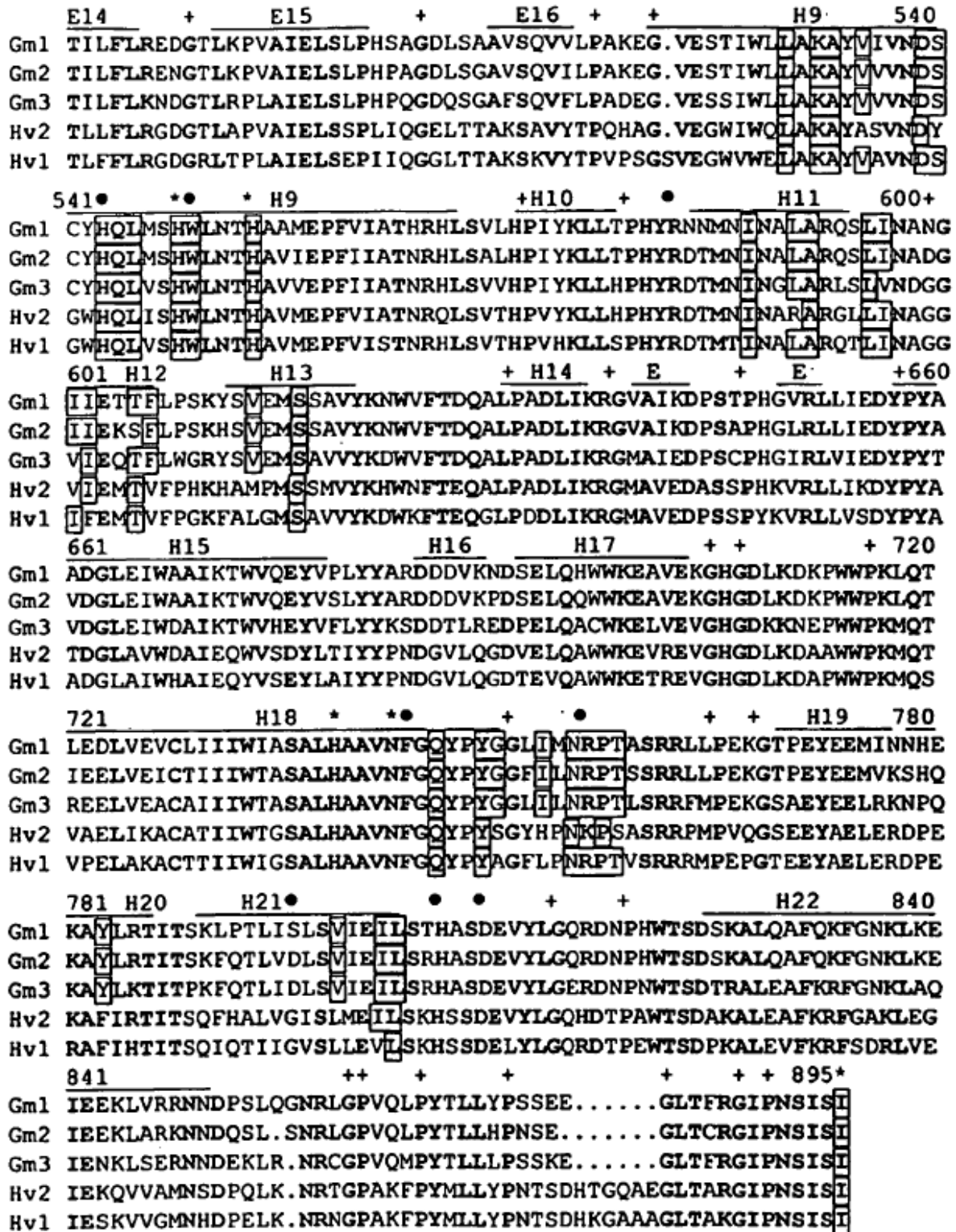




FIG. 22B



Gm1 SEQ ID NO:15  
 Gm2 SEQ ID NO:16  
 Gm3 SEQ ID NO:17  
 Hv2 SEQ ID NO:18  
 Hv1 SEQ ID NO:9

El sistema de numeración mostrado por encima del alineamiento de secuencia no se corresponde con el número de aminoácidos real de ninguna secuencia de lipooxigenasa del alineamiento