

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 362**

51 Int. Cl.:
A01H 5/10 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C08L 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01983291 .4**
96 Fecha de presentación: **09.11.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1331845**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

54 Título: **Cebada con una actividad reducida en SSII y productos que contienen almidón con un contenido reducido de amilopectina**

30 Prioridad:
09.11.2000 AU PR137100
09.11.2000 AU PR137000
09.11.2000 AU PR137200
09.11.2000 AU PR137300

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2012

73 Titular/es:
**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION
LIMESTONE AVENUE
CAMPBELL, ACT 2612, AU**

72 Inventor/es:
**MORELL, Matthew Kennedy;
TOPPING, David y
BATEY, Ian Leslie**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 380 362 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 con una actividad reducida de SSII y productos que contienen almidón con un contenido reducido de amilopeptina

5 Esta invención se refiere a una planta de cebada con una actividad reducida de la enzima SSII que produce un almidón con un contenido reducido de amilopeptina. La invención también se refiere al almidón, los granos y los productos alimentarios obtenidos a partir de dicha planta.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Un descubrimiento de las ciencias de la nutrición consiste en que el almidón resistente tiene importantes repercusiones sobre el estado de la salud intestinal, en particular la salud del intestino grueso. Los efectos
15 beneficiosos del almidón resistente provienen del hecho de que este proporciona un nutriente al intestino grueso, que supone una fuente de energía para la microflora intestinal que se fermenta para formar ácidos grasos de cadena corta, entre otros. Estos ácidos grasos de cadena corta proporcionan nutrientes para los colonocitos, potencian la captación de ciertos nutrientes a través del intestino grueso y propician la actividad fisiológica del colon. En general, si no se proporcionan almidones resistentes u otras fibras dietéticas, el colon se vuelve relativamente inactivo desde
20 el punto de vista metabólico.

En los últimos años, se han dirigido esfuerzos a obtener almidones resistentes a partir de varias fuentes para resolver el problema de la salud intestinal. Por consiguiente, se han desarrollado almidones con un contenido elevado de amilosa en ciertos granos tales como el maíz, para ser empleados en alimentos con el fin de favorecer la salud intestinal.

25 La estructura física del almidón puede tener una gran repercusión sobre las propiedades nutricionales y de manipulación del almidón para productos alimentarios. Ciertas características se pueden interpretar como una indicación de la estructura del almidón, incluidas la distribución de longitudes de cadena de la amilopeptina, el grado de cristalinidad y la presencia de formas cristalinas tales como la forma de tipo complejo V del almidón cristalino. Las
30 formas de estas características también se pueden interpretar como indicadores de las propiedades nutricionales y de manipulación de los alimentos que contienen estos almidones. De este modo, una longitud de cadena de la amilopeptina corta puede ser un indicador de una cristalinidad baja y una gelatinización baja, y también se cree que presenta una correlación con una retrogradación reducida de la amilopeptina. De forma adicional, se cree que una distribución de longitudes de cadena de amilopeptina más cortas refleja las propiedades organolépticas del alimento
35 en el que el almidón está incluido en cantidades significativas. Una cristalinidad reducida de un almidón también puede ser indicativa de una temperatura de gelatinización reducida del almidón y se cree, además, que está asociada con unas propiedades organolépticas mejoradas. La presencia de la cristalinidad del complejo V u otro lípido asociado con el almidón potenciará el nivel de almidón resistente y, de este modo, la fibra dietética.

40 En el pasado se han identificado líneas de cebada que contienen almidón con un contenido elevado de amilosa. Estas líneas solamente han proporcionado aumentos relativamente modestos del contenido de amilosa hasta un máximo de aproximadamente un 45% del almidón total, como en la variedad de cebada conocida como glaciador de elevado contenido de amilosa (AC38). Aunque los almidones con un contenido elevado de amilosa de este tipo son útiles, se prefiere un almidón con un contenido de amilosa todavía más elevado, y se cultivan otras especies de
45 grano determinadas para que tengan almidones con un contenido más elevado de amilosa, con niveles en el intervalo del 90 por ciento. Estos almidones son muy resistentes a la digestión y proporcionan un beneficio mayor para la salud.

La obtención de almidones con un contenido elevado de amilosa conlleva un problema, porque los almidones con un
50 contenido elevado de amilosa conocidos también presentan una temperatura de gelatinización elevada. La temperatura de gelatinización refleja la energía de conminución necesaria para procesar los alimentos de este tipo. De esta manera, normalmente se requieren temperaturas más elevadas para procesar grano o harina con el fin de producir alimentos a partir de dichos granos o almidones. De este modo, en general los productos que contienen almidones con un contenido elevado de amilosa son más caros. De forma similar, desde el punto de vista del
55 consumidor, pueden ser necesarios tiempos más prolongados y temperaturas más elevadas para preparar los productos fabricados o para obtener alimentos a partir de harina que contiene almidones con un contenido elevado de amilosa. De este modo, el hecho de incorporar almidones con un contenido elevado de amilosa en los alimentos supone una desventaja significativa.

60 Otro componente nutritivo de los granos y, en particular, de la cebada son los β -glucanos. Los β -glucanos están constituidos por unidades de glucosa enlazadas mediante uniones glicosídicas β (1-4) y/o β (1-3) que no se degradan por la acción de las enzimas digestivas humanas, lo que los hace adecuados como fuentes de fibra dietética. Los β -glucanos pueden ser parcialmente digeridos por bacterias endógenas del colon, cuyo proceso de fermentación genera ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, propionato y butirato), los cuales son
65 beneficiosos para las células de la mucosa que revisten el intestino y el colon (Sakata y Engelhard Comp. Biochem Physiol. 74a:459-462 (1983)).

La ingesta de β -glucano también tiene como efecto el aumento de la excreción de ácido biliar, lo que provoca una reducción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el colesterol totales en suero, con una reducción del riesgo de enfermedades coronarias. De forma similar, los β -glucanos actúan atenuando las oscilaciones de la concentración de glucosa posprandial en sangre. Se cree que estos dos efectos se basan en el aumento de la viscosidad del contenido del estómago y los intestinos.

La composición de los alimentos que contienen almidones y la estrecha relación de estos almidones con otros nutrientes u otros componentes pueden tener repercusiones significativas sobre el valor nutricional de estos alimentos o sobre las características funcionales de estos componentes en la preparación o la estructura de los alimentos.

Aunque los almidones o β -glucanos modificados, por ejemplo, se pueden emplear en alimentos que proporcionan una funcionalidad que no se puede conseguir normalmente con fuentes no modificadas, el procesamiento de este tipo tiene tendencia a alterar otros componentes de valor o a asociarse con la percepción de que es indeseable debido a los procesos implicados en la modificación. Por consiguiente, es preferible proporcionar fuentes de constituyentes que se puedan emplear en los alimentos en su forma no modificada.

La variedad de cebada MK6827 se puede obtener de la colección de germoplasma de cebada (centro de investigación nacional de germoplasma de granos pequeños USDA-ARS, Aberdeen, Idaho 831290 EE. UU.). El grano de MK6827 está encogido y presenta una cáscara muy coloreada y una forma alargada; según los inventores, es muy difícil procesar este grano, entre otras cosas, porque es muy resistente a la molienda. Las propiedades del grano MK6827 no han sido caracterizadas anteriormente, no se ha determinado la naturaleza de la mutación ni tampoco se considera adecuado para producir alimentos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención se basa en el aislamiento y la caracterización de plantas de cebada con SSII mutante, cuyo grano se ha descubierto que contiene almidón con un contenido reducido de amilopectina y, por consiguiente, niveles relativos elevados de amilosa y, por consiguiente, contiene niveles elevados de fibra dietética.

El grano del mutante y el grano de los cruces entre ciertos códigos genéticos contienen además un nivel elevado de β -glucano. Los inventores creen que la combinación de un nivel elevado de β -glucano y almidón resistente que contribuye a un contenido elevado de fibra dietética es única de la presente invención.

De forma adicional, al menos para algunos códigos genéticos, se ha descubierto que el grano de dichos mutantes contiene almidón con niveles relativos elevados de amilosa y presenta además temperaturas de gelatinización bajas. Las características de hinchamiento reducido del almidón de este tipo durante y tras la gelatinización también presentan ventajas en ciertas aplicaciones dietéticas y de procesamiento de alimentos.

Además, se ha descubierto que el grano de dichos mutantes contiene almidón con niveles relativos elevados de amilosa; los niveles de amilosa determinados son superiores a un 50% del contenido de almidón, que representa un nivel que no se había detectado nunca anteriormente en el almidón no modificado procedente de la cebada.

El almidón de los mutantes y las líneas retrocruzadas derivadas de los mutantes (hasta el punto que los retrocruces se han evaluado) muestran un almidón resistente, con una estructura alterada que se manifiesta mediante unas características físicas específicas, que incluyen una o más del grupo que comprende la presencia de un contenido relativo elevado de amilosa, una inaccesibilidad física por tener un contenido elevado de β -glucano, una morfología alterada del gránulo y la presencia de lípidos asociados al almidón; y manifestándose la estructura alterada mediante una característica seleccionada entre una o más del grupo que comprende una cristalinidad baja, una distribución de longitudes de cadena de amilopectina reducida y una presencia de lípidos asociados al almidón apreciables.

De forma adicional, hasta ahora el grano derivado de las plantas mutantes de cebada se puede emplear fácilmente en procedimientos de procesamiento de alimentos.

En un aspecto, la invención se refiere a un grano de una planta de cebada que comprende un gen SSII mutado, de manera que la actividad SSII codificada por dicho gen SSII mutado está suprimida y el contenido total de almidón de dicho grano tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p), y que a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%. En otro aspecto, la invención se refiere a una planta capaz de producir un grano de acuerdo con la invención. En un aspecto adicional, la invención se refiere al almidón de una planta de cebada, donde dicho almidón tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p) y donde a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón que tienen una longitud

comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 80 residuos es inferior a un 10%.

La invención también se refiere al uso de un constructo de ADN para reducir la expresión del gen SSII en una planta de cebada, de manera que el almidón del grano obtenido de dicha planta tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p) y que a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%; donde dicho constructo de ADN comprende una secuencia que codifica a) una molécula de ARN antisentido capaz de interferir en la transcripción o el procesamiento de la enzima SSII, b) una copia adicional en la misma orientación que el gen que codifica la enzima SSII, d) una molécula de ARN bicatenaria o e) un constructo de horquilla diseñado para producir una molécula de ARN bicatenaria capaz de suprimir la actividad SSII endógena.

La invención también se refiere al uso de a) una molécula de ARN antisentido capaz de interferir en la transcripción o el procesamiento de la enzima SSII, b) una ribozima, c) una copia adicional en la misma orientación que el gen que codifica la enzima SSII, d) una molécula de ARN bicatenaria o e) un constructo de horquilla diseñado para producir una molécula de ARN bicatenaria capaz de suprimir la actividad SSII endógena para reducir la expresión del gen SSII en una planta de cebada, de manera que el almidón del grano obtenido de dicha planta tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p) y que a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%.

En un aspecto, se puede afirmar que esta descripción se refiere al almidón obtenido del grano de una planta de cebada, teniendo la planta de cebada un nivel reducido de actividad SSII y teniendo dichos gránulos de almidón un contenido elevado de amilosa debido a un contenido reducido de amilopectina.

En otro aspecto, se puede afirmar en términos generales que la descripción se refiere a un grano útil para la producción de alimentos obtenido de una planta de cebada, teniendo la planta de cebada un nivel reducido de actividad SSII y teniendo el almidón de dicho grano un contenido elevado de amilosa debido a un contenido reducido de amilopectina.

En un aspecto adicional más, se podría afirmar en términos generales que la descripción se refiere a una planta de cebada con un nivel reducido de actividad SSII, siendo dicha planta de cebada capaz de albergar un grano, teniendo el almidón de dicho grano un contenido elevado de amilosa debido a un contenido reducido de amilopectina y siendo dicho grano adecuado para la producción de alimentos.

Como alternativa, se podría afirmar que la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína SSU de cebada, siendo dicho ácido nucleico capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con SEQ ID NO 1, o a una célula que contiene un vector recombinante replicable que contiene dicha molécula de ácido nucleico. En una forma adicional más, la invención podría referirse a una molécula de ácido nucleico aislada capaz de hibridarse específicamente con SEQ ID NO 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para una mejor comprensión, la invención se describirá a continuación haciendo referencia a una serie de ejemplos.

Figura 1 Análisis de la distribución de tamaños moleculares del almidón, determinado mediante la separación por HPLC del almidón en DMSO al 90%. (a) Himalaya, (b) AC38, (c) 342, (d) 292.

Figura 2 Fotografías que muestran la morfología del grano de las líneas mutantes y parentales. (a) Himalaya, (b) AC38, (c) 292, (d) Waxiro, (e) 342, (f) Tantangara, (g) MK6827, (h) Sloop. Las dimensiones de longitud (L), ancho (A) y grosor (G) del grano se ilustran en el panel (a).

Figura 3 Análisis de la distribución de longitudes de cadena de varios almidones mutantes y naturales empleando FACE. (a) Distribución normalizada de longitudes de cadena, (b) comparación de las distribuciones de longitudes de cadena mediante un gráfico de la diferencia. Las muestras eran 342 (■), 292 (●), Tantangara (s), AC38 (⊕), MK6827 (◆) e Himalaya (+).

- Figura 4 Análisis RVA de las muestras de almidón de la cebada. Las muestras eran Himalaya (\oplus), Namoi (Δ), AC38 (\circ), 342 (∇), 292 (\blacktriangle) y MK6827 (\blacksquare). El perfil de temperatura empleado durante el perfil se indica mediante la línea continua.
- 5
- Figura 5 Datos de difracción de rayos X para las líneas mutantes y naturales.
- Figura 6 Micrografías electrónicas de barrido de almidones de cebada aislados. (a) Himalaya, (b) Waxiro, (c) AC38, (d) 292, (e) 342, (f) MK6827.
- 10
- Figura 7 Loci del cromosoma 7H de la cebada que muestra la proximidad de los loci nud1 y sex6. Diagrama obtenido a partir de GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov>), Genes morfológicos de la cebada, mapa de 7H, autor: Franckowiak JD).
- 15
- Figura 8 Correlaciones entre las dimensiones de las semillas y la distribución de longitudes de cadena del almidón para las líneas haploides dobles de 292 x Tantangara. Las líneas indicadas con (+) representan el patrón de PCR para Himalaya y las líneas indicadas con (\circ) representan el resultado de PCR para 292. Panel (A): representación del cociente de la longitud entre el grosor de las semillas frente al porcentaje de cadenas de almidón con DP entre 6 y 11; Panel (B): representación del peso de las semillas frente al porcentaje de cadenas de almidón con DP entre 6 y 11.
- 20
- Figura 9 Secuencia del ADNc de SSII de cebada (SEQ ID NO 1) de la variedad cultivada Himalaya.
- Figura 10 Estructura de los genes SSII de (1) *T. tauschii* (trigo diploide), (2) variedad cultivada de cebada Morex. Las líneas gruesas representan exones y las líneas delgadas, intrones. La línea recta debajo de cada ejemplo indica la región de las secuencias genéticas. La línea de puntos representa una región del gen SSII de cebada, desde el intrón 7, cuya secuencia no se ha determinado, pero se ha establecido mediante análisis de PCR que tiene una longitud de aproximadamente 3 kb.
- 25
- Figura 11 Comparaciones de los ADNc de SSII pronosticados para MK6827 (SEQ ID NO 2), Morex (SEQ ID NO 3) y 292 (SEQ ID NO 4), y una secuencia de ADNc de Himalaya (SEQ ID NO 1). Las secuencias pronosticadas se generaron identificando las regiones de las secuencias genómicas presentes en el ADNc de SSII de Himalaya. Se indican el codón de inicio ATG y el codón de parada natural, así como los codones de parada adicionales presentes en MK6827 ($\#$) y 292 ($\&$), respectivamente.
- 30
- Figura 12 Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los genes que codifican SSII de las líneas de cebada 292 (SEQ ID NO 7), Morex (SEQ ID NO 5), MK6827 (SEQ ID NO 8), Himalaya (SEQ ID NO 8). Los codones de parada adicionales en 292 y MK6827 se indican con los símbolos ($\&$) y ($\#$), respectivamente.
- 35
- Figura 13 Posición de las mutaciones en MK6827 (SEQ ID NO 2) y 292 (SEQ ID NO 4) en el gen SSII de la cebada.
- 40
- Figura 14 Desarrollo y uso de un ensayo de PCR para la mutación 292. (a) Representación esquemática de una región de SSII de Himalaya amplificada por los cebadores ZLSS2P4 y ZLBSSIIP5, (b) representación de la región amplificada del gen SSII de 292 empleando ZLSS2P4 y ZLBSSIIP5, que muestra la ausencia de un sitio NlaIV, (c) electroforesis en gel de agarosa de productos digeridos con NlaIV de la cebada; Línea M: escalera de marcador de ADN; línea 1: MK6827; línea 2: Himalaya; línea 3: Tantangara; línea 4: 292; línea 5: 342.
- 45
- Figura 15 Representación esquemática de constructos de ADN diseñados para reducir la expresión de SSII tras la transformación estable de la cebada. (1) El gen SSII, de los nucleótidos 1 a 2972 (remítase a la Figura 9 para consultar la secuencia), se inserta entre el promotor y el terminador en la orientación sentido. (2) El gen SSII se inserta entre el promotor y el terminador en la orientación antisentido de los nucleótidos 2972 a 1 (remítase a la Figura 9 para consultar la secuencia). (3) Constructo dúplex en el que el intrón 3 del gen SSII de la cebada (entre los nucleótidos 1559 y 2851) de la secuencia genómica de SSII de Morex se inserta entre los exones 2 y 3 del ADNc de SSII de la cebada de Himalaya (nucleótidos 363 a 1157 de la Figura 9).
- 50
- Figura 16 Electroforesis SDS-PAGE de proteínas unidas a gránulos del almidón. Panel (A): gel para SDS-PAGE de acrilamida (Acril/Bis 37.5:1) al 8%, sometido al ensayo de Western blot y analizado con una sonda de anticuerpos contra SSII producidos contra la proteína SSII unida a gránulo purificada a partir del trigo. (B) acrilamida (Acril/Bis 30:0.135) al 12.5%, teñida con plata. Las migraciones de los estándares de pesos moleculares de masas definidas (las unidades son kd) se indican a cada lado de la figura.
- 55
- 60
- 65

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

- 5 Índice glucémico. Consiste en una comparación del efecto de un alimento de prueba, tal como pan blanco o glucosa, sobre las oscilaciones de la concentración de glucosa en sangre. El índice glucémico representa una medida del efecto probable del alimento en cuestión sobre la concentración de glucosa en suero posprandial y la demanda de insulina para conseguir la homeostasis de glucosa en sangre.
- 10 Almidón resistente. La suma del almidón y los productos de la digestión del almidón que no se absorben en el intestino delgado de humanos sanos pero que entran en el intestino grueso. De este modo, el almidón resistente excluye los productos digeridos y absorbidos en el intestino delgado.
- 15 Los almidones resistentes se pueden clasificar en cuatro grupos.
- Almidón físicamente inaccesible RS1. Los ejemplos de esta forma de almidón se generan cuando el almidón está atrapado en una proteína o una matriz similar o en una pared celular vegetal, o se pueden generar debido a la molienda parcial del grano o en legumbres tras su enfriamiento.
- 20 Gránulos resistentes RS2. Son generalmente almidones crudos tales como los que se generan a partir de la patata cruda o la banana verde, algunas legumbres y almidones con elevado contenido de almidón.
- Almidones retrogradados RS3. Se generan por tratamiento térmico/de humedad del almidón o alimentos con almidón, como sucede con los copos de maíz, el pan y las patatas cocinadas y enfriadas.
- 25 Químicamente modificados RS4. Se generan mediante modificaciones químicas tales como la sustitución o reticulación. Esta forma del almidón se suele emplear en alimentos procesados.
- 30 Fibra dietética. En esta memoria descriptiva, es la suma de los carbohidratos y los productos de la digestión de carbohidratos que no se absorben en el intestino delgado de humanos sanos, pero que entran en el intestino grueso. Esto incluye almidón resistente, β -glucano y otros polímeros carbohidratados solubles e insolubles. Se pretende que incluya la porción de carbohidratos que pueden ser fermentados, al menos parcialmente, en el intestino grueso por la microflora residente.
- 35 La gelatinización consiste en el colapso (alteración) del orden molecular dentro del gránulo de almidón con cambios concomitantes e irreversibles de las propiedades, tales como el hinchamiento de los granos, la fusión de los cristales, pérdida de birrefringencia, desarrollo de viscosidad y solubilización del almidón.
- 40 Esta invención se basa en el aislamiento y la caracterización de plantas de cebada con SSII mutante, cuyo grano se ha descubierto que contiene almidón con un contenido reducido de amilopectina y, por consiguiente, niveles relativos elevados de amilosa y, por consiguiente, contiene niveles elevados de fibra dietética.
- 45 Se ha descubierto que dichos mutantes tienen una serie de características bastante deseables y se ha demostrado que los cruces entre otros códigos genéticos diferentes mantienen al menos algunas de esas características.
- El grano del mutante y el grano de los cruces entre ciertos códigos genéticos contienen además un nivel elevado de β -glucano. Los inventores creen que la combinación de un nivel elevado de β -glucano y un contenido elevado de fibra dietética es única de la presente invención.
- 50 De forma adicional, al menos para algunos códigos genéticos, se ha descubierto que el grano de dichos mutantes contiene almidón con niveles relativos elevados de amilosa y presenta además temperaturas de gelatinización bajas. Las características de hinchamiento de la gelatinización del almidón de este tipo también presentan la ventaja de ser un hinchamiento reducido, lo que tiene ventajas en ciertas aplicaciones dietéticas y de procesamiento de alimentos.
- 55 Además, se ha descubierto que el grano de dichos mutantes contiene almidón con niveles relativos elevados de amilosa; los niveles de amilosa determinados son superiores a un 50% del contenido de almidón, que representa un nivel que no se había detectado nunca anteriormente en el almidón no modificado procedente de la cebada.
- 60 El almidón de los mutantes, y hasta el punto que los retrocruces se han evaluado, muestra un almidón resistente, con una estructura alterada que se manifiesta mediante unas características físicas específicas, que incluyen una o más del grupo que comprende la presencia de un contenido relativo elevado de amilosa, una inaccesibilidad física por tener un contenido elevado de β -glucano, una morfología alterada del gránulo y la presencia de lípidos asociados al almidón; y manifestándose la estructura alterada mediante una característica seleccionada entre una o más del grupo que comprende una cristalinidad baja, una distribución de longitudes de cadena de amilopectina reducida y una presencia de lípidos asociados al almidón apreciables.
- 65

De forma adicional, hasta ahora el grano derivado de las plantas mutantes de cebada se puede emplear fácilmente en procedimientos de procesamiento de alimentos.

5 El grano de dichos mutantes en una forma contiene preferentemente almidón con niveles relativos elevados de fibra dietética, más concretamente amilosa, así como un nivel elevado de β -glucano. Los inventores creen que la combinación de un nivel elevado de β -glucano y un nivel elevado de amilosa es única de la presente invención, y esta proporciona una fuente única de una combinación de β -glucano y almidón resistente que no requiere, al menos en las formas más generales de la invención, la mezcla del β -glucano y la fibra dietética soluble ni la modificación de las partes componentes.

10 Al mejor saber y entender de los inventores, la planta de cebada de la presente invención representa el primer caso de un grano de cebada con niveles relativos elevados de fibra dietética en forma de almidón resistente con un nivel elevado de amilosa, que también posee niveles elevados de β -glucano, los cuales se encuentran en el extremo superior de los niveles habituales de β -glucano o están por encima de este nivel. Los granos con un contenido de β -glucano todavía superior son del fenotipo ceroso y, por consiguiente, presentan niveles bajos de amilosa.

15 Es bien sabido que existe una gran variación de los niveles de β -glucano en la cebada, que oscila en el intervalo de aproximadamente un 4% a aproximadamente un 18% en peso de la cebada, pero más habitualmente de un 4% a aproximadamente un 8% (Izydorczyk *et al.*, (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 982-989; Zheng *et al.*, (2000) *Cereal Chemistry* 77, 140-144; Elfverson *et al.*, (1999) *Cereal Chemistry* 76, 434-438; Andersson *et al.*, (1999) *Journal of the Science of Foods and Agriculture* 79, 979-986; Oscarsson *et al.*, (1996) *J Cereal Science* 24, 161-170; Fastnaught *et al.*, (1996) *Crop Science* 36, 941-946). Se han desarrollado cepas de cebada mejoradas, por ejemplo, Prowashonupana, que contiene entre aproximadamente un 15% y aproximadamente un 18% en peso de β -glucano pero tiene un fenotipo ceroso. Esta se vende comercialmente con el nombre Sustagrain™, (ConAgra™ Specially Grain Products Company, Omaha, Neb., EE. UU.).

20 Los niveles de β -glucano que se contemplan en esta invención pueden depender del código genético en el que se reduce la actividad de la enzima que sintetiza la amilopectina. Sin embargo, se propone que la reducción de la actividad de la síntesis de amilopectina tendrá como efecto el aumento del nivel relativo de fibra dietética que, en parte, adopta la forma de amilosa, y al mismo tiempo el aumento del nivel de β -glucano. Una explicación para el aumento concomitante del β -glucano con niveles relativos elevados de amilosa es que dicho aumento podría ser el resultado de un efecto de concentración por el hecho de tener un endospermo reducido y se podría aumentar adicionalmente a través del desvío de carbono de la síntesis de almidón a la síntesis de β -glucano.

25 De este modo, el grano de la planta de cebada posee un contenido de β -glucano preferentemente superior a un 6% del peso total del grano sin cáscara o, más preferentemente, superior a un 7% y, de forma más preferida, superior a un 8%; sin embargo, se han determinado niveles de β -glucano en un mutante ceroso de incluso un 15%-18% y la presente invención puede contemplar niveles tan elevados como estos o incluso más elevados.

30 En una segunda forma preferida, el grano de la planta de cebada presenta una temperatura de gelatinización reducida (determinada por calorimetría diferencial de barrido), además del contenido relativamente elevado de amilosa. A partir de los datos mostrados para la cebada a modo de ejemplo, se observa que esta temperatura de gelatinización reducida no solo es reducida cuando se compara con el almidón producido por cebada con un contenido en cierta manera elevado de amilosa, sino también cuando se compara con el almidón producido a partir de cebada con almidón que posee niveles normales de amilosa. De este modo, aunque la invención contempla temperaturas de gelatinización reducidas con relación a un almidón correspondiente con un contenido elevado de amilosa, también puede contemplar una temperatura de gelatinización reducida con relación a la de un almidón con niveles normales de amilosa.

35 De forma adicional, en los códigos genéticos evaluados hasta la fecha, el almidón también se caracteriza por un hinchamiento en agua caliente en exceso menor que el hinchamiento de otros almidones evaluados.

40 El almidón de la invención posee niveles de amilosa superiores a un 50% del contenido de almidón, que representa un nivel que no se había detectado nunca anteriormente en el almidón no modificado procedente de la cebada.

45 El almidón de la planta de cebada de la presente posee un contenido relativo elevado de amilosa y mucho más elevado de lo que cabría esperar para una mutación en el gen SSII u otro gen de la almidón-sintasa. De este modo, en mutantes de trigo en SSII se obtienen niveles relativos de amilosa de aproximadamente un 35% del almidón. Se puede considerar que el contenido de amilosa del almidón es elevado cuando el contenido es significativamente superior a un 25%, aproximadamente, presente en el grano de cebada normal, y por consiguiente puede ser superior a aproximadamente un 30% p/p del almidón total. Las plantas de cebada conocidas que se considera que poseen un contenido elevado de amilosa tienen un contenido de un 35-45%. Sin embargo, la presente invención proporciona cebada con un contenido de amilosa superior a un 50%, que representa un nivel que no se había detectado nunca anteriormente en el almidón no modificado procedente de la cebada.

El contenido relativo de amilosa puede ser superior a un 60% y, más preferentemente, aún superior a un 70%. Podría ser deseable tener niveles incluso superiores y, de este modo, se han podido alcanzar niveles incluso superiores en otras plantas cultivándolas con mutaciones únicas, dichos niveles se acercan a un 90%. Por consiguiente, la invención puede englobar niveles de amilosa superiores a un 80% o superiores a un 90%.

En una cuarta forma preferida, el almidón presenta además una estructura alterada que genera el almidón resistente. Este puede proceder del contenido elevado de amilosa. El almidón resistente también se puede generar porque el β -glucano está presente en niveles elevados y este posiblemente ejerce efectos protectores debido a la asociación del β -glucano con el gránulo de almidón; la cercanía de la asociación proporciona potencialmente un efecto protector para el almidón, lo que proporciona de este modo una resistencia que se puede caracterizar como una forma RS1, la cual resulta inaccesible en cierta manera para la digestión. De forma similar, también es probable que la presencia de una asociación almidón-lípido, determinada por la cristalinidad del complejo V, contribuya al nivel de resistencia del almidón. En este caso, es probable que la resistencia se genere por causa de la inaccesibilidad física del almidón debida a la presencia del lípido y, por consiguiente, este se puede considerar como un almidón RS1. Es bien sabido que el almidón retrogradado que adopta la configuración de complejo V es altamente resistente a la digestión y, por consiguiente, se prevé que la amilopeptina que forma parte de la estructura cristalina del complejo V también sea resistente a la digestión. El almidón de la planta de cebada a modo de ejemplo puede ser resistente a la digestión debido a la estructura del gránulo de almidón y, por consiguiente, puede tener un almidón RS2. Cada una de estas características puede estar presente de forma separada o como una combinación de dos o más de estas características.

El contenido elevado de fibra dietética puede adoptar la forma, al menos en parte, de almidón resistente, que se puede caracterizar por un contenido elevado de amilosa de los gránulos de almidón, según se ha mencionado previamente.

El contenido relativo de amilosa puede ser superior a un 60% y, más preferentemente, superior a un 70%. Podría ser deseable tener niveles incluso superiores y, de este modo, se han podido alcanzar niveles incluso superiores en otras plantas cultivándolas con mutaciones únicas, dichos niveles se acercan a un 90%. Por consiguiente, la invención puede englobar niveles de amilosa superiores a un 80% o superiores a un 90%.

Podría ser deseable que la planta de cebada exprese adicionalmente un nivel alterado de la actividad de una o más enzimas diferentes implicadas en la síntesis de la amilosa o de otras enzimas, para elevar más el nivel relativo de amilosa. De este modo, la planta de cebada puede poseer otra mutación que reduzca o altere adicionalmente la biosíntesis de amilopeptina, o una mutación o código genético que aumente la biosíntesis de amilosa. Por ejemplo, la planta de cebada puede mostrar un genotipo extensor de amilosa, tal como una planta de cebada que contiene la mutación amo1. Un ejemplo de una planta de este tipo es la variedad conocida como AC38 (también conocida como glaciador de elevado contenido de amilosa).

Se sobreentenderá que el nivel relativo de amilosa al que se hace referencia se expresa en función del contenido de almidón total y, de este modo, el resto de almidón puede ser predominantemente un tipo intermedio de almidón o puede ser predominantemente amilopeptina o una mezcla de ambos. En la cebada analizada, el nivel elevado de amilosa proviene de niveles reducidos de amilopeptina y, por consiguiente, el nivel relativo de amilosa no proviene de una mayor síntesis de amilosa.

Es bien sabido que el β -glucano provoca como efecto el enlentecimiento de la digestión en el intestino delgado simplemente debido a su presencia, cuando se encuentra junto con otro componente alimentario. De forma similar, es bien sabido que las moléculas resistentes yuxtapuestas cerca de los gránulos de almidón permiten enmascarar el almidón y contribuyen a su resistencia haciéndolo físicamente inaccesible. Por consiguiente, los niveles elevados de amilosa y otras formas de almidón que se pueden generar a partir de la asociación con un lípido, se verán aumentados adicionalmente por la presencia y la yuxtaposición física a los gránulos de almidón. Por lo tanto, se proporciona un aumento significativo de los efectos del almidón resistente, así como otros efectos beneficiosos, que proceden de los niveles elevados de β -glucano.

De forma adicional, es bien sabido que existe una respuesta a la dosis en cuanto a los efectos beneficiosos del almidón resistente y el β -glucano. Por consiguiente, se propone que el nivel aumentado de β -glucano, junto con los niveles aumentados de almidón resistente, proporcionarán mayores beneficios para la salud.

La combinación de los niveles de β -glucano y almidón resistente de al menos las formas preferidas de esta invención no se ha detectado anteriormente y definitivamente no se ha detectado en ninguna fuente que no contenga cierto grado de modificación o purificación y, por lo tanto, las formas de la presente invención proporcionan una fuente única y práctica para obtener estos beneficios.

Otro aspecto preferido del almidón es que, a pesar del contenido relativo elevado de amilosa, también presenta una temperatura de gelatinización baja, determinada por calorimetría diferencial de barrido. Esto contrasta con la conclusión general de que los almidones con un contenido elevado de amilosa tienen tendencia a presentar una

mayor temperatura de gelatinización, lo que introduce limitaciones en el modo en que se pueden emplear los almidones con un contenido elevado de amilosa. A partir de los datos mostrados para la cebada a modo de ejemplo, se observa que esta temperatura de gelatinización reducida no solo es reducida cuando se compara con el almidón producido por líneas con un contenido en cierta manera elevado de amilosa, sino también cuando se compara con el almidón producido a partir de cebada con almidón que posee niveles normales de amilosa. De este modo, aunque un aspecto preferido de la invención contempla temperaturas de gelatinización reducidas con relación a un almidón correspondiente con un contenido elevado de amilosa, también puede contemplar una temperatura de gelatinización reducida con relación a la de un almidón con niveles normales de amilosa. Para almidones con un contenido elevado de amilosa, ciertos aspectos del procesamiento requieren temperaturas más elevadas y, por consiguiente, requieren inherentemente una entrada de energía más elevada, lo que resulta caro y puede destruir la funcionalidad de otros componentes alimentarios. De forma similar, desde el punto de vista del consumidor final, los alimentos que contienen almidón con un contenido elevado de amilosa pueden resultar menos adecuados, debido a que requieren una temperatura más elevada y un tiempo más prolongado para su preparación. De este modo, por ejemplo, en esta forma preferida de la invención, ahora resulta posible obtener un producto, tal como los fideos, que requiere la adición de agua hirviendo o caliente a un recipiente, tal como una taza, y no requiere un calentamiento durante un periodo prolongado de tiempo, a la vez que se consigue el suministro de los almidones resistentes y otros constituyentes de valor nutricional al intestino grueso.

Un efecto destacado de las bajas temperaturas de gelatinización de estos almidones son las menores exigencias en cuanto a la temperatura y, por lo tanto, la menor exigencia en cuanto a la energía de trituración del alimento. Un corolario consiste también en que cuando la mezcla tiene lugar a temperatura ambiente y a continuación se calienta la mezcla, como suele ser el caso para ciertos procesamientos de alimentos, la baja temperatura de gelatinización también reduce el tiempo necesario para lograr la gelatinización. De forma adicional, para un intervalo de temperaturas por debajo de la temperatura necesaria para obtener una gelatinización completa del almidón normal, se producirá más gelatinización completa del almidón de la presente invención que del almidón normal.

Una medida de la capacidad de gelatinización se refleja en las propiedades térmicas determinadas por DSC (calorimetría diferencial de barrido). El inicio del primer pico (pico de gelatinización) de DSC puede estar a menos de 53 °C, más preferentemente a menos de 50°C y, de forma más preferida, a menos de aproximadamente 47°C. El inicio del primer pico se puede considerar como el inicio de la gelatinización. El almidón producido a partir del grano de la cebada puede presentar un primer pico a menos de aproximadamente 60 °C, más preferentemente a menos de 55 °C y, de forma más preferida, a menos de 52 °C. La ΔH (entalpía) del primer pico puede ser inferior a aproximadamente 3.5, más preferentemente inferior a aproximadamente 1.0 y, de forma más preferida, inferior a aproximadamente 0.5.

Otro descubrimiento acerca de la gelatinización de las harinas que contienen los almidones de esta invención es que muestran un hinchamiento reducido. El volumen de hinchamiento se determina habitualmente mezclando un almidón o harina con exceso de agua y calentando hasta temperaturas elevadas, normalmente superiores a 90 °C. A continuación la muestra se separa por centrifugación y el volumen de hinchamiento se expresa como la masa del material sedimentado dividida entre el peso seco de la muestra. Se ha determinado que los volúmenes de hinchamiento de las harinas de almidones de cebadas normales y cerosas son superiores a aproximadamente 5.5. Los volúmenes de hinchamiento de las harinas hechas a partir de un grano con un contenido elevado de amilosa (AC38) son de aproximadamente 3.75, mientras que para los granos de los mutantes y los cruces examinados son inferiores a 3.2, preferentemente inferiores a 3.0, pero generalmente superiores a aproximadamente 2.

Esta característica de gelatinización con poco hinchamiento es particularmente útil cuando se desea aumentar el contenido de almidón de un preparado alimentario, en particular un preparado alimentario hidratado. En el caso de la presente, podría ser deseable aumentar el contenido de fibra dietética de una solución coloidal u otro preparado líquido, donde de otra manera se produciría una restricción en cuanto al suministro del preparado alimentario.

Esta característica, junto con la temperatura de gelatinización reducida que exhibe el almidón de la presente, proporciona la posibilidad de aumentar significativamente los beneficios nutricionales de los alimentos cuando se requiere una preparación rápida, como en sopas instantáneas y fideos instantáneos.

Se postula que los efectos de la temperatura de gelatinización son el resultado de una estructura alterada de la amilopectina en el endospermo de su grano, y una medida de esta estructura es la distribución de las longitudes de cadena (grados de polimerización) de las moléculas de almidón tras la desramificación por acción de la isoamilasa. Un análisis de las longitudes de cadena del contenido de amilopectina del almidón de los mutantes SSII a modo de ejemplo mostró que, tras la desramificación, presentan una distribución de longitudes de cadena en el intervalo de 5 a 60, que es más corta que la distribución del almidón obtenido a partir de las líneas no mutantes tras la desramificación. El almidón con longitudes de cadena más cortas también presentará un aumento proporcional de la frecuencia de ramificación. De este modo, el almidón también puede presentar una distribución de longitudes de cadena más cortas de amilopectina. La proporción de cadenas de almidón con un grado de polimerización comprendido en el intervalo de 6 a 11 residuos es superior a un 30% y, más preferentemente, superior a un 35%. La proporción de cadenas de almidón con un grado de polimerización comprendido en el intervalo de 12-30 residuos es inferior a un 65%, más preferentemente inferior a un 60% y, de forma más preferida, inferior a aproximadamente un

55%. La proporción de cadenas de almidón con un grado de polimerización comprendido en el intervalo de 31-60 residuos es inferior a aproximadamente un 10%, más preferentemente inferior a aproximadamente un 8%, pero también preferentemente superior a aproximadamente un 5% y, más preferentemente, superior a aproximadamente un 6%. La combinación de las proporciones de los tres intervalos de longitudes de cadena se considera como un indicador de que un almidón es del tipo conforme con la presente invención.

Es probable que la reducción de la distribución de longitudes de cadena contribuya a la obtención de temperaturas de gelatinización más bajas. También se cree que la longitud de cadena reducida potencia las propiedades organolépticas del almidón, en particular la textura en boca, lo que quizás contribuye de este modo a la obtención de un producto placentero. De forma adicional, se ha postulado que la longitud de cadena reducida de la amilopectina puede reducir el nivel de degradación de la amilopectina, lo que repercute sobre la calidad del alimento, por ejemplo, se cree que es importante en el envejecimiento del pan.

De forma adicional, se ha demostrado que la estructura del almidón en el almidón a modo de ejemplo difiere en que el grado de cristalinidad es menor en comparación con el almidón normal aislado de la cebada. Cuando se combina con una distribución de longitudes de cadena de amilopectina reducida, la cristalinidad granular reducida podría indicar que la temperatura de gelatinización será menor. También se cree que la cristalinidad reducida de un almidón se asocia con unas propiedades organolépticas mejoradas y, cuando se combina con longitudes de cadena más cortas de la amilopectina, contribuye a una textura en boca más placentera. De este modo, el almidón puede exhibir de forma adicional una cristalinidad reducida, que procede de niveles reducidos de la actividad de una o más enzimas implicadas en la síntesis de amilopectina. La proporción de almidón que exhibe cristalinidad puede ser inferior a aproximadamente un 20% y, preferentemente, inferior a aproximadamente un 15%.

Una medición adicional de las propiedades del almidón de la presente se realiza midiendo la viscosidad. Empleando un viscosímetro rápido (RVA, por sus siglas en inglés) se ha descubierto que la viscosidad máxima del almidón de esta invención es significativamente diferente que la de los almidones normales y cerosos y los almidones con un contenido elevado de amilosa obtenidos a partir de la cebada. Las mediciones se realizaron en productos integrales, sin embargo, las propiedades del almidón serán predominantes en estas mediciones. Los almidones normales y cerosos presentan una viscosidad máxima de entre aproximadamente 900 y aproximadamente 500 unidades de RVA, el almidón con un contenido elevado de amilosa conocido presenta una viscosidad máxima superior a 200, mientras que las plantas de cebada de acuerdo con la presente invención presentan una viscosidad máxima inferior a 100, siendo para la mayoría inferior a aproximadamente 50 y en algunas plantas de incluso aproximadamente 10 unidades de RVA. Un experto en la materia sobrentenderá que las unidades empíricas citadas para los parámetros y los resultados citados pretenden indicar las propiedades relativas de estos almidones en instrumentos RVA o instrumentos similares tales como el amilógrafo.

Además de la cristalinidad reducida mencionada previamente, el almidón de la presente se puede caracterizar por la presencia de la forma de tipo complejo V del almidón. Los inventores creen que esta es la primera ocasión en que se ha observado esta forma del almidón en cantidades apreciables en los gránulos de almidón de un grano. Esta forma de almidón se asocia normalmente con el almidón retrogradado, en particular cuando ha estado en contacto con lípidos. En el caso de la presente invención, se postula que la estructura del almidón permite la formación de una relación íntima entre los lípidos de la planta y el almidón, que proporciona la estructura del complejo V. Se cree que esta forma del almidón puede presentar beneficios para la salud, porque manifiesta una digestibilidad reducida y, por consiguiente, puede contribuir a aumentar el almidón resistente.

También se pueden obtener otras formas de estructura de la interacción lípido-almidón e incluyen complejos de lípido-almidón no cristalinos. De este modo, también se puede considerar que la invención se refiere a una planta de cebada que exhibe cantidades apreciables de complejos de almidón-lípido en el contenido de almidón del endospermo de su grano, como resultado de los niveles reducidos de la actividad de una o más enzimas implicadas en la síntesis de amilopectina. Los almidones que contienen complejos de almidón-lípido, incluidos los que presentan una estructura de complejo V, también son normalmente resistentes a la digestión y, por consiguiente, contribuyen a aumentar los niveles de fibra dietética. Preferentemente, la proporción de almidón cristalino que exhibe una forma de cristalinidad característica de un complejo de almidón-lípido es superior a aproximadamente un 50% y, más preferentemente, superior a aproximadamente un 80%.

Además de la presencia de la forma de tipo complejo V del almidón, dicho almidón también puede exhibir cantidades no apreciables de las formas de tipo complejo A del almidón. La ausencia del complejo A se puede considerar como una indicación de la presencia de un almidón de esta invención.

También se ha descubierto que la temperatura de pastificación de los almidones y productos hechos a partir del grano de esta invención es considerablemente elevada. La temperatura de pastificación en almidones conocidos es inferior a 70 °C, tanto para almidones normales como para almidones con un contenido elevado de amilosa. Sin embargo, los almidones de la presente invención exhiben preferentemente temperaturas de pastificación superiores a aproximadamente 75 °C o, más preferentemente, superiores a aproximadamente 80 °C. Cabe destacar que estas son medidas empíricas y se deben interpretar como relativas a las mediciones de los otros almidones.

Se ha determinado que el almidón de la planta de cebada a modo de ejemplo contiene cantidades significativas de fibra dietética y almidón resistente; supuestamente este aumento es el resultado, al menos en parte, del nivel relativo elevado de amilosa; sin embargo, también puede existir una contribución de la fibra dietética debido a los complejos de almidón-lípido, incluido el complejo V, o debido a la asociación íntima de la amilosa o la amilopectina con el β -glucano. De forma similar, el nivel elevado de β -glucano también puede suponer una contribución significativa al aumento de la fibra dietética.

Los niveles relativos elevados de amilosa en el endospermo de la planta de cebada a modo de ejemplo proceden muy probablemente de la producción alterada de amilopectina, como resultado de una reducción del nivel de actividad de la enzima SSII.

Cabe esperar que las mutaciones en el gen que codifica esta enzima exhiban un mayor contenido de amilosa y/o una reducción del nivel de amilopectina. Cuando solo se reduce la síntesis de amilopectina, el almidón exhibe un mayor nivel relativo de amilosa.

Se puede lograr la supresión de la actividad de la enzima implicada en la síntesis de amilopectina mediante las mutaciones adecuadas en un gen respectivo o secuencias reguladoras del gen. Las mutaciones a modo de ejemplo de esta invención, por ser mutaciones SSII en la cebada, son mutantes de truncamiento y es bien sabido que estos tienen una repercusión significativa sobre la naturaleza del almidón. También pueden resultar eficaces otras reordenaciones cromosómicas, que pueden incluir delecciones, inversiones, duplicación o mutaciones puntuales.

Dichas mutaciones se pueden introducir en códigos genéticos deseables tanto mutagenizando las variedades de interés, como, de forma más fiable, cruzando el mutante con una planta que contiene el código genético deseado y realizando un número adecuado de retrocruces para eliminar el código inicial originalmente indeseado. Se puede conseguir el aislamiento de las mutaciones realizando una criba de las plantas mutagenizadas.

Se puede adoptar una estrategia de biología molecular como alternativa a los métodos convencionales. En esta memoria descriptiva se presenta la secuencia SSII. Los vectores que contienen las mutaciones deseadas y un marcador seleccionable se pueden introducir en plantas de cultivo de tejido o en sistemas vegetales adecuados tales como los protoplastos. Las plantas en las que se ha integrado una mutación en un cromosoma para reemplazar un alelo natural existente se pueden someter a una criba, por ejemplo, empleando una sonda de ácidos nucleicos adecuada específica para la mutación y observación fenotípica. En la materia existe constancia de métodos para transformar plantas monocotiledóneas, tales como la cebada, y para regenerar plantas a partir de protoplastos o embriones de plantas inmaduros; remítase, por ejemplo, a la solicitud de patente canadiense 2092588 de Nehra, la solicitud de patente australiana N.º 6178194 del Consejo Nacional de Investigación de Canadá, la patente australiana N.º 667939 de Japan Tobacco Inc., la solicitud de patente internacional WO 97/48814 de Monsanto Company, la patente de los EE. UU. 5589617 y otros métodos expuestos en la memoria descriptiva de la patente WO99/14314.

También se pueden adoptar otras estrategias conocidas para alterar la actividad de la enzima implicada en la síntesis de la amilopectina que no sean el uso de mutaciones. De este modo, por ejemplo, esto se podría realizar mediante la expresión de moléculas antisentido adecuadas que interfieran con la transcripción o el procesamiento del gen o los genes que codifican la enzima implicada en la síntesis de la amilopectina. Estas se pueden basar en la secuencia de ADN que se elucida en la presente para el gen SSII de la cebada. Estas secuencias antisentido pueden ser para los genes estructurales o para secuencias que ejercen un control sobre la expresión genética o el evento de corte y empalme. Se ha hecho referencia a estas secuencias previamente. Los métodos para elaborar secuencias antisentido son de uso común en la materia y se pueden encontrar ejemplos de estos en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. 5190131, la memoria descriptiva de la patente europea 0467349 AI, la memoria descriptiva de la patente europea 0223399 AI y la memoria descriptiva de la patente europea 0240208. Los métodos para introducir y mantener dichas secuencias en plantas también están publicados y son conocidos.

Una variación de la técnica antisentido consiste en emplear ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN con función enzimática que pueden escindir otras moléculas de ARN en sitios específicos definidos por una secuencia antisentido. La escisión del ARN bloquea la expresión del gen diana. Se hace referencia a la memoria descriptiva de la patente europea 0321201 y a la memoria descriptiva WO 97/45545.

Otra estrategia de biología molecular que también se puede emplear consiste en la cosupresión. No se conoce plenamente el mecanismo de cosupresión, pero se sabe que implica la introducción de una copia adicional de un gen en una planta en la orientación normal. En algunos casos la copia adicional del gen interfiere con la expresión del gen diana de la planta. Remítase a la memoria descriptiva de la patente WO 97/20936 y a la memoria descriptiva de la patente europea 0465572 para consultar métodos de implementación de las estrategias de cosupresión.

Un método adicional que se puede emplear utilizando las secuencias de ADN consiste en la supresión genética mediada por ARN bicatenario o dúplex. En este método, se emplea un ADN que dirige la síntesis de un producto de ARN bicatenario. La presencia de la molécula bicatenaria desencadena una respuesta del sistema de defensa de la planta que destruye tanto el ARN bicatenario como el ARN procedente del gen diana de la planta, lo que reduce o

elimina eficazmente la actividad del gen diana. Remítase a la memoria descriptiva de la patente australiana 99/292514-A y a la memoria descriptiva de la patente WO 99/53050 para consultar métodos de implementación de esta técnica.

- 5 Se sobreentenderá que la invención puede surgir como resultado de la reducción de los niveles de actividad de dos o más de los genes anteriores empleando una estrategia de biología molecular.

10 Un producto importante que se podría contemplar en particular como resultado del contenido elevado de amilosa y el contenido elevado de β -glucano es un producto bajo en calorías con un índice glucémico reducido. Un producto bajo en calorías se puede basar en la incorporación de harina producida a partir de grano molido. Sin embargo, puede ser deseable descascarillar en primer lugar el grano, para eliminar quizás un 10% o 20% en peso del grano, de manera que se elimine la capa de aleurona y, para una mayor reducción, se elimine también el germen. El efecto del paso de descascarillado es reducir el contenido de lípidos y, por consiguiente, reducir el valor calórico del alimento. Los alimentos de este tipo tendrán el efecto de saciar, potenciar la salud del intestino, reducir la concentración de lípidos y glucosa en suero posprandial, a la vez que proporcionan un producto alimentario bajo en calorías. El uso del producto descascarillado provocaría una reducción de los beneficios nutricionales proporcionados por la capa de aleurona y el germen. Es probable que la harina producida a partir del producto descascarillado tenga un aspecto mejorado, porque un producto producido de este modo tiene tendencia a ser más blanco.

20 Algunos aspectos de esta invención también se refieren a la combinación de la capa de aleurona y el germen con niveles elevados de fibra dietética. Concretamente, esto se refiere a los niveles relativos en cierta manera más elevados de aleurona o germen presentes en el grano a modo de ejemplo. En primer lugar, la cebada presenta una capa de aleurona significativamente más grande que otros granos comerciales, como resultado de tener una capa de aleurona de tres células. En segundo lugar, el grano de cebada a modo de ejemplo está además encogido, lo que significa que el endospermo está presente en cantidades reducidas; un corolario de esto es que la capa de aleurona y el germen están presentes en cantidades relativas elevadas. De este modo, la cebada presenta un nivel relativamente elevado de ciertos elementos beneficiosos o vitaminas combinados en un sistema de suministro de almidón resistente; dichos elementos incluyen cationes divalentes, tales como el Ca^{++} biodisponible, y vitaminas, tales como el folato, o antioxidantes, tales como los tocoferoles y tocotrienoles. De este modo, el calcio se ha establecido como suministro de material para el crecimiento y la deposición de los huesos y otros tejidos calcificados y para reducir el riesgo de sufrir osteoporosis en edades más avanzadas. Se ha descubierto que el ácido fólico ejerce un efecto protector contra los defectos del tubo neuronal cuando se consume periconceptualmente y reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, de manera que potencia los efectos de la combinación de almidón resistente y β -glucano. También se cree que el ácido fólico tiene como efecto la reducción del riesgo de sufrir ciertos tipos de cáncer. El tocoferol y los tocotrienoles presentan los beneficios de los antioxidantes y se cree que reducen el riesgo de sufrir cáncer y enfermedades cardiovasculares; también tienen como efecto la reducción de los efectos indeseables de la oxidación de los componentes de un alimento tales como los ácidos grasos, que pueden provocar ranciedad. Cuando estos componentes de esta forma preferida de grano de cebada o productos hechos a partir de este constituyen un envase adecuado con el grano único, una forma específica de producto molido puede ser aquella en la que la capa de aleurona se incluya en el producto molido. Se pueden llevar a cabo procesos de molienda particulares para aumentar la cantidad de la capa de aleurona en el producto molido. Se hace referencia a este método en Fenech *et al.*, (1999) J Nutr 129: 1114-1119. Por lo tanto, cualquier producto derivado de grano molido o procesado para incluir la capa de aleurona y el germen poseerá beneficios nutricionales adicionales y no será necesario añadir estos elementos de fuentes diferentes.

45 Se sobreentenderá que la planta de cebada de la presente invención es preferentemente una que contenga un grano útil para la producción de alimentos y, en particular, para la producción de alimentos comerciales. Una producción de este tipo puede incluir la producción de harina u otro producto que puede constituir un ingrediente de la producción de alimentos comerciales. Un contenido de almidón superior a aproximadamente un 12% o quizás superior a aproximadamente un 15% tendría un menor grado de utilidad. O de forma similar, esto puede incluir la capacidad de moler el grano; de este modo, aunque la cebada descascarillada se puede producir a partir de la mayoría de formas de grano, ciertas configuraciones de grano son particularmente resistentes a la molienda. Otra característica que puede tener una repercusión sobre el hecho de que una variedad produzca un grano que se pueda emplear comercialmente es la decoloración del producto producido. De este modo, cuando la cáscara u otra porción del grano exhiben una coloración significativa, por ejemplo, violeta, esta se mantendrá en el producto y limitará sus aplicaciones comerciales a aplicaciones muy concretas, tales como ser un componente de un pan que contenga granos troceados o enteros de color. Generalmente, también es más adecuado que las plantas de cebada sean gimnospermas, porque la presencia de cáscaras en los granos de cebada aumenta la dificultad del procesamiento del grano. Otro aspecto que puede aumentar el valor de una planta de cebada se basa en la extracción de almidón a partir del grano, siendo más útiles las mayores proporciones de extracción. La forma del grano también es otra característica que puede repercutir sobre la utilidad comercial de una planta, de esta manera la forma del grano puede repercutir sobre la facilidad con que se puede moler el grano, de esta manera, por ejemplo, el grano de cebada de la planta MK6827 presenta una morfología del grano excepcionalmente muy alargada, que hace que sea difícil de moler y procesar. Una medida adecuada de esta forma alargada y de la utilidad es el cociente de dos características morfológicas: la longitud del grano entre el grosor del grano (cociente L/G). Este cociente suele venir dictado por la naturaleza del almidón. Los inventores han descubierto que MK6827 presenta un cociente

L/G superior a 6. Las plantas de cebada sometidas a una criba de este modo, que contienen el gen SSII mutante, presentan un cociente L/G que oscila entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5, aunque se prevé que se puede extender hasta un intervalo más amplio y seguir siendo útil, quizás siendo inferior a aproximadamente 5.8 o al menos de 5.5.

5 El código genético deseado incluirá consideraciones de rendimiento comercial y otras características. Dichas características pueden incluir las siguientes: si se desea disponer de un tipo de cebada de invierno o de primavera, las características agronómicas, la resistencia a enfermedades y la resistencia al estrés abiótico. En Australia podría ser deseable cruzar cultivos de cebada tales como Sloop, Schooner, Chebec, Franklin, Arapiles, Tantangara, Galleon, Gairdner o Picola. Los ejemplos proporcionados son específicos para una región de producción en Australia y otras variedades serán adecuadas para otras regiones de cultivo.

15 Puede ser deseable un grano más lleno para lograr mayores rendimientos y se pueden conseguir ciertos beneficios de la invención, como la producción de almidón con niveles elevados de amilosa o, como alternativa, almidón con distribuciones alteradas de las longitudes de cadena. Sin embargo, otros aspectos de la invención se pueden conseguir mejor con un grano que esté menos lleno. De este modo, la proporción de la capa de aleurona o germen frente al almidón puede ser más elevada en un grano menos lleno, lo que proporciona una harina de cebada u otro producto con un contenido más elevado de los constituyentes beneficiosos de la capa de aleurona. De este modo, el producto de la capa de aleurona puede tener un contenido más elevado de ciertas vitaminas tales como el folato, o puede tener un contenido más elevado de ciertos minerales tales como el calcio, y esto combinado con niveles más elevados de almidón resistente y/o niveles más elevados de β -glucano puede proporcionar efectos sinérgicos, como la obtención de una mayor recaptación de minerales en el intestino grueso.

25 Para maximizar la cantidad de amilosa puede ser deseable que la planta de cebada también tenga otras características fenotípicas, además de una actividad reducida de una o más enzimas que sintetizan amilopectina. Por consiguiente, el código genético puede incluir adicionalmente un fenotipo con un contenido elevado de amilosa, por ejemplo, la mutación amo1 en AC38 (gen causal desconocido) y la mutación cerosa (que se encuentra, por ejemplo, en la variedad Waxiro). De forma adicional, puede resultar deseable realizar mutaciones dobles en otros mutantes de cebada disponibles con endospermos encogidos en los que se desconoce el gen causal.

30 En un aspecto adicional, se podría afirmar que la descripción se refiere al grano producido por una planta de cebada, según se menciona en esta memoria descriptiva.

35 También se sobreentenderá que la invención engloba un grano procesado, que incluye un grano molido, triturado, troceado, descascarillado o enrollado, o un producto obtenido a partir del grano procesado o entero de la planta de cebada de la invención, incluida la harina. A continuación, estos productos se pueden emplear en varios productos alimentarios, por ejemplo, en productos a base de harina, tales como el pan, pasteles, galletas y análogos, o en aditivos alimentarios, tales como espesantes, o para obtener bebidas de cebada malteada u otras bebidas de cebada, fideos y sopas instantáneas.

40 Como alternativa, la invención engloba almidón aislado a partir del grano de la planta de cebada de la invención. El almidón se puede aislar empleando técnicas conocidas.

45 Se sobreentenderá que un beneficio de la presente invención consiste en que proporciona uno o más productos con un beneficio nutricional particular y, además, esto se consigue sin necesidad de modificar el almidón u otros constituyentes del grano de cebada.

50 Sin embargo, puede resultar deseable realizar modificaciones en el almidón, el β -glucano u otro constituyente del grano, y la invención engloba dicho constituyente modificado.

El método de modificación puede ser cualquiera de los conocidos, e incluye la extracción del almidón o β -glucano u otro constituyente mediante métodos convencionales y la modificación de los almidones para formar la forma resistente deseada.

55 De este modo, el almidón o el β -glucano se pueden modificar tanto de forma única como múltiple mediante el uso de un tratamiento seleccionado del grupo que incluye, sin carácter limitante, calentamiento y/o humedad, hidrólisis por métodos físicos (por ejemplo, molino de bolas), hidrólisis por métodos enzimáticos (empleando, por ejemplo, α - o β -amilasa, pululanasa o análogos), hidrólisis por métodos químicos (húmeda o seca, empleando reactivos líquidos o gaseosos), oxidación, enlaces cruzados con reactivos difuncionales (por ejemplo, trimetafosfato de sodio, oxiclورو de fósforo) o carboximetilación.

65 El contenido de fibra dietética del grano de cebada a modo de ejemplo no procede solamente del mayor contenido relativo de amilosa endospermal. Un motivo principal es que el β -glucano está presente en niveles elevados y contribuye de forma significativa a aumentar el nivel de la fibra dietética. También es probable que existan efectos protectores debido a la asociación del β -glucano con el gránulo de almidón; la cercanía de la asociación proporciona potencialmente un efecto protector para el almidón, lo que proporciona de este modo una resistencia que se puede

caracterizar como una forma RS1, la cual resulta inaccesible en cierta manera para la digestión. De forma similar, también es probable que la presencia de una asociación almidón-lípido, determinada por la cristalinidad del complejo V, contribuya al nivel de resistencia del carbohidrato. En este caso, es probable que la resistencia se genere por causa de la inaccesibilidad física debida a la presencia del lípido y, por consiguiente, este se puede considerar como un almidón RS1. De este modo, es bien sabido que el almidón retrogradado que adopta la configuración de complejo V es altamente resistente a la digestión y, por consiguiente, se prevé que la amilopectina que forma parte del gránulo de almidón con la estructura cristalina del complejo V presente una mayor resistencia a la digestión. En tercer lugar, el almidón de la planta de cebada a modo de ejemplo puede ser resistente a la digestión debido a la estructura del gránulo de almidón y, por consiguiente, puede tener un almidón RS2.

Se sobreentenderá que, aunque se hayan proporcionado varias indicaciones como aspectos de la presente invención, la invención puede referirse a combinaciones de dos o más aspectos de la presente invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Antecedentes

La síntesis de almidón en el endospermo de plantas superiores se lleva a cabo por la acción de un conjunto de enzimas que catalizan cuatro pasos clave. En primer lugar, la ADP-glucosa-pirofosforilasa activa el monómero precursor del almidón a través de la síntesis de ADP-glucosa a partir de G-1-P y ATP. En segundo lugar, el dador de glucosilo activado, la ADP-glucosa, es transferido al extremo no reductor de una unión α -1,4 preexistente por almidón-sintasas. En tercer lugar, las enzimas ramificantes del almidón introducen puntos de ramificación a través de la escisión de una región de glucano unido por un enlace α -1,4, a continuación se transfiere la cadena escindida a una cadena aceptora, formando una nueva unión α -1,6. Finalmente, los estudios genéticos demuestran que las enzimas que desramifican el almidón son esenciales para la síntesis de cantidades normales de almidón en plantas superiores, sin embargo, el mecanismo a través del cual operan las enzimas desramificantes no está elucidado (Myers *et al.*, 2000).

Aunque es evidente que al menos estas cuatro actividades son necesarias para la síntesis normal del gránulo de almidón en plantas superiores, se han encontrado múltiples isoformas de cada una de las cuatro actividades en el endospermo de plantas superiores y se han propuesto funciones específicas para las isoformas individuales, basadas en análisis mutacionales (Wang *et al.*, 1998, Buleon *et al.*, 1998) o mediante la modificación de los niveles de expresión genética empleando estrategias transgénicas (Abel *et al.*, 1996, Jobling *et al.*, 1999, Scwall *et al.*, 2000). Sin embargo, todavía no se conocen las contribuciones exactas de cada isoforma de cada actividad en la biosíntesis del almidón, ni tampoco se sabe si estas contribuciones difieren notoriamente entre las especies. En el endospermo de los cereales, existen dos isoformas de la ADP-glucosa-pirofosforilasa: una forma en el amiloplasto y una forma en el citoplasmo (Denyer *et al.*, 1996, Thorbjornsen *et al.*, 1996). Cada forma se compone de dos tipos de subunidades. Los mutantes encogidos (*sh2*) y frágiles (*bt2*) del maíz representan lesiones en subunidades grandes y pequeñas, respectivamente (Girouz y Hannah, 1994). Existen cuatro clases de almidón-sintasa en el endospermo del cereal: una isoforma localizada exclusivamente en el gránulo de almidón, la almidón-sintasa unida al gránulo (GBSS, por sus siglas en inglés), dos formas que están repartidas entre el gránulo y la fracción soluble (SSI, Li *et al.*, 1999a, SSU, Li *et al.*, 1999b) y una cuarta forma que está localizada completamente en la fracción soluble, SSIII (Cao *et al.*, 2000, Li *et al.*, 1999b, Li *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la GBSS es esencial para la síntesis de amilosa (Shure *et al.*, 1983) y se ha demostrado que las mutaciones en SSII y SSIII modifican la estructura de la amilopectina (Gao *et al.*, 1998, Craig *et al.*, 1998). No se han descrito mutaciones que definan una función para la actividad de SSI.

En el endospermo del cereal se expresan tres formas de enzimas ramificantes: la enzima ramificante I (BEI, por sus siglas en inglés), la enzima ramificante IIa (BEIIa) y la enzima ramificante IIb (BEIIb) (Hedman y Boyer, 1982, Boyer y Preiss, 1978, Mizuno *et al.*, 1992, Sun *et al.*, 1997). Se ha demostrado que en el maíz y el arroz los fenotipos con un contenido elevado de amilosa proceden de lesiones en el gen BEIIb (Boyer y Preiss, 1981, Mizuno *et al.*, 1993). En estos mutantes, el contenido de amilosa es significativamente elevado y la frecuencia de ramificación de la amilopectina residual es reducida. Además, existe una fuente significativa de material que se define como "intermedio" entre la amilosa y la amilopectina (Boyer *et al.*, 1980, Takeda, *et al.*, 1993). Todavía no se han descrito las mutaciones que definen las funciones de BEIIa y BEI, aunque la reducción de BEI en la patata por sí sola provoca efectos mínimos sobre la estructura del almidón (Filpse *et al.*, 1996). Sin embargo, la combinación de la reducción de BEII y BEI en la patata proporciona un contenido de amilosa mucho más elevado que la reducción de BEII por sí sola (Schwall *et al.*, 2000). Existen dos tipos de enzimas desramificantes en plantas superiores y se definen en función de las especificidades de su sustrato: enzimas desramificantes de tipo isoamilasa y enzimas desramificantes de tipo pululanasa (Myers *et al.*, 2000). Las mutaciones en *sugary-1* del maíz y el arroz se asocian con una deficiencia de ambas enzimas desramificantes (James *et al.*, 1995, Kubo *et al.*, 1999), sin embargo, la mutación causal se localiza en la misma posición que el gen de la enzima desramificante de tipo isoamilasa. En el mutante *sta-7* de *Chlamydomonas* (Mouille *et al.*, 1996), el análogo de la mutación en *sugary-1* del maíz, se reduce la actividad de la isoamilasa solamente.

La variación conocida de la estructura del almidón en la cebada es limitada, en comparación con la variación disponible en el maíz. Las mutaciones mejor caracterizadas son cerosas y una mutación con un contenido elevado de amilosa identificada como AC38. También se han construido y analizado mutantes dobles (Schondelmaier *et al.*, 1992, Fujita *et al.*, 1999). Se han descrito una amplia gama de características de la variación de la estructura y las propiedades del almidón (Czuchajowska *et al.*, 1992; Schondelmaier *et al.*, 1992; Vasanthan y Bhatt, 1995; Morrison *et al.*, 1984; Gerring y DeHaas, 1974; Bankes *et al.*, 1971; Persson y Chriserson, 1997; Vasunthan y Bhatt, 1998; Czuchajowska *et al.*, 1998; Song y Jane, 2000; Andreev *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 2000) y las propiedades del grano (Swantson 1992, Ahokas 1979; Oscarsson *et al.*, 1997; Oscarsson *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 1999; Elfverson *et al.*, 1999; Bhatt 1999; Zheng *et al.*, 2000; Izydorczyk *et al.*, 2000; Andersson *et al.*, 2000) y se ha investigado la utilidad de los mutantes en ensayos de alimentación animal (Xue *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1978; Calvert *et al.*, 1976; Wilson *et al.*, 1975; Sundberg *et al.*, 1998; Bergh *et al.*, 1999), en alimentos humanos (Swanston *et al.*, 1995; Fastnaught *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1996; Pomeranz *et al.*, 1972) y en nutrición humana (Pomeranz 1992; Granfeldt *et al.*, 1994; Oscarsson *et al.*, 1996; Akerberg *et al.*, 1998).

En el presente ejemplo, se ha aislado una clase novedosa de mutante con un contenido elevado de amilosa de la cebada. Las líneas mutantes presentan contenidos de amilosa (65-70%) superiores a los conocidos para el mutante glaciador de elevado contenido de amilosa (AC38) (45-48%) (Walker *et al.*, 1968), que está bien caracterizado, y contienen almidón con una estructura de amilopectina que presenta un aumento de la frecuencia de ramificación del almidón; esto se contrapone con la frecuencia de ramificación reducida asociada con el mutante extensor de la amilosa en el maíz (Takeda, *et al.*, 1993).

Las características del grano y el almidón del mutante de la presente se han investigado con detalle y se ha determinado el mapa genético de la mutación causal. Las mutaciones aisladas son alélicas al mutante encogido previo conocido de la cebada, *sex6*, y se ha demostrado que la mutación causal está situada en el gen de la almidón-sintasa II. Los efectos de esta mutación han aportado más información sobre el proceso de la biosíntesis del almidón e ilustran cómo las mutaciones en genes específicos pueden tener repercusiones diferentes sobre la estructura del almidón de una especie a otra.

30 **Materiales y métodos**

Mutagénesis y criba

La variedad de cebada sin cáscara "Himalaya" se mutagenizó empleando azida sódica de acuerdo con Zwar y Chandler (1995). La selección de las variantes con una morfología alterada del grano se realizó de acuerdo con Green *et al.* (1997). Se identificaron y mantuvieron un total de 75 líneas con fenotipos de endospermo encogido de acuerdo con Green *et al.* (1997).

40 *Aislamiento del almidón*

El almidón se aisló a partir del grano de cebada empleando el método de Schulman *et al.* (1991).

45 *Métodos para determinar la amilosa*

Las determinaciones de la proporción de amilosa/amilopectina mediante un método de HPLC para separar los almidones desramificados y un método de unión de yodo se realizaron según describen Batey y Curtin (1996). El análisis de la proporción de amilosa/amilopectina mediante el análisis de los almidones no desramificados se realizó de acuerdo con Case *et al.* (1998).

50 *Medida del contenido de almidón*

El almidón se determinó empleando el kit de análisis de almidón total suministrado por Megazyme (Bray, Co Wicklow, República de Irlanda).

55 *Contenido proteico*

El nitrógeno se determinó mediante el método Kjeldahl y los contenidos proteicos se calcularon empleando un factor de 5.7.

60 *Niveles de β -glucano*

El β -glucano se determinó empleando el kit suministrado por Megazyme (Bray, Co Wicklow, República de Irlanda).

65 *Distribución de longitudes de cadena del almidón*

Se desramificaron los almidones y se analizaron las distribuciones de longitudes de cadena empleando electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE), utilizando una electroforesis capilar de acuerdo con Morell *et al.* (1998).

5 *DSC*

La gelatinización se determinó en un calorímetro diferencial de barrido Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk CT, EE. UU.). El almidón se mezcló con agua en una proporción de 2 partes de agua : 1 parte de almidón, y esta mezcla (40-50 mg, pesada con precisión) se introdujo en una cápsula de acero inoxidable y se selló. La muestra se escaneó a 10 °C por minuto desde 20 °C hasta 140 °C, empleando una cápsula de acero inoxidable vacía como referencia. Se determinaron las temperaturas de gelatinización y la entalpía empleando el software Pyris.

Análisis RVA

15 La viscosidad se evaluó en un viscosímetro rápido (RVA, Newport Scientific Pty Ltd, Warriewood, Sidney), empleando las condiciones descritas por Batey *et al.*, 1997 para harinas integrales. Para inhibir las α -amilasas, se añadió nitrato de plata en todos los ensayos con una concentración de 12 mM. Los parámetros evaluados fueron la viscosidad máxima (la viscosidad máxima de la pasta caliente), fuerza de sujeción, viscosidad final y temperatura de pastificación. Además, se calcularon la fragilidad (viscosidad máxima menos fuerza de sujeción) y el asentamiento (viscosidad final menos fuerza de sujeción).

Hinchamiento de la harina

25 Se determinó el volumen de hinchamiento de la harina de acuerdo con el método de Konik-Rose *et al.* (2001).

Datos de rayos X

Los datos de difracción de rayos X se registraron empleando técnicas estándar (Buleon *et al.*, 1998).

30 *Microscopía electrónica de barrido*

La microscopía electrónica de barrido se realizó en un instrumento Joel JSM 35C. Los almidones purificados se recubrieron catódicamente con oro y se escanearon a 15 kV a temperatura ambiente.

35 *Producción de haploides dobles*

Los haploides dobles fueron producidos a partir de plantas F1 derivadas de cruces entre 292 y *Hordeum vulgare* cv Tantangara, y entre 342 y *H. vulgare* cv Tantangara por el Dr. P. Davies, Waite Institute, Adelaida, Australia.

40 *Análisis de vínculos*

Los datos de los vínculos genéticos se calcularon empleando MapManager.

Construcción de una genoteca de ADNc de la cebada

45 Para la síntesis de ADNc, se emplearon 5 mg de poliA + ARNm de los días 10, 12 y 15 después de la antesis de los tejidos de endospermo de cebada de acuerdo con los protocolos (Life Technology). Para la síntesis de la primera hebra de ADNc, se empleó el cebador *NotI*-(dT)₁₈ (Farmacia Biotech). Los ADNc bicatenarios se ligaron con un adaptador *Sall*-*XhoI* (Stratagene) y se clonaron en los extremos *Sall*-*NotI* de ZipLox (Life Technology) tras la digestión de los ADNc con *NotI* seguida de fraccionamiento granulométrico (columna de centrifugación SizeSep 400 de Pharmacia Biotech). Los ADN ligados se empaquetaron con el extracto de empaquetamiento Gigapack III Gold (Stratagene). La valoración de la genoteca se realizó con una concentración de 2×10^6 pfu de la cepa Y1090(ZL) de *E. coli*.

55 *Clonación de regiones de ADNc específicas de la almidón-sintasa II de la cebada empleando PCR*

El clon de ADNc, wSSIIP1, se empleó para la criba de una genoteca de ADNc de cebada. El clon de ADNc, wSSIIP1, se generó por PCR empleando los cebadores sslIa (TGTTGAGGTTCC ATGGCACGTTCC SEQ.ID. NO 9) y sslIb (AGTCGTTCTGCCGATGATGTCG SEQ. ID. NO 10), y ampliando la región entre las posiciones de los nucleótidos 1435 y 1835 de wSSIIA (n.º de acceso de GenBank: AF 155217).

La amplificación se realizó empleando un secuenciador térmico FTS-1 (Corbett, Australia) con 1 ciclo de 95 °C durante 2 minutos; 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos y 1 ciclo de 25 °C durante 1 minuto. El fragmento wSSIIP1 se clonó en un vector pGEM-T (Promega).

65

Criba de la genoteca de ADNc de cebada

5 Se realizó una criba de una genoteca de ADNc, construida a partir de ARN del endospermo de la cebada cv Himalaya, con un fragmento de 347 pares de bases de ADNc, wSSIIP1, en las condiciones de hibridación descritas previamente (Rahman *et al.*, 1998). La hibridación se llevó a cabo en un 50% de formamida, 6 x SSPE, 0.5% de SDS, 5 x solución de Denhardt y 1.7 µg/mL de ADN de esperma de salmón a 42 °C durante 16 h, a continuación se lavó 3 x con 2 x SSC que contenía un 0.1% de SDS a 65 °C durante 1 h por lavado.

Criba de una biblioteca genómica de cebada

10 Se construyó una biblioteca genómica de cebada (cebada cv Morex) y se realizó una criba esencialmente como describieron Gubler *et al.* (2000) empleando el ADNc de SSII de la cebada como una sonda.

Determinación de la secuencia de los clones genómicos

15 El gen SSII de Morex se subclonó en vectores plasmídicos y se determinó su secuencia. Se determinó la secuencia de los genes de 292 y MK6827 mediante amplificación por PCR de las regiones solapadas del gen, empleando cebadores diseñados en función de la secuencia de Morex. Se determinó la secuencia de los fragmentos de PCR directamente o bien se subclonaron dichos fragmentos y se determinó su secuencia a partir de los plásmidos.

20 *Identificación de las regiones expresadas*

Las regiones de las secuencias genómicas de 292 y MK6827, cuya presencia en los ADNc se había predicho, se definieron por referencia a la secuencia de ADNc de Himalaya y la secuencia genómica de Morex.

25 *Análisis de PCR de la mutación de G a A en el gen SSII*

30 Los cebadores de PCR se diseñaron de manera que amplificaran la región que contenía la mutación de transición de G a A identificada en 292. Las secuencias de los cebadores son: ZLSS2P4 (CCTGGAACACTTCAGACTGTACG SEQ ID NO 11) y ZLBSSII5 (CTTCAGGGAGAAGTTGGTGTAGC SEQ ID NO 12). La amplificación se llevó a cabo empleando un secuenciador térmico FTS-1 (Corbett, Australia) con 1 ciclo de 95 °C durante 2 minutos; 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos y 1 ciclo de 25 °C durante 1 minuto.

Análisis de SDS-PAGE de las proteínas del endospermo de la cebada

35 El almidón se preparó a partir del endospermo maduro y en desarrollo de la cebada y el trigo, y las proteínas de superficie se eliminaron por acción de la proteinasa K, según está descrito (Rahman *et al.*, 1995). Las proteínas del gránulo de almidón se extrajeron a partir de 20 mg de almidón en peso seco, empleando 0.5 mL de una solución amortiguadora de extracción que contenía Tris 50 mM de pH 6.8, 10% de SDS y 10% de 2-mercaptoetanol. Tras la gelatinización al hervir durante 10 min, y la separación del almidón por centrifugación, se colocaron 15 microlitros del sobrenadante en cada carril.

40 *Producción del haploide doble*

45 Los haploides dobles fueron producidos a partir de plantas F1 derivadas de cruces entre 292 y *Hordeum vulgare* cv Tantangara, y entre 342 y *H. vulgare* cv Tantangara por el Dr. P. Davies, Waite Institute, Adelaida, Australia.

Estrategia de retrocruzamiento

50 Se realizaron cruces entre 292 y *Hordeum vulgare* cv Sloop para generar las semillas F1. Las plantas derivadas de las semillas F1 se autosembraron para generar una población de semillas F2. Las plantas cultivadas a partir de estas semillas F2 se analizaron empleando un ensayo de PCR y las plantas homocigotas para la mutación 292 se retrocruzaron con Sloop (BC1). Las plantas F1 obtenidas a partir de BC1 se volvieron a analizar por PCR y las plantas heterocigotas para la mutación 292 se seleccionaron y se retrocruzaron con Sloop (BC2). Las plantas F1 derivadas de BC2 se volvieron a analizar por PCR y se seleccionaron las plantas heterocigotas para la mutación 292. Estas plantas se autosembraron para generar una población BC2F2, o bien se volvieron a cruzar con Sloop (BC3). Las plantas F1 derivadas de BC3 se volvieron a analizar por PCR y se seleccionaron las plantas heterocigotas para la mutación 292. Estas plantas se autosembraron para generar una población BC3F2. Las plantas derivadas de esta semilla se analizaron por PCR y las plantas homocigotas para la mutación 292 se seleccionaron para la descendencia de semilla única y la mejora de la semilla.

Resultados

Selección de mutantes

5 La identificación de una serie de mutantes en la variedad de cebada sin cáscara o gimnosperma "Himalaya" inducida por un tratamiento con azida sódica ha sido descrita previamente por Zwar y Chandler (1995). Los inventores han identificado un grupo de 75 mutantes de grano encogido y han determinado el contenido de amilosa del almidón de la semilla encogida por HPLC (Figura 1). Se ha determinado que dos líneas, 292 y 342, presentaron contenidos de amilosa de un 71% y un 62.5%, respectivamente (Tabla 1). Los contenidos de amilosa de 292 y 342 fueron sustancialmente superiores a los de la línea AC38, caracterizada debidamente con anterioridad (47% de amilosa, remítase a la Tabla 1). Este estudio define la base genética del fenotipo novedoso con un contenido elevado de amilosa representado por 292 y 342, y describe los efectos de la mutación causal sobre la estructura y la funcionalidad del almidón y el grano.

15 Características del grano

Tamaño y morfología del grano:

20 Los efectos de la mutación sobre el peso y la morfología del grano son significativos (Tabla 2). El peso del grano se ha reducido desde 51 mg para la línea original Himalaya, hasta 32 mg para 292 y 35 mg para 342. Los mutantes conservan la longitud y el ancho del grano natural, pero en comparación están más aplanados (desde un grosor medio de 2.82 mm en Himalaya hasta 1.58 y 1.75 mm en 292 y 342, respectivamente) y presentan una región central básicamente vacía. La Figura 2 muestra fotografías del grano natural y mutante. Las dimensiones del grano se midieron de forma rutinaria; la longitud del grano (L), el ancho del grano en el punto más ancho (A) y el grosor (G), según se indica en la Figura 2. El cociente de la longitud (L) entre el grosor (G) del grano constituye un diagnóstico útil para la mutación; normalmente las semillas que contienen las mutaciones 292 o 342 presentan valores > 3.5 y las cebadas sin mutantes presentan valores < 3.5.

Composición del grano

30 El contenido de almidón de las líneas mutantes se ha reducido desde un 49.0% para Himalaya hasta un 17.7% y un 21.9% para 292 y 342, respectivamente (remítase a la Tabla 1). Al restar el peso de almidón del peso total del grano para obtener el contenido total del grano que no es almidón, se observó que la pérdida de contenido de almidón se correspondía con la pérdida de peso del grano, con pesos del contenido del grano que no es almidón de 26.0, 26.3 y 27.3 mg para Himalaya, 292 y 342, respectivamente.

40 El contenido proteico de 292 y 342 ha aumentado con relación a la línea original Himalaya (Tabla 1), sin embargo, este efecto es debido a la pérdida de almidón del grano y no es debido a ningún aumento de la síntesis de proteínas por cariopsis.

Los niveles de β -glucano de los mutantes 292 y 342 también han aumentado, y son más elevados de lo que cabría esperar a partir del efecto de la reducción del contenido de almidón (Tabla 1). En ambos casos, el contenido de β -glucano ha aumentado aproximadamente un 20% por cariopsis, lo que posiblemente representa una desviación de una pequeña proporción del carbono de entrada de la síntesis de almidón hacia la síntesis de β -glucano.

45 Composición y funcionalidad del almidón

Contenido de amilosa y amilopectina

50 El contenido de amilosa se determinó empleando dos técnicas, en primer lugar, la HPLC de exclusión por tamaños en un 90% (v/v) DMSO y, en segundo lugar, el valor del yodo azul. Los contenidos de amilosa determinados con cada método fueron similares y los datos de HPLC se muestran en la Tabla 1.

55 A partir de los datos del peso del grano y el contenido de amilosa para las líneas naturales y mutantes, se pueden realizar cálculos de la cantidad de amilosa depositada por grano. Este análisis muestra que se ha producido una reducción de la cantidad de amilosa por grano desde 6.2 mg/cariopsis en Himalaya hasta 4.0 mg/cariopsis en 292 y 4.8 mg/cariopsis en 342. Por el contrario, se ha producido una reducción pronunciada de la síntesis de amilopectina por cariopsis desde 18.7 mg en Himalaya hasta 1.6 mg en 292 y 2.9 mg en 342.

60 *Distribución de longitudes de cadena*

65 La distribución de longitudes de cadena del almidón tras la desramificación de la isoamilasa se realizó empleando electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE). En la Figura 3a se muestra la distribución de longitudes de cadena de los mutantes 292 y 342, y de Himalaya. La Figura 3b muestra un gráfico de la diferencia, en el que las distribuciones de longitudes de cadena normalizadas para los mutantes 292 y 342 se restan de la

distribución normalizada para Himalaya. Se han calculado los porcentajes de longitudes de cadena para DP 6-11, DP 12-30 y DP 31-65, y se presentan en la Tabla 3. Se puede observar un desplazamiento significativo en la distribución de longitudes de cadena de los mutantes 292 y 342, de manera que existe un porcentaje más elevado de cadenas en la región de DP6-11 en comparación con DP 12-30.

5

Calorimetría diferencial de barrido

Se investigó la temperatura de gelatinización de los mutantes empleando calorimetría diferencial de barrido y los datos se muestran en la Tabla 4. Tanto 292 como 342 proporcionan almidones con temperaturas de gelatinización significativamente menores que los almidones de Himalaya, con relación a las temperaturas de inicio, máximas y finales para el pico de gelatinización. La entalpía del pico de gelatinización para los mutantes 292 y 342 también se ha reducido dramáticamente en comparación con el almidón natural. La temperatura de inicio del pico amilosa/lípido también se ha reducido para los mutantes 292 y 342, sin embargo, la entalpía ha aumentado, lo cual es coherente con el mayor contenido de amilosa de los mutantes.

10

15

Viscosidad del almidón por RVA

Se realizó un análisis de RVA de las muestras integrales de cebada para examinar su viscosidad de pastificación. Algunos estudios previos han demostrado que el análisis de muestras integrales se correlaciona estrechamente con el análisis de los almidones aislados (Batey *et al.*, 1997). El análisis mostró que existen grandes diferencias entre los genotipos de cebada estudiados (remítase a la Tabla 5 y la Figura 4). Dos variedades de cebada que contenían almidón natural, Himalaya y Namoi, presentaron perfiles típicos de RVA, en los que se observó una viscosidad máxima destacada, seguida de una reducción de la viscosidad hasta la fuerza de sujeción, seguida de un aumento de la viscosidad a medida que la temperatura se reduce hasta obtener una viscosidad final. Como se observa generalmente para los almidones de cebada, las viscosidades finales para los almidones naturales fueron equivalentes a las viscosidades máximas, o inferiores a estas (Tabla 5). Para AC38, se obtuvo una viscosidad máxima destacada, sin embargo, debido al elevado contenido de amilosa de esta línea, la viscosidad final obtenida fue más elevada que la viscosidad máxima. Sin embargo, en 292, 342 y MK6827 se obtuvo un perfil muy diferente. No se obtuvo ningún aumento inicial destacado de la viscosidad correspondiente a la viscosidad máxima para otros almidones de cebada y, por consiguiente, no se pudo calcular el valor para la fragilidad. Los valores para la viscosidad máxima mostrados en la Tabla 5 para 292, 342 y MK6927 son las viscosidades registradas en el momento en que se alcanzó la viscosidad máxima para Himalaya. En 292, 342 y MK6927 la viscosidad aumentó a lo largo del análisis hasta alcanzar una viscosidad final comparable a la de las otras muestras integrales. Cuando se normalizaron según el contenido de almidón, los almidones de 292 y 342 presentaron unas viscosidades finales muy elevadas (remítase a la Tabla 5).

20

25

30

35

El volumen de hinchamiento representa un método para determinar las propiedades de la harina o el almidón, que examina el comportamiento del material al exponerlo a calentamiento y exceso de agua. El aumento de la recaptación de agua se determina pesando la muestra antes y después de mezclar la muestra con agua a unas temperaturas definidas y tras la obtención del material gelatinizado. El análisis mostró que las muestras de control, Himalaya y Tantangara, se hincharon hasta 6-8 veces su peso seco, por el contrario, 292 y 342 se hincharon hasta solo 2-3 veces su peso seco (Tabla 9).

40

Cristalinidad

La estructura de los almidones se investigó adicionalmente mediante cristalografía de rayos X (remítase a la Tabla 6 y la Figura 5). Himalaya mostró el patrón esperado para un almidón de cereal, con una cristalinidad de tipo "A" predominante, y tanto AC38 como Waxiro mostraron patrones de difracción de rayos X muy similares, aunque los niveles de cristalinidad fueron menores para AC38 y mayores para Waxiro. Para los mutantes 292 y 342, el patrón de difracción de rayos X cambió y se obtuvo una mezcla de patrón B y V. Además del cambio del patrón de difracción, la cantidad de cristalinidad se redujo considerablemente en los mutantes 292 y 342, hasta un 9% y un 12%, respectivamente. Este resultado es coherente con el bajo contenido de amilopectina de los almidones 292 y 342.

45

50

55

Morfología del gránulo

Se investigó la morfología del gránulo de almidón empleando microscopía electrónica de barrido (Figura 6). El tamaño y la forma de los gránulos de Himalaya (Figura 6, panel a), cebada cerosa (Waxiro, Figura 6, panel b) y AC38 (Figura 6, panel c) fueron coherentes con las observaciones publicadas previamente para gránulos de almidón en líneas de cebada normal. La morfología de los gránulos de almidón de tipo "A" en las líneas mutantes 292 (Figura 6, panel d), 342 (Figura 6, panel e) y MK6827 (Figura 6, panel f) está claramente alterada, presentando los gránulos una superficie rugosa en comparación con la forma lenticular lisa de las cebadas normales.

60

Fibra dietética

El análisis de la fibra dietética se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento AOAC y mostró que se produjo un aumento de la fibra dietética en 292 y 342, y que este aumento de la fibra dietética era debido a un aumento de la fibra dietética insoluble y no de la fibra dietética soluble (Tabla 1), lo que resulta coherente con el hecho de que los componentes de la fibra dietética sean el almidón resistente y el β -glucano. Cabe destacar que esta medición de la fibra dietética es una medición determinada químicamente, que es bastante diferente de la medición fisiológica que resulta relevante desde un punto de vista nutricional.

10 Base genética de la mutación*Proporción de segregación*

El hecho de que el cruce de la mutación con las variedades de cebada no presentara el fenotipo de endospermo encogido de 292 o 342 demuestra que la mutación es una mutación recesiva clara, que presenta una proporción de 3 normales : 1 encogida para las semillas F2 de las poblaciones cruzadas, y una proporción de 1 normal : 1 encogida en las semillas de una población haploide doble desarrollada siguiendo un cruce único (remítase a la Tabla 6). Se define "normal" como una semilla con un cociente L/G < 3.5 y se define una semilla encogida como una semilla con un cociente L/G > 3.5.

20 *Naturaleza alélica de los mutantes*

Se determinó que las mutaciones 292 y 342 eran alélicas a lo largo del análisis de progenie de los cruces de 292 y 342. Todas las semillas F1 derivadas de cruces recíprocos presentaron fenotipos de morfología del grano y peso del grano dentro del intervalo de tamaños y formas observado para las líneas originales 292 y 342, y fuera del intervalo de tamaños y formas de semilla determinado para la línea original Himalaya. Además, todas las semillas F2 derivadas de las plantas F1 de 292 x 342 presentaron el fenotipo de semilla encogida habitual de los mutantes 292 y 342.

El análisis de la morfología del grano y las características del almidón de una serie de mutantes de grano encogido adquiridos de la colección de germoplasma de cebada (centro de investigación nacional de germoplasma de granos pequeños USDA-ARS, Aberdeen, Idaho 83210 EE. UU.) sugirió que la línea MK6827 (BGS31, también denominada GSHO 2476), que contenía la mutación sex6, presentaba un conjunto de características del grano y del almidón muy similar al de las mutaciones 292 y 342. Se realizaron cruces entre 292 y MK6827, y todos los granos F1 presentaron el fenotipo habitual de 292 con relación al peso del grano y el fenotipo de semilla encogida. Todas las semillas F2 derivadas de las plantas F1 de 292 x MK6827 mostraron el fenotipo de endospermo encogido, con cocientes L/G > 4. Por el contrario, las semillas F2 de un cruce entre 292 y el cultivar de cebada comercial Sloop proporcionaron una distribución bimodal, que presentó una proporción de segregación de 3:1 entre las semillas encogidas y rellenas (Tabla 6). Todas las semillas F1 generadas a partir de los cruces de 292 y 5 líneas diferentes con fenotipos de endospermo encogido (BGS 380, endospermo encogido 4, 7HL (Jarvi *et al.*, 1975); BGS 381, endospermo encogido 5, 7HS (Jarvi *et al.*, 1975); BGS 382, sex1, 6HL (Eslick y Ries 1976); BGS 396, endospermo encogido 6, 3HL (Ramage y Eslick 1975); BGS 397, endospermo encogido 7, no mapeado, (Ramage y Eslick 1975) proporcionaron granos con una morfología de semilla rellena. Basándose en esto, se considera que las mutaciones 292, 342 y MK6827 son alélicas y, basándose en las localizaciones del mapa publicadas previamente para el locus de sex6, se podría predecir que las mutaciones 292 y 342 se situarán en el brazo corto del cromosoma 7H de la cebada, aproximadamente a 4 cM del centrómero (Netsvetaev, 1990, Netsvetaev y Krestinkov, 1993, Biyashev *et al.*, 1986, Netsvetaev, 1992).

50 *Análisis de vínculos*

Se generó una población haploide doble a partir de un cruce entre 292 y la variedad de cebada de malta comercial, Tantangara, que contenía 90 líneas de progenie (Tabla 8).

Las líneas se clasificaron con relación a la morfología de la semilla (semilla rellena frente a semilla encogida), distribución de longitudes de cadena por FACE (porcentaje de cadenas con DP de 6 a 11), cubierta de la semilla (con o sin cáscara) y el marcador de PCR (ver más adelante). Estos datos se muestran en la Tabla 8. El carácter de semilla encogida y la distribución por FACE de 292 se cosegregaron exactamente en esta población, como cabría esperar si el tamaño y la forma del grano alterado fueran consecuencia de la deposición alterada del almidón. La cosegregación de los caracteres se ilustra en la Figura 8. El panel A muestra la correlación entre la longitud de cadena del almidón (representada por el porcentaje de cadenas con un DP entre 6 y 11) y el cociente de la longitud entre el grosor. Los círculos en blanco indican líneas que tienen el marcador de PCR para la mutación 292 y las cruces indican líneas que contienen el marcador de PCR natural. Existe una definición clara entre los dos grupos de líneas. El panel B de la Figura 8 muestra la correlación entre la longitud de cadena del almidón y el peso de la semilla, y muestra que el peso de la semilla representa un peor diagnóstico para la mutación que el cociente de la longitud entre el grosor.

En la cebada, la presencia o ausencia de cáscara está controlada por el locus *nud* situado en el cromosoma 7H y, debido a que Tantangara es una cebada con cáscara y 292 es un tipo sin cáscara, se podría evaluar este carácter en la progenie haploide doble. El análisis del vínculo entre el carácter con/sin cáscara y los datos de FACE mostró que en este cruce la mutación 292 se localizó en el mapa genético a 16.3 cM del locus *nud*. Esta posición es coherente con los datos previos del mapa para la mutación alélica *sex6* (Netsvetaev, 1990, Netsvetaev y Krestinkov, 1993, Biyashev *et al.*, 1986, Netsvetaev, 1992).

Identificación del gen causal

Se ha demostrado que el gen *nud* está localizado en la cebada en el cromosoma 7H (Figura 8, Fedak *et al.*, 1972). En el trigo, existen tres almidón-sintasas (GBSS, SSI y SSII) y una enzima desramificante de tipo isoamilasa (S. Rahman, comunicación personal) localizadas en el brazo corto del cromosoma 7, el cromosoma homólogo (Yamamori y Endo, 1996, Li *et al.*, 1999a, Li *et al.*, 1999b, Li *et al.*, 2000). El vínculo cercano al locus *nud* sugirió que el gen candidato más probable era el gen SSII. Se ha clonado el gen SSII del trigo a nivel de ADNc (Li *et al.*, 1999b; N.º de acceso en GenBank AF155217) y a nivel genómico (Li *et al.*, comunicación personal), y se ha aislado y clonado un ADNc de cebada (Figura 9). La secuencia de la cebada y las secuencias genómicas de SSII del trigo muestran que los genes presentan unas estructuras de exones/intrones muy similares, sin embargo, las longitudes de las regiones de los intrones difieren entre las secuencias (Figura 10). La comparación de la secuencia genómica de Morex y la secuencia de un ADNc de Himalaya (Figura 9) llevó a la identificación de las secuencias de ADNc deducidas de Morex, 292 y MK2827.

Se detectó un mutante de transición de G a A en el gen SSII de 292 en una posición que se corresponde con 1862 de la alineación mostrada en la Figura 11. Esta mutación introduce un codón de parada en el marco abierto de lectura de SSII en 292 (Figura 12). El análisis de la secuencia de Tantangara e Himalaya mostró que ambos genes naturales eran idénticos en esta región y que tanto 292 como 342 contenían la misma mutación de transición de G a A. El codón de parada introducido truncaría el producto genético, de manera que la totalidad del dominio catalítico C-terminal del gen de la almidón-sintasa II no se traduciría y, por consiguiente, sería muy probable que la actividad de SSII se suprimiera totalmente debido a esta mutación.

También había una transición de G a A presente en MK6827, en la posición 242 de la alineación mostrada en la Figura 11 y la secuencia de ADNc de Himalaya en la Figura 9. Esta mutación también introduce un codón de parada en el marco abierto de lectura de SSII en 292 (Figura 12) y evitaría la traducción de más de un 90% del gen SSII, lo que suprimiría la actividad SSII codificada por este gen.

La mutación de transición de G a A en 292 alteró un sitio de restricción (NlaIV) en el gen SSII de la cebada. La posición del sitio NlaIV para diagnóstico se muestra en los paneles (a) y (b) de la Figura 14. La Figura 14c muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos digeridos de NlaIV de la cebada, la cual indica que el patrón de diagnóstico para la mutación 292 se encuentra en 292 y 342 pero no en MK6827, Himalaya ni Tantangara.

Se evaluó el marcador de PCR para la transición de G a A en las 90 líneas de la población haploide doble de 292 x Tantangara y se determinó que se cosegregaron exactamente con los fenotipos de semilla encogida y de la distribución de longitudes de cadena por FACE, lo que indica que la mutación 292 está completamente vinculada a este fenotipo de almidón y que es muy probable que esta mutación sea la mutación causal subyacente al fenotipo 292. La Figura 14d muestra el análisis de las líneas de la población haploide doble de 292 x Tantangara.

Datos bioquímicos que ponen de manifiesto la pérdida de actividad SSII

Se investigó la composición de las enzimas implicadas en la biosíntesis del almidón en las líneas de cebada normal y mutante, empleando una serie de técnicas de electroforesis en gel. El análisis de la fracción soluble del endospermo en desarrollo demostró que todas las líneas contenían BEI, BEIIa, BEIIb, SSI y SSIII, y que el contenido de estas isoformas de BE y SS, respectivamente, no se vio alterado significativamente. Sin embargo, el análisis del gránulo de almidón indicó que faltaban varias bandas. En primer lugar, el análisis de SDS-PAGE (Figura 16, panel A) mostró que una banda de 90 kD, que estaba presente en Himalaya, Tantangara y AC38, no estaba presente en 292, 342 ni MK6827. Mediante un ensayo de Western blot, se demostró que esta banda contenía SSII (Figura 16, panel B), BEIIa y BEIIb. El descubrimiento de que BEIIa y BEIIb están presentes en la fracción soluble pero no en el gránulo indica que se ha producido una alteración de la distribución de estas enzimas en los mutantes 292, 342 y MK6827, en lugar de una mutación que suprime la expresión. Por el contrario, no se detectó ningún indicio de expresión de SSII en la fracción soluble ni en la fracción del gránulo (Figura 16, paneles A y B), lo que resulta coherente con las pruebas genéticas que vinculan directamente la mutación SSII con los fenotipos observados en 292, 342 y MK6827.

Cultivo de las líneas que contienen la mutación 292

Se emplearon dos estrategias para transferir la mutación 292 a genotipos de cebada alternativos.

En el primer ejemplo, se generaron líneas haploides dobles a partir de un cruce entre 292 y Tantangara. En la Tabla 8 se muestran los datos referentes a la cubierta de la semilla, peso de la semilla, cociente L/G, distribución de longitudes de cadena y estado del marcador de ADN para SSII. En la Tabla 9 se muestra un análisis más exhaustivo de la composición de estas líneas, que incluye el análisis de RVA, el contenido de β -glucano y el volumen de hinchamiento de la harina. Los datos muestran que las líneas que contienen la mutación 292 presentan unos parámetros de RVA significativamente diferentes (según pone de manifiesto el cociente de viscosidad máxima/final), un mayor contenido de β -glucano y unos volúmenes alterados de hinchamiento de la harina.

En el segundo ejemplo, la mutación se transfirió realizando dos retrocruces de 292 a un cultivar con propiedades normales del almidón (cv Sloop). Se recogieron las semillas F2 de tres plantas F1 con 2 retrocruces para analizarlas. Las semillas F2 se clasificaron en semillas con un cociente L/G > 3.5 y semillas con un cociente L/G < 3.5. La distribución de las semillas entre estas clases resultó ser coherente con la que cabría esperar para un gen recesivo único. Los datos del volumen de hinchamiento de la harina para las categorías de semillas derivadas de cada planta se muestran en la Figura 10 y ponen de manifiesto que el rasgo de hinchamiento del almidón se transfirió claramente a lo largo del proceso de cultivo a las líneas con un promedio de un 75% de código Sloop.

Discusión

Se describe el aislamiento de mutantes novedosos, 292 y 342, en la cebada que presentan un fenotipo de endospermo encogido. El análisis de la composición del grano demuestra que el fenotipo encogido es debido a una reducción significativa del contenido de almidón, y el análisis de la composición del almidón muestra que esta reducción se pone de manifiesto en forma de un fenotipo con un contenido elevado de amilosa como consecuencia de una reducción de la síntesis de amilopectina.

Los mutantes 292 y 342 poseen una combinación única de propiedades del grano y del almidón, en cuanto a que ambos contienen niveles más elevados de β -glucano y almidón resistente. Los niveles de β -glucano de las líneas son aproximadamente un 15% más elevados de lo que cabría esperar debido al efecto del contenido reducido de almidón, lo que sugiere que el carbono que no se puede convertir en almidón se desvía hacia la síntesis de β -glucano. Las determinaciones de los niveles de fibra dietética demuestran que el grano de los mutantes posee niveles más elevados de fibra dietética, y que este aumento es debido a un aumento de la fibra dietética insoluble.

Esta combinación de propiedades indica que estos mutantes podrían tener una aplicación potencial muy interesante como componentes de la dieta humana. En primer lugar, los niveles elevados de β -glucano sugieren que las líneas podrían ser útiles para reducir el colesterol mediante la acción ya establecida del β -glucano en la reducción de los niveles de colesterol. En segundo lugar, la presencia de almidón resistente indica que las líneas podrían ser beneficiosas desde el punto de vista de la salud intestinal, debido a la capacidad ya establecida de los almidones resistentes para facilitar la fermentación colónica (Topping *et al.*, 1997, Topping 1999). En tercer lugar, la composición del grano indica que las líneas tendrán una densidad energética baja y que se podrían digerir lentamente, lo que indica que podrían contribuir a la formulación de alimentos con un índice glucémico reducido.

Las propiedades del almidón de las líneas a modo de ejemplo también son únicas por el hecho de que combinan un almidón con un contenido elevado de amilosa que también presenta una temperatura de gelatinización baja. Esto contrasta con las mutaciones con un contenido elevado de amilosa obtenidas a partir de mutaciones en la enzima ramificante IIb, en las que habitualmente la temperatura de gelatinización aumenta, tales como la mutación extensora de la amilosa en el maíz (Ng *et al.*, 1997, Katz *et al.*, 1993, Krueger *et al.*, 1987, Fuwa *et al.*, 1999). Aunque el contenido de amilosa de 292 es comparable al de las líneas extendidas de amilosa, la estructura del componente amilopectínico de los almidones difiere dramáticamente (Wang *et al.*, 1993). En 292 y 342, la distribución de longitudes de cadena de la amilopectina se desplaza hacia un grado de polimerización más bajo, mientras que en el extensor de amilosa, la distribución de longitudes de cadena se desplaza hacia un grado de polimerización más elevado. Esto sugiere que el contenido de amilopectina es el factor determinante principal de la temperatura de gelatinización, en lugar del contenido de amilosa, y que este efecto está controlado mediante la fuerza de la interacción entre las cadenas externas de la molécula de amilopectina. Jane *et al.*, 1999, observaron efectos similares para una serie de almidones.

Los datos de viscosidad del análisis de RVA indican que el almidón de las líneas de SSII mutante está marcado de forma diferente que para las cebadas normales y AC38. Las cebadas con SSII mutante no tienen esencialmente ningún pico de viscosidad, que habitualmente se suele observar cuando se aumenta la temperatura hasta 95 °C al principio de un perfil de temperatura de RVA. En su lugar, en estos mutantes, la viscosidad aumenta progresivamente hasta obtener una viscosidad final, en el caso de que la haya. Estos datos son coherentes con el bajo contenido de amilopectina de los gránulos, el bajo nivel de cristalinidad de la amilopectina en el gránulo y la baja temperatura de gelatinización y entalpía observadas en el calorímetro diferencial de barrido. Se alcanza una viscosidad final elevada una vez que la amilosa se ha liberado del gránulo mediante calentamiento en exceso de agua y agitación. Estas características de RVA son únicas para un almidón de cereal y proporcionan una fuente novedosa de almidón para aplicaciones alimentarias e industriales en las que se requiere una viscosidad de pastificación baja y a la vez una viscosidad final elevada.

Las observaciones hechas sobre la temperatura de gelatinización en el DSC se reflejan en los resultados de los estudios de difracción de rayos X. Los gránulos de 292 y 342 presentan niveles reducidos de cristalinidad y la forma cristalina varía del tipo A, habitual para los almidones de cereales, a una mezcla de tipos V y B. El tipo V es habitual para la amilosa y refleja que el componente de amilosa del almidón está complejado con ácidos grasos, mientras que la forma B deriva de la amilopectina y presuntamente refleja el contenido residual de amilopectina del almidón (Buleon *et al.*, 1998).

El análisis de la base genética de las mutaciones 292 y 342 demuestra que las mutaciones son mutaciones recesivas simples que generan las proporciones mendelianas típicas en experimentos de cruzamiento. Los estudios de cruzamiento demostraron que 292 y 342 son alélicos. Los análisis adicionales de la interacción entre 292 y otras mutaciones de endospermo encogido en experimentos de cruzamiento demostraron que las mutaciones 292/342 también eran alélicas con la mutación *sex6* en la línea MK6827. Esta mutación se ha localizado previamente en el mapa genético y se ha mostrado que está situada a menos de 3 cM del centrómero en el brazo corto del cromosoma 7H (Netsvetaev, 1990, Netsvetaev y Krestinkov, 1993, Biyashev *et al.*, 1986, Netsvetaev, 1992).

Se estableció una población haploide doble entre la cebada con cáscara Tantangara y el mutante sin cáscara 292 y la mutación de endospermo encogido se mapeó en el brazo corto del cromosoma 7HS, a menos de 16 cM del gen *nud*, una localización coherente con la localización en el mapa de la mutación *sex6*.

La localización del gen en la región adyacente al centrómero en el brazo corto del cromosoma 7HS demuestra que la mutación causal (*sex6*) está en un gen diferente al de la mutación que provoca el fenotipo de un contenido elevado de amilosa en AC38 (*amo1*), que se ha localizado en el mapa del cromosoma 1H (Schondelmeier *et al.* 1992). La localización en el mapa sugirió que un candidato para el gen alterado en la mutación *sex6*/292 era la almidón-sintasa II, que se sabe que está localizada en el trigo en la misma región del cromosoma (Yamamori y Endo 1996, Li *et al.*, 1999b). El análisis de la secuencia de los mutantes 292 y 342 mostró que había una mutación de transición de G a A en el gen, la cual provocaría el truncamiento del gen, de manera que la región C-terminal que contiene el sitio activo de la enzima no se traduciría, lo que presuntamente conduciría a la síntesis de una proteína totalmente inactiva. Además, la determinación de la secuencia del gen SSII de MK6827 mostró una mutación de transición de G a A en la posición 242, que también provocaría un truncamiento del gen. Este resultado confirma la naturaleza alélica de las mutaciones 292 y MK6827.

La identificación de las mutaciones en el gen SSII permitió el desarrollo de un diagnóstico del marcador de PCR para la mutación en 292. Se evaluó este marcador de PCR para las 91 progenies de la población de 292 x Tantangara y mostró un 100% de cosegregación con el fenotipo de endospermo encogido y el fenotipo de distribución de longitudes de cadena reducida para el almidón. El descubrimiento de mutaciones alélicas en los genes SSII de cebadas de diferentes códigos genéticos (292 y MK6827), que proporcionaron fenotipos similares, y el vínculo perfecto de la mutación con el fenotipo de grano encogido proporcionan un elevado grado de certeza de que las mutaciones presentes en los genes SSII de 292, 342 y MK6827 son las mutaciones causales que proporcionan el carácter de endospermo encogido.

El fenotipo observado en la presente para la mutación SSII en la cebada es similar a los fenotipos de las mutaciones SSII en otras plantas en algunos aspectos, sin embargo, las mutaciones SSII no permiten obtener contenidos de amilosa tan elevados como los que se encuentran en 292/342. Se conocen mutantes SSII en guisantes (*rug5*, Craig *et al.*, 1998) y *Chlamydomonas* (Fontaine *et al.*, 1993) y proporcionan amilopectinas con distribuciones de longitudes de cadena reducidas, como se ha observado en la presente. También existen datos que sugieren que la mutación Shrunken-2 en el maíz procede de la mutación del gen SSII, aunque esto todavía no se ha demostrado de forma concluyente (Ham *et al.*, 1998, Knight *et al.*, 1998). En el maíz, la mutación Shrunken-2 proporciona almidones con temperaturas de gelatinización reducidas (Campbell *et al.*, 1994). En el trigo, Yamamori ha desarrollado una línea con tres mutaciones anuladoras que carece de la proteína Sgp-1 (Yamamori 1998), que ha resultado ser el producto del gen SSII, según han demostrado Li *et al.* (Li *et al.*, 1999b). En el trigo, el contenido de amilosa aumenta hasta aproximadamente un 35% y se observan gránulos de almidón anormales, una cristalinidad alterada y una temperatura de gelatinización alterada (Yamamori 1998). Las diferencias entre las propiedades de los mutantes SSII de la cebada y los mutantes SSII de otras especies son bastante inesperadas.

Se ha demostrado que la mutación SSII se puede transferir de un código genético a otro mediante cultivo y que permite obtener una composición y morfología del grano diagnóstico típicas de los 292, 342 y MK6827 originales. En la Tabla 9, los datos de las líneas haploides dobles de 292 x Tantangara para el cociente L/G, contenido de β -glucano, distribución de longitudes de cadena, parámetros de RVA y del volumen de hinchamiento de la harina demuestran que las líneas que contienen la mutación 292 presentan fenotipos típicos del 292 original. En una demostración adicional, la segregación de semillas de la progenie autosembrada de un segundo retrocruce de 292 con Sloop presentó una proporción de segregación coherente con una segregación de 3:1 para el fenotipo normal (74 semillas con un cociente L/G < 3.5) y el fenotipo encogido (21 semillas con un cociente L/G > 3.5).

La disponibilidad de la secuencia del gen SSII y de sistemas de transformación de la cebada proporciona las herramientas necesarias para suprimir el gen SSII empleando tecnologías de supresión genética, para producir un

fenotipo comparable al de las mutaciones SSII. Una estrategia muy eficaz desarrollada recientemente consiste en producir un constructo de horquilla diseñado para producir un ARN bicatenario, que suprimiría la actividad SSII endógena. Aunque los mutantes de supresión completa análogos a las mutaciones descritas en la presente serían de interés, el uso de constructos de ADN con diferentes promotores y la recuperación de transgenes con diferentes niveles de expresión del constructo de horquilla permitirían evaluar el impacto de la valoración de la expresión del gen desde niveles normales hasta niveles de supresión completa.

Se ha demostrado que se pueden transferir las mutaciones de 292 a códigos genéticos alternativos de cebada, a la vez que se mantienen las características esenciales de la mutación 292 original. En las Tablas 9 y 10 se muestran los datos fenotípicos para la progenie haploide doble de 292 x Tantangara, y las semillas de un segundo retrocruce con Sloop, e indican que los fenotipos se transfieren a través del proceso de cultivo.

Tabla 1

Composición del grano de cebada								
	Contenido de almidón (%) ^a	Contenido de amilosa por HPLC (%) ^b	Contenido de amilosa por unión a yodo (%)	Contenido proteico (%) ^a	β-glucano (%) ^a	Fibra dietética total ^a (%)	Fibra dietética insoluble ^a (%)	Fibra dietética soluble ^a (%)
Glaciar	n.d.	31.0	n.d.	11.5	4.3	21.6	16.6	5
AC38	47	47.4	60.6	10.4	5.8	24.9	28.8	6.1
Himalaya	49	25	25.4	10.0	4.8	27.1	18.1	9
292	17.7	71	68.9	15.0	9.5	30.3	21.4	8.9
342	21.9	62.5	71.7	15.7	8.3	28.3	19.4	8.9
MK6827	10.2	n.d.	44.4	21.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Waxiro	42.8	n.d.	5.0	14.6	n.d.	19.8	12.7	7.1
Tantangara	51.6	n.d.	29.5	14.6	n.d.	17.2	12.7	4.5

^a % del grano en peso, 14% de humedad
^b % del contenido total de almidón
n.d. no determinado

Tabla 2

Dimensiones del grano					
	Peso del grano (mg)	Longitud del grano (mm)	Ancho del grano (mm)	Grosor del grano (mm)	Cociente L/G
Himalaya	51.01 ± 6.63 ^a	7.01 ± 0.51	3.58 ± 0.34	2.82 ± 0.36	2.48
Tantangara	50.40 ± 6.51 ^a	7.22 ± 0.98	3.60 ± 0.25	2.73 ± 0.21	2.64
Waxiro	45.71 ± 5.21	7.54 ± 0.47	3.40 ± 0.20	2.67 ± 0.19	2.82
AC38	50.79 ± 8.22	7.62 ± 0.65	3.35 ± 0.27	2.64 ± 0.25	2.89
292	32.13 ± 4.67	7.05 ± 0.49	3.63 ± 0.55	1.58 ± 0.20	4.46
342	35.45 ± 6.01	7.28 ± 0.55	3.76 ± 0.38	1.75 ± 0.18	4.16
MK6827	44.89 ± 3.78	11.20 ± 0.58	3.63 ± 0.27	1.77 ± 0.33	6.33

N=50, excepto cuando se indica con ^a, n=200

Tabla 3

Distribución de longitudes de cadena de almidones desramificados por isoamilasas						
DP ^a	Himalaya % ^b	Tantangara % ^b	AC38 % ^b	342 % ^b	292 % ^b	MK6827 % ^b
DP 6-11	24.15	22.40	26.33	38.18	38.96	37.98
DP 12-30	69.12	67.59	67.12	54.14	53.42	55.60
DP 31-60	6.73	10.01	6.05	7.68	7.62	6.42

^a grado de polimerización
^b porcentaje de distribución de oligosacáridos expresado en base molar

Tabla 4

Propiedades térmicas del almidón de cebada evaluadas por DSC								
	Pico 1				Pico 2			
	Inicio	Máximo	Final	ΔH	Inicio	Máximo	Final	ΔH
Glaciar	55.4	59.3	65.3	4.2	93.9	101.4	107.7	0.87
AC38	55.0	62.2	68.2	3.9	89.3	100.1	106.9	1.195
Himalaya	56.8	60.9	68.0	4.5	93.1	101.8	108.3	0.78
292	46.0	51.2	58.1	0.29	88.7	97.7	104.9	1.34
342	45.2	50.4	56.8	0.47	86.5	97.0	105.0	1.59

5

Tabla 5

Parámetros de RVA para almidones de cebada							
	Viscosidad máxima	Fragilidad	Fuerza de sujeción	Asentamiento	Viscosidad final	Viscosidad final normalizada*	Temp. de pastificación (°C)
Himalaya	871.5	653.1	218.4	235.8	454.2	926	64.9
Namoi	621.7	367.5	254.2	375.3	629.5	1284	65.9
AC38	226.7	87.3	139.4	188.4	327.8	697	68.9
292	92.1**	***	133.9	230	363.9	2055	89.5
342	110.9**	***	144.9	264.5	409.4	1869	87.9
MK6827	18.2**	***	25.7	43.3	69	676	n.d.

* Viscosidad final dividida por el contenido de almidón del grano integral
 ** Valor registrado en el momento en que se alcanzó la viscosidad máxima para Himalaya
 *** Valor inferior a cero
 n.d. no determinado

Tabla 6

Datos de cristalinidad del almidón					
Muestra	% H ₂ O (W.B)	Cristalinidad %*	% de A*	% de B*	% de V*
292	29.6	9	-	13	87
342	35.8	12	-	18	81
AC38	26.1	19	93	7	(trazas)
Himalaya	27.7	27	93	7	(trazas)
Waxiro	29.7	41	94	6	-

(* ± 5%)

10

Tabla 7

Análisis de progenie			
Cruce	Encogido	Relleno	Valor calculado para χ^2 c
292 x Sloop ^a	45	155	$\chi^2(3:1) = 1.0$
292 x Tantangara ^b	45	46	$\chi^2(1:1) = 0.01$

^a progenie de cruce estándar
^b progenie haploide doble
^c en cada caso, $\chi^2(0.05)$, $df=1 = 3.84$, por lo tanto, la población de 292 x Sloop se corresponde con una segregación 3:1 y la población haploide doble de 292 x Tantangara se corresponde con una segregación 1:1

Tabla 8

Clasificación de las líneas haploides dobles de 292 x Tantangara						
Número de línea ^a	Cáscara ^b	Peso de la semilla (mg)	Cociente L/G ^c	DP 6-11 (%) ^d	Contenido de amilosa ^e	PCR ^f
1	S	26	3.8	35.87	50.2	292

ES 2 380 362 T3

Clasificación de las líneas haploides dobles de 292 x Tantangara						
Número de línea ^a	Cáscara ^b	Peso de la semilla (mg)	Cociente L/G ^c	DP 6-11 (%) ^d	Contenido de amilosa ^e	PCR ^f
2	S	24	4.21	36.87	56.2	292
3	C	43	3.32	25.45	18.3	Wt
5	S	40	4.58	39.47	55.5	292
7	S	34	4.28	19.63	43.0	292
8	C	48	3.02	21.6	46.7	Wt
9	S	31	2.76	22.89	25.9	Wt
10	S	26	3.02	27.56	21.1	Wt
11	S	34	3.55	37.90	44.7	292
12	C	50	2.94	26.37	32.8	Wt
13	S	27	4.29	38.68	48.4	292
14	C	56	3.07	22.98	20.8	Wt
15	C	46	2.74	24.88	22.9	Wt
16	C	43	2.78	25.40	18.3	Wt
17	S	31	3.8	37.37	54.2	292
18	S	31	4.51	37.46	57.5	292
19	C	26	3.1	29.57	22.7	Wt
20	C	53	3.04	25.42	23.8	Wt
21	S	31	4.5	38.51	59.1	292
22	S	27	4.63	37.25	27.2	292
23	C	47	2.73	24.11	21.2	Wt
24	S	27	4.58	36.89	42.0	292
26	C	35	3.57	19.50	15.1	Wt
27	C	22	4.3	36.81	48.6	292
28	S	31	4.34	38.88	37.0	292
30	S	30	4.04	38.05	48.4	292
31	S	23	4.25	37.07	51.7	292
32	C	48	2.62	20.67	13.0	Wt
33	S	25	4.92	35.68	33.3	292
34	S	31	4.01	38.34	46.1	292
35	C	43	3.16	20.07	23.6	Wt
36	S	26	4.33	36.93	29.7	292
38	C	38	3.01	21.11	9.1	Wt
39	C	33	2.92	20.49	23.5	Wt
40	C	36	2.99	19.57	2.2	Wt
41	S	30	4.05	37.82	40.9	292
42	C	47	2.95	20.80	11.9	Wt
43	S	40	3.24	21.97	18.1	Wt
45	C	52	2.78	19.97	14.5	Wt
46	S	29	4.44	35.87	32.1	292
47	S	35	3.69	36.34	92.9	292
48	C	31	2.54	20.27	13.4	Wt
49	C	54	2.94	22.29	19.3	Wt
50	C	50	2.94	21.92	20.6	Wt
51	C	43	3.73	20.59	18.1	Wt
53	S	31	4.12	36.52	55.3	292
54	S	34	4.02	35.17	57.1	292
55	C	32	4.19	41.35	60.4	292
56	S	29	3.17	21.48	18.1	Wt

ES 2 380 362 T3

Clasificación de las líneas haploides dobles de 292 x Tintangara						
Número de línea ^a	Cáscara ^b	Peso de la semilla (mg)	Cociente L/G ^c	DP 6-11 (%) ^d	Contenido de amilosa ^e	PCR ^f
57	C	30	4.85	36.66	46.3	292
58	S	32	2.97	23.83	13.8	Wt
59	S	46	2.91	24.15	9.2	Wt
60	C	44	2.74	22.39	13.5	Wt
61	S	31	4.47	35.67	61.3	292
63	S	32	4.3	36.94	39.4	292
64	C	39	2.93	21.95	20.5	Wt
65	S	26	3.87	37.51	20.7	292
66	S	30	4.03	36.89	48.7	292
67	C	36	3.17	20.24	14.4	Wt
68	S	43	2.65	22.53	8.4	Wt
69	S	32	3.93	36.34	54.7	292
70	C	43	2.77	22.28	17.6	Wt
71	S	29	3.73	38.73	31.5	292
72	C	47	2.65	22.00	20.8	Wt
73	S	36	4.09	39.58	49.0	292
74	S	24	4.18	36.15	47.8	292
75	C	34	2.99	24.42	14.2	Wt
76	S	31	4.35	35.95	49.9	292
77	C	49	3.19	21.22	17.0	Wt
78	C	33	2.78	21.27	15.6	Wt
79	C	31	2.85	23.04	21.2	Wt
80	C	38	3.18	19.88	18.9	Wt
81	C	37	2.84	24.22	16.2	Wt
82	C	33	4.64	39.99	45.3	292
84	S	28	3.62	36.98	28.9	292
85	S	26	6.44	44.43	41.3	292
86	C	32	2.87	30.73	16.1	Wt
88	S	26	4.62	46.12	39.3	292
89	C	38	2.88	31.25	16.3	Wt
90	C	32	3.19	31.11	13.8	Wt
91	S	31	4.17	42.86	37.3	292
92	S	27	3.99	45.30	44.6	292
93	C	37	2.99	30.77	12.5	Wt
94	C	43	3.67	29.46	21.9	Wt
96	S	33	5.69	47.34	52.2	292
97	S	23	3.41	31.36	17.1	Wt
98	S	32	5.95	45.27	52.4	292
99	S	19	3.68	38.36	1.7	292
100	C	36	3.1	31.92	15.4	Wt
101	S	58	3.29	24.71	2.9	Wt

^a Línea haploide doble de 292 x Tintangara

^b Fenotipo de la cáscara. S: sin cáscara; C: con cáscara

^c Cociente L/G: cociente entre longitud y grosor

^d Porcentaje de cadenas del almidón desramificado con un DP entre 6 y 11, calculado en base molar como el porcentaje de cadenas que se eluyen entre DP6 y DP65

^e Contenido de amilosa determinado mediante el valor del yodo azul

^f Clasificación de PCR. 292: la reacción de PCR proporciona una banda que contiene una banda de 169 pares de bases más 103 pares de bases en la digestión de NlaIV; Wt: la reacción de PCR proporciona una banda que contiene 111 pares de bases, 103 pares de bases y una banda de 57 pares de bases en la digestión de NlaIV

Tabla 9

Análisis detallado de las líneas haploides dobles							
Línea	Cociente L/G	FACE	Viscosidad máxima de RVA (unidades de RVA)	Viscosidad final de RVA (unidades de RVA)	Cociente de viscosidad máxima/final	Contenido de β-glucano (%)	Volumen de hinchamiento de la harina
Control							
Sloop	2.78	23.5	535.8	483.5	1.11	2.3	7.54
Tantangara	2.64	22.4	507	395.1	1.28	5.16	5.97
Himalaya	2.48	24.2	873.9	449.3	1.94	8.53	8.18
AC38	2.89	26.33	226.7	327.8	0.69	5.8	3.75
292	4.46	38.9	92.1	363.9	0.25	13.09	2.00
MK6827	6.33	37.98	18.2	69	0.26	n.d.	2.11
Línea haploide doble							
Natural							
8	3.02	21.6	527.9	431.3	1.22	8.9	6.47
43	3.24	25.4	566.6	527.4	1.07	7.77	6.04
56	3.17	24.9	703.1	523.5	1.34	7.81	6.95
58	2.97	27.9	726.8	588.8	1.23	9.65	6.23
59	2.91	27.0	655	435.8	1.50	7.16	7.21
68	2.65	22.5	876.3	465.5	1.88	8.87	8.63
101	3.29	34.71	471.3	410.3	1.15	6.54	6.26
SSII mutante							
5	4.58	39.5	68.7	316.6	0.217	9.87	2.55
11	3.55	48.2	51.5	240.8	0.21	8.36	2.58
13	4.29	38.7	43.7	265.5	0.16	11.13	2.92
27	4.30	36.8	20.3	96.6	0.21	13.11	2.71
30	4.04	38.05	57.3	251.1	0.23	10.56	2.27
31	4.25	37.1	17.6	124.5	0.14	11.35	2.48
33	4.92	35.7	11.7	83.5	0.14	7.22	2.13
36	4.33	36.9	14.5	93.6	0.15	7.20	2.20
46	4.44	35.9	31.3	175.8	0.18	10.02	2.32
91	4.17	42.9	35.8	189.5	0.19	11.3	2.43
n.d. no determinado							

5

Tabla 10

Datos de hinchamiento de la harina para las semillas BC2F2	
Línea	Volumen de hinchamiento
C5/1 Planta 1 L/G > 3.5	2.118
C5/1 Planta 1 L/G < 3.5	6.913
65/2 Planta 1 L/G > 3.5	2.382
65/2 Planta 1 L/G < 3.5	7.565
65/2 Planta 2 L/G > 3.5	2.409
5/2 Planta 2 L/G < 3.5	6.707

EJEMPLO 2

Diseño y construcción de vectores

5 Las regiones del gen SSII de la cebada (según se han definido en la Figura 15) se clonaron en vectores para su transformación. Se prepararon tres constructos para cada gen diana, abordando las estrategias de supresión genética: (1) cosupresión en sentido, (2) supresión en antisentido y (3) supresión mediada por dúplex.

10 La Figura 16 ilustra la configuración de las secuencias en los constructos de ADN diseñada para suprimir la expresión del gen diana endógeno. El promotor se puede seleccionar entre un promotor específico de endospermo (tal como el promotor de glutenina de elevado peso molecular, el promotor SSI del trigo, el promotor BEII del trigo) o promotores no específicos para el endospermo (tales como ubiquitina o 35S). El constructo también puede contener otros elementos que faciliten la transcripción tales como el elemento nos 3 de OCS. Las regiones de ADN ilustradas se incorporarán en vectores que contienen secuencias de genes marcadores seleccionables adecuadas y otros elementos, o en vectores que se transforman conjuntamente con vectores que contienen estas secuencias.

Transformación del cereal

20 Se han descrito métodos para la transformación de la cebada (Tingay *et al.*, 1997; Wan *et al.*, 1994), la avena (Somers *et al.*, 1992, 1994; Gless *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999, Cho *et al.*, 1999) y el centeno (Castillo *et al.*, 1994; Pena *et al.*, 1984), y estos métodos se pueden emplear para transferir constructos de ADN y generar de este modo plantas transgénicas.

25 *Análisis de las plantas transgénicas*

La identificación de las plantas transgénicas se llevó a cabo mediante la identificación del ADN del constructo de ADN por PCR o hibridación de Southern. Los niveles de la expresión de los genes biosintéticos del almidón de cebada individuales se evaluaron tanto en el ARNm como a niveles de proteínas mediante técnicas estándar tales como la hibridación de Northern y el ensayo de Western blot, respectivamente. El contenido y la composición del grano y el almidón se evaluaron empleando técnicas estándar tales como las mostradas en el Ejemplo 1.

Referencias

- 35 Abel *et al.*, (1996). *The Plant Journal* 10, 981-991.
 Ahokas, (1979). *Barley Genetics Newsletter* 9, 7-9
 Akerberg *et al.*, (1998). *Journal of Cereal Science* 28, 71-80.
 Andersson *et al.*, (2000). *Cereal Chemistry* 77, 463-467
 Andersson *et al.*, (1999). *Journal of the science of food and agriculture*. 79, 979-986.
 40 Andreev *et al.*, (1999). *StarchStarke*. 51, 422-429.
 Banks *et al.*, (1971). *Starch*. 23, 12-15.
 Batey y Curtin. (1997). *Starch* 48, 338-344.
 Batey *et al.*, (1997). *Cereal Chemistry* 74, 497-501.
 Bergh *et al.*, (1999). *Animal Feed Science and Technology* 78, 215-226.
 45 Bhatti (1999). *Cereal Chemistry* 76, 589-599.
 Biyashev *et al.*, (1986). *Soviet Genetics* 22, 296-303.
 Boyer y Preiss, (1978). *Carbohydrate Research* 61, 321-334.
 Boyer y Preiss, (1981). *Plant Physiology* 67, 1141-1145.
 Boye *et al.*, (1980). *Starch* 32, 217-222.
 50 Buleon *et al.*, (1998). *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
 Calvert *et al.*, (1976). *Nutrition Reports. International* 14, 55-61.
 Campbell *et al.*, (1994). *Cereal Chemistry* 71, 464-468.
 Cao *et al.*, (2000). *Archives. of Biochemistry and Biophysics*. 373, 135-146.
 Case *et al.*, (1998). *Journal of Cereal Science* 27, 301-314.
 55 Castillo, *et al.*, (1994). *Biolotechnology* 12, 1366-1371.
 Cho, *et al.* (1999). *Plant Science (Limerick)* 148, 9-17.
 Craig *et al.*, (1998). *Plant Cell* 10, 413-426.
 Czuchajowska *et al.*, (1998). *Cereal Chemistry* 75, 747-754.
 Czuchajowska *et al.*, (1992). *Cereal Chemistry* 69, 413-418.
 60 Denyer *et al.*, (1996). *Plant Physiology* 112, 779-785.
 Elfversson *et al.*, (1999). *Cereal Chemistry* 76, 434-438.
 Eslick y Ries, (1976). *Barley Genetics Newsletter* 6, 21-22.
 Fastnaught *et al.*, (1996). *Crop Science* 36, 941-946.
 Fedak *et al.*, (1972). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 14, 949-957.
 65 Filpse *et al.*, (1996). *Planta* 198, 340.
 Fontaine *et al.*, (1993). *Journal of Biological Chemistry* 268, 16223-16230.

- Fujita *et al.*, (1999) *Breeding. Science* 49, 217-219.
Fuwa *et al.*, (1999). *Starch/Starke*. 51, 147-151.
Gao *et al.*, (1998). *Plant Cell* 10, 399-412.
5 Giroux y Hannah. (1994). *Molecular and General Genetics* 243, 400-408.
Gless *et al.*, (1998). *Journal of Plant Physiology* 152, 151-157.
Goering y DeHaas, (1974). *Cereal Chemistry* 51, 573-578.
Granfeldt *et al.*, (1994). *American Journal of Clinical Nutrition* 59, 1075-1082.
Green *et al.*, (1997). *Plant Physiology* 114, 203-212.
10 Gubler *et al.*, (2000) *Plant Physiology* 122, 1457
Hedman y Boyer, (1982). *Biochemical Genetics* 20, 483-492.
Izydorczyk *et al.*, (2000). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 982-989.
James *et al.*, (1995). *Plant Cell* 7, 417-429.
Jane *et al.*, (1999). *Cereal Chemistry* 76, 629-637.
15 Jarvi y Eslick, R. F. (1975). *Crop Science* 15, 363-366.
Jobling *et al.*, (1999). *Plant Journal* 18, 163-171.
Katz *et al.*, (1993). *Carbohydrate polymers* 21, 133-136.
Knight *et al.*, (1998). *Plant Journal* 14, 613-622.
Konik-Rose *et al.*, (2001). *Starch* 53, 14-20
20 Krueger *et al.*, (1987). *Cereal Chemistry* 64, 187-190.
Kubo *et al.*, (1999). *Plant physiology*. 121, 399-409.
Li *et al.*, (1999). *Plant physiology*. 120, 1147-1155.
Li *et al.*, (2000). *Plant Physiology* 123, 613-624.
Li *et al.*, (1999). *Theoretical and Applied Genetics* 98, 1208-1216.
25 Mizuno *et al.*, (1993). *Journal of Biological Chemistry* 268, 19084-19091.
Mizuno *et al.*, (1992). *Journal of Biochemistry* 112, 643-651.
Morell *et al.*, (1997). *Plant Physiology* 113, 201-208.
Morell *et al.*, (1998). *Electrophoresis* 19, 2603-2611.
Morrison *et al.*, (1984). *Journal of Cereal Science* 2, 257-271.
30 Mouille *et al.*, (1996). *The Plant Cell*. 8, 1353-1366.
Myers *et al.*, (2000). *Plant Physiology* 122, 989-997.
Netsvetaev, (1990). *Nauchno-Tekh. Bull' VSGI, Odessa*. N.º175, 31-35.
Netsvetaev, (1992). *Cytology and Genetics (Kiev)* 26, 26-30.
Netsvetaev y Krestinkov. (1993). *Barley Genetics Newsletter* 22, 44-45.
Newman *et al.*, (1978). *Journal of Animal Science* 47, 448-455.
35 Ng *et al.*, (1997). *Cereal Chemistry* 74, 288-288.
Oscarsson *et al.*, (1998). *Journal of the science of food and agriculture* 78, 359-366.
Oscarsson *et al.*, (1996). *Journal of Cereal Science* 24, 161-170.
Oscarsson *et al.*, (1997). *Journal of Cereal Science* 26, 259-264.
Pena *et al.*, (1987). *Nature, UK* 325, 274-276.
40 Persson y Christerson, (1997). *Sveriges. Utsadesforenings. Tidskrift*. 107, 141-153.
Persson *et al.*, (1996). *Sveriges. Utsadesforenings. Tidskrift*. 106, 79-86.
Pomeranz, (1992). *European Journal of Clinical Nutrition* 46, S63-S68.
Porneranz *et al.*, (1972). *Cereal Chemistry* 49, 629-635.
Rahman *et al.*, (1995). *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 793-803.
45 Ramage y Eslick, (1975). *Barley Genetics Newsletter* 5, 114.
Ramage y Eslick, (1975). *Barley Genetics Newsletter* 6, 115.
Schondelmaier *et al.*, (1992). *Plant Breeding* 109, 274-280.
Schulman y Kammiovirta, (1991). *Starch* 43, 387-389.
Schwall *et al.*, (2000). *Nature Biotechnology* 18, 551-554.
50 Shure *et al.*, (1983). *Cell* 35, 225-233.
Somers *et al.*, (1992). *Fertile, transgenic oat plants. Bio/technology* 10, 1589-1594.
Somers, *et al.* (1994). *Genetic engineering of oat*. 37-46.
Song y Jane, (2000). *Carbohydrate polymers* 41, 365-377.
Sun *et al.*, (1997). *The New Phytologist* 137, 215-215.
55 Sundberg *et al.*, (1998). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76, 457-463.
Swanston, (1992). *Barley Genetics Newsletter* 22, 66-67.
Swanston *et al.*, (1995). *Journal of Cereal Science* 22, 265-273.
Takeda *et al.*, (1993). *Carbohydrate Research* 246, 273-281.
Thorbjornsen *et al.*, (1996). *Plant Journal* 10, 243-250.
60 Tingay *et al.*, (1997). *Plant Journal* 11, 1369-1376.
Topping, (1999). *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 8, S22-S26.
Topping *et al.*, (1997). *The Journal of Nutrition* 127, 615-615.
Vasanthan y Bhatti, (1995). *Cereal Chemistry* 72, 379-384.
Vasanthan y Bhatti, (1998). *Starch-Starke*. 50, 286-291.
65 Walker y Merritt, (1968). *Nature* 221, 482-484.
Wan y Lemaux, (1994). *Plant Physiology* 104, 37-48.

Wang *et al.*, (1998). *Journal of Experimental Botany* 49, 481-502.
 Wang *et al.*, (1993). *Cereal Chemistry* 70, 521-525.
 Wilson y McNab, (1975). *British Poultry Science* 16, 497-504.
 Xue *et al.*, (1996). *Cereal Chemistry* 73, 588-592.
 5 Yamamori, (1998). (Anon.), págs. 300-302. University Extension Press, University of Saskatchewan, Saskatoon.
 Yamamori y Endo, (1996). *Theoretical and Applied Genetics* 93, 275-281.
 Yoshimoto *et al.*, (2000). *Cereal Chemistry* 77, 279-285.
 Zhang *et al.*, (1999). *Plant Cell Reports* 18, 959-966.
 Zheng *et al.*, (2000). *Cereal Chemistry* 77, 140-144.
 10 Zwar y Chandler, (1995). *Planta* 197, 39-48.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Organización para la Investigación Científica e Industrial de la Mancomunidad Australiana (CSIRO)
 15 <120> Cebada con una actividad reducida de SSII y almidón y productos que contienen almidón con un contenido reducido de amilopectina
 <130> B07473
 20 <140> EP01983291
 <141> 2001-11-09
 <160> 12
 25 <210> 1
 <211> 2920
 <212> ADN
 <213> *Hordeum vulgare*
 30 <220>
 <223> ADNc de SSII
 <400> 1

```

cctcgaggtg cgtttacccc acacagagta cactccaact ccagtccaat ccagcccact 60
gccgcttctg cccgcccata gtaccgtcgc cegccccgat cccggccgcc gccatgtcgt 120
cgggcggtcgc gtcccccgcg tccttctctg cgtctcgcgc cgctctcgcc gggagatcat 180
cacggaggag ggcgaggggtg ggcgcgtcgc caaccgcgcg tggggccggc aggctgcaat 240
ggcggccgctc gccgctgcag cgcacggctc ggcacggagc ggtggcccgcg cgcgcccggc 300
ggatcgacga cgcccgcccg ggtaggcagc cccgcgctcg ccgctatggc gccgccaaca 360
aggctcgcgga tcccgtcaa gacgtcgcgc ggcacgcgcg ggaagggtggt gggccgtccc 420
cgccggcacc gaggcaggac gccgcccgtc tgccgagtaa gaacggcacg ctgatcaacg 480
gtgagaacaa acctaccggc ggcggtggcg cgaactaaga cagcgggctt gccacaccgg 540
cacgcgcgcc ccatctgtca atccaaaaca gactaccggt gaacgggtgaa aacaacata 600
aggctcgcctc gccgcccacc agcatagtgg atgtcgcgctc tccgggttcc gcagctaaca 660
tttccatcag taacaagggtg ccgcccgtcg ttgtcccagc caagaagacg ccgcccgtcgt 720
ccgttttccc ggccaagaag acgctgccgt cgtccggctc aaattttgtg tcctcggcct 780
ctgctcccag gctggacact gtcagcgatg tggaaactgc acagaagaag gatgctgta 840
ttgtcaaaga agctccaaa ccaaaggctc tttcggcccc tgcagcccc gctgtacaag 900
aagacctttg ggatttcaa aaatacattg gtttcgagga gcccggtggag gccaaaggatg 960
atggctcggc tgttgcagat gatgcgggtt cctttgaaca tcaccagaat catgattccg 1020
gacctttggc aggggagaa gtcatgaacg tggctcgtcgt tgctgtgaa tgttctccct 1080
ggtgcaaaac aggtgggtctt ggagatgtt ggggtgctt gcccaaggct ttggctaaga 1140
gaggacatcg tgttatggtt gtggtaccaa ggtatgggga ctatgagaa gcctacgatg 1200
tcggagtcgg aaaatactac aaggctgctg gacaggatat ggaagtgaat tatttccatg 1260
cttatatcga tggagtggat tttgtgttca ttgacgctcc tctcttccga caccgtcagc 1320
aagacattta tgggggagc agacaggaaa ttatgaagcg catgattttg ttctgcaagg 1380
ccgctgtcga ggttccttgg cacgttccat gcggcggtgt cccttacggg gatggaaatc 1440
tggctctcat tgcaaatgat tggcacacgg cactcctgcc tgtctatctg aaagcatatt 1500
acagggacca tggtttgatg caatacagtc gctccggtat ggtgatacat aacatcgctc 1560
accagggccg tggccctgta gatgaatcc cgttcaccga gttgacctgag cactacctgg 1620
aacacttcag actgtacgac cccgtcggcg gtgagcacgc caactacttc gccgcccggc 1680
tgaagatggc ggaccagggt gtcgctcgtg gccccgggta cctgtgggag ctgaagacgg 1740
tggagggcgg ctgggggctt cacgacatca tacggcagaa cgactggaag acccgcgga 1800
tcgtgaacgg catcgacaac atggagtggg accctgaggt ggacgtccac ctgaagtcgg 1860
acggctacac caacttctcc ctgaagacgc tggactccgg caagcggcag tgaagggag 1920
ccctgcagcg cgaagtcggg ctgacaggtc gcggcgacgt gccgctgctc gggttcatcg 1980
ggcggctgga cgggcagaag ggcgtggaga tcatcggga cgcgatgccc tggatcgtga 2040
    
```

ES 2 380 362 T3

```

gccaggacgt gcagctggtg atgctgggca cggggcgcca cgacctggag agcatgctgc 2100
agcacttcga gcgggagcac cacgacaagg tgcgcggtg ggtggggttc tccgtgcgcc 2160
tggcgaccg gatcacggcg ggcgcgacg cgtcctcat gccctcccg ttcgagccgt 2220
gcgggctgaa ccagctctac gcgatggcct acggcacctg ccccgctgag cacgcccgtg 2280
gcggcttgag ggataccgtg ccgcccgtg accccttcaa ccactccggg ctccgggtgga 2340
cgttcgaccg cgccgaggcg cacaagctga tcgaggcgct cgggactgac ctccgcacct 2400
accgggacca caaggagagc tggaggggccc tccaggagcg cggcatgtcg caggacttca 2460
gctgggaaca tgcccgaag ctctacgagg acgtcctcgt ccaggccaag taccagtggg 2520
gaacgctgct acccggtcca gccccgcatg cgtgcatgag aggatggaaa tgcgcattgc 2580
gcacttgca atttggcgca cgcaggaacg tgcgctcctt cttgatgaga acgcccgcac 2640
ccgagaggt gagacgctga ttccgatctg gtccgctcga gagtagagt aaacgctcct 2700
tggtcgaggt atatgggaaat gttttttttt cttttttttt gcgagggagg tatatgggaa 2760
tgtaacttg gtattgtaat gtggtatgct gtgtgcatca ttacatcggg tgtgtgtgct 2820
tattcttgct agctaagtcg gaggccaaga gcgaaaagta gctcacatgt ctgatgatg 2880
caagtgcac gggtggtttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2920

```

- 5 <210> 2
- <211> 2950
- <212> ADN
- <213> *Hordeum vulgare*

- 10 <220>
- <221> mutación

- <222> 235
- <223> ADNc del gen SSII de la línea de cebada MK6827

- 15 <400> 2

```

gtgcttttac cccacacaga gtacactcca actccagtec agtccagccc actgcccgtt 60
ctgcccgcgc atcgtaaccg cgcggccccc gatcccggcc gccgcatgt cgtcggcggt 120
cgcgtccccc gcgtccttcc tcgctctcgc gtccgctcgc cccgggagat catcacggag 180
gagggcgagg gtggcgcgct gcgcaaccgc cgtggggccc ggagagctgc aatgacggcc 240
gtcgcgctg cagcgcacgg ctgcgcagcg agcgggtggc gcgcgccg ccgggatcga 300
cgagcccgcg cccggtaggc agcccgcgc tcgcccgtat ggcccgcga ccaaggtcgc 360
ggatcccgtc aagacgctcg atcgcgacgc cgcggaaggt ggtgggcccgt cccgcccggc 420
accgagcag gacgcccgcg gtctgcccag taagaacggc acgctgatca acggtgagaa 480
caaacctacc ggcggcggtg gcgcgactaa agacagcggg ctgcccacac ccgcaacgca 540
gccccatctg tcaatccaga acagagtacc ggtgaacggt gaaaacaaac ataaggtcgc 600
ctcgcgcccg accagcatag tggatgtcgc gtctcccggg tccgagcga acatttccat 660
cagtaacaag gtgcccggct cgttctccc agccaagaag acgcccggct cgtccgtttt 720
cccggccaag aaggcggcgc cgtcgtccgt tgtcccggcc aagaagacgc tgcgctcgtc 780
cggctcaaat tttgtgtcct cggcctctgc tcccaggctg gacactgtca gcgatgtgga 840
acttgacag aagaaggatg cgtgatgtgt caaagaagct caaaaccaa aggtctcttc 900
ggcccctgca gcccccgctg tacaagaaga cctttgggat ttcaagaaat acattggttt 960
cgaggagccc gtggaggcca aggatgatgg ctccgctggt gcagatgatg cgggttcctt 1020
tgaacatcac cagaatcatg attcccggacc tttggcaggg gagaacgtca tgaacgtggt 1080
cgtcgttctg gctgaatggt ctcccgggtg caaacaggt ggtcttgagg atattgcggg 1140
tgctttgccc aaggctttgg ctaagagagg acatcgtggt atggttgggg taccaggta 1200
tggggactat gaggaagcct acgatgtcgg agtccgaaaa tactacaagg ctgctggaca 1260
ggatattgaa gtgaattatt tccatgctta tatcgatgga gtggattttg tgttcattga 1320
cgctcctctc ttccgacacc gtcagcaaga catttatggg ggcagcagac aggaaattat 1380
gaagcgcgat attttgttct gcaaggccgc tgtcgaggtt ccttggcacg ttccatgccc 1440
cgggtgcctt tacgggatg gaaatctggt ctctcattgca aatgatggc acacggcact 1500
cctgctgtc tatctgaaag catattacag ggaccatggt ttgatgcaat acagtcgctc 1560
cgttatgggt atacataaca tcgctcacca gggccgtggc cctgtagatg aatccccgtt 1620

```

ES 2 380 362 T3

caccgagttg cctgagcact acctggaaca cttcagactg tacgaccccg tcggcgggtga 1680
 gcacgccaac tacttcgccc cgggcctgaa gatggcggac caggttgtcg tcgtgagccc 1740
 cgggtacctg tgggagctga agacggtgga gggcggctgg gggcttcacg acatcatacg 1800
 gcagaacgac tgaagacc cgcgcatcgt gaacggcatc gacaacatgg agtggaaacc 1860
 tgagtgagac gtccacctga agtcggacgg ctacaccaac ttctccctga agacgctgga 1920
 ctccggcaag cggcagtgca aggaggccct gcagcgcgag ctggggctgc aggtccgcgg 1980
 cgacgtgccc ctgctcgggt tcatcgggcy gctggacggg cagaagggcy tggagatcat 2040
 cgcggacgcy atgccttggg tegtgagcca ggacgtgcag ctggtgatgc tgggcacggg 2100
 gcgccacgac ctggagagca tgctgcagca cttcagcggg gagcaccacg acaagggtcg 2160
 cgggtgggtg gggttctccg tgcgcctggc gcaccggatc acggcgggcy ccgacgcyct 2220
 cctcatgccc tcccggttcg agccgtgcyg gctgaaccag ctctacgcyg tggcctacgg 2280
 caccatccct gtcgtgcaag ccgctggcgg cctgagggat accgtgcccg cgttcgaccc 2340
 cttcaaccac tccgggctcg ggtggacggt cgaccgcgcy gaggcgcaca agctgatcga 2400
 ggcgctcggg cactgcctcc gcacctaccg ggaccacaag gagagctgga gggcctcca 2460
 ggagcgcggc atgtcgcagg acttcagctg ggaacatgcc gccaaagctct acgaggacgt 2520
 cctcgtccag gccaaagtacc agtggtgaa cgtgctacc ggtccagccc cgcattgctg 2580
 catgagagga tggaaatgcy cattgcgcac ttgcagatct ggcgatgca ggaacgtgcy 2640
 gtccttcttg atgggaacgc cggcatccgc gaggttgaga cgtgattcc gatctggctc 2700
 gtcgagaggt agagtgaac gctcctgtt gcaggatat gggaaatgct ttttttccct 2760
 tttttttttt gcgagggagg tatatgggaa tgtaacttg gtattgtaat gtggtatgct 2820
 gtgtgcatca ttacatcgggt tgttgtgct tattcttctg agctaagtcg gaggccaaaga 2880
 gcgaaagcta gctcacatgt ctgatgatg caagtgacat ggttggttgg gttgtgcagt 2940
 gcaaacggca

5 <210> 3
 <211> 2951
 <212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

10 <220>
 <223> ADNc del gen SSII del cultivar Morex de cebada

<400> 3

gtgcgtttac cccacacaga gtactctcca actccagctc agtccagccc actgccgctt 60
 ctgccccccc atcgtaccgt cgcgcgcccc gatccccggc gccgcatgt cgtcggcgggt 120
 cgcgtcccc cgcctcttcc tgcgctcgc gtcgcctcgc cccgggagat catcacggag 180
 gagggcgagg gtggcgcggt cgccaaccgc cgctggggcc ggcaggctgc aatggcggcc 240
 gtcgcccgtg cagcgcacgg ctgcgcacgg agcgggtggcc gcgcgcgccc ccgggatcga 300
 cgacgcccgc cccggtaggc agccccgcgc tcgcccctat ggcgcgcgca ccaaggctgc 360
 ggatcccgtc aagacgctcg atcgcgacgc cgcggaagggt ggtggggcgt ccccgccggc 420
 accgaggcag gacgcgccc gtctgcccag taagaacggc acgctgatca acggtgagaa 480
 caaacctacc ggcggcgggt gcgcgactaa agacagcggg ctgcccacac ccgcacgcgc 540
 gccccatctg tcaatccaga acagagtacc ggtgaacggt gaaaacaaac ataaggctgc 600
 ctgcgcgccc accagcatag tggatgtcgc gtctccgggt tccgcageta acatttccat 660
 cagtaacaag gtgcccgggt ccggtgtccc agccaagaag acgcccgggt cgtccgcttt 720
 cccggccaag aaggcgcgcg cgtcgtccgt tgtcccggcc aagaagcgc tgcgctcgtc 780
 cggctcaaat tttgtgtcct cggcctctgc tcccaggctg gacactgtca gcgatgtgga 840
 acttgacag aagaaggatg cgctgattgt caaagaagct ccaaaaccaa aggtctcttc 900
 ggccccgtca gcccccgtg tacaaagaaga cctttgggat ttcaagaaat acattggttt 960
 cgaggagccc gtggaggcca aggatgatg ctccggctgt gcagatgatg cgggttcctt 1020
 tgaacatcac cagaatcatg attccggacc tttggcaggg gagaacgtca tgaacgtggt 1080
 cgtcgttctg gctgaatgtt ccccctgggt caaaacaggt ggtcttggag atgttgcggg 1140
 tgctttgccc aaggctttgg ctaagagagg acatcgtgtt atgggttggg taccaaggta 1200
 tggggactat gaggaagcct acgatgtcgg agtccgaaaa tactacaagg ctgctggaca 1260

15

ES 2 380 362 T3

ggatatggaa gtgaattatt tccatgctta tatcgatgga gtggattttg tgttcattga 1320
 cgctcctctc ttccgacacc gtcagcaaga catttatggg ggcagcagac aggaattat 1380
 gaagcgcagc atttttgtct gcaagggcgc tgcgaggtt ccttggcacg ttccatgcgg 1440
 cgggtccctc tacgggatg gaaatctggt cttcattgca aatgatggc acacggcact 1500
 cctgcctgtc tatctgaaag catattacag ggaccatggt ttgatgcaat acagtcgctc 1560
 cgttatggtg atacataaca tcgctcacca gggcctggc cctgtagatg aattcccgtt 1620
 caccgagtgc cctgagcact acctggaaca cttcagactg tacgaccccg tcggcgggtga 1680
 gcacgccaac tacttcgccc cggcctgaa gatggcggac caggttgtcg tcgtgagccc 1740
 cgggtacctg tgggagctga agacgggtgga gggcggctgg gggcttcacg acatcatacg 1800
 gcagaacgac tggaaagacc cgggcatcgt gaacggcacc gacaacatgg agtggaaacc 1860
 tgaggtggac gtccacctga agtcggacgg ctacaccaac ttctccctga agacgctgga 1920
 ctccggcaag cggcagtgca aggagggcct gcagcgcgag ctggggctgc aggtcccggg 1980
 cgagctgccc ctgctcgggt tcatcggggc gctggacggg cagaaggggc tggagatcat 2040
 cgcggacggc atgccctgga tcgtgagcca ggacgtgcag ctggtgatgc tgggcacggg 2100
 gcgcacagc ctggagagca tgctgcagca cttcagcggg gacaccacg acaagggtcgg 2160
 cgggtgggtg gggttctccg tgcgctggc gcaccggac acggcggggc ccgacgcgct 2220
 cctcatgccc tcccggttcg agccgtgccc gctgaaccag ctctacgca tggcctacgg 2280
 caccatcctc gtcgtgcacg ccgtcggcgg cctgagggat acgctgcccg cgttcgaccc 2340
 cttcaaccac tccgggctcg ggtggacgtt cgaccgccc gaggcgcaca agctgatcga 2400
 ggcctcggg cactgcctcc gcacctaccg ggaccacaag gagagctgga gggcctcca 2460
 ggagcggcgc atgtcgcagg acttcagctg ggaacatgcc gccaaagctct acgaggacgt 2520
 cctcgtccag gccaaagtacc agtggatgac gctgctacc ggtccagccc cgcatgcgtg 2580
 catgagagga tggaaatgcg cattgcgcac ttgcagattt ggcgcatgca ggaacgtgcc 2640
 gtccttcttg atgggaacgc cggcatccc gaggttgaga cgtgatccc gatctggtcc 2700
 gtcgcagagt agagtgaac gtccttgtt gcaggtatat ggaatggtt ttttttctc 2760
 ttttttttt tgcgagggag gtatatggga atgtaactt ggtattgtaa tgtggtatgc 2820
 tgtgtgcat attacatcgg ttgtgtgtc ttattcttgc tagctaagtc ggaggccaag 2880
 agcgaaagct agctcacatg tctgatgat gcaagtgaca tggttggtt ggttgtgcag 2940
 tgcaaacggc a 2951

- <210> 4
- 5 <211> 2946
- <212> ADN
- <213> *Hordeum vulgare*

- <220>
- 10 <221> mutación
- <222> 1855
- <223> ADNc del gen SSII de la línea 292 de cebada

- <400> 4

15 gtgcgtttac cccacacaga gtactctcca actccagctc agtccagccc actgccgctt 60
 ctgcccggcc atcgtaaccg cgcggccccc gatcccggcc gccgccatgt cgtcggcggg 120
 cgcgtccccc gcgtccttcc tcgcgctcgc gtccgcctcg cccgggagat catcacggag 180
 gagggcgagg gtgggcgctg cgcgaaccgc cgtcggggcc ggcaggctgc aatggcggcc 240
 gtcgcccgtg cagcgcacgg ctgcgcagcg agcgggtggc gcgcgcgccc cgggatcga 300
 cgacgcccgc cccggtaggc agccccgcgc tcgcccctat ggcgccgcca ccaaggtcgc 360
 ggatcccgtc aagacgctcg atcgcgacgc cgcggaaggg ggtgggcccgt ccccgcggc 420
 accgaggcag gacgcccggc gctcgcggag taagaacggc acgctgatca acggtgagaa 480
 caaacctacc ggcggcgggt gcgcgactaa agacagcggg ctgcccacac ccgacgcgc 540
 gccccatctg tcaatccaga acagagtacc ggtgaacggg gaaaacaaac ataaggtcgc 600
 ctgcggcccg accgcatag tggatgtcgc gtctccgggt tccgcagcca acatttccat 660
 cagtaacaag gtgccgccc cgttgttccc agccaagaag acgcccggct cgtccgtttt 720

ES 2 380 362 T3

```

ccccgccaaag aaggcgccgc cgtcgtccgt tgtcccggcc aagaagacgc tgcctcgtc 780
cggctcaaat tttgtgtcct cggcctctgc tcccaggctg gacactgtca gcgatgtgga 840
acttgcacag aagaaggatg cgtctgattgt caaagaagct ccaaaccaa aggtcctttc 900
ggccccctgca gcccccgctg tacaagaaga cctttgggat ttcaagaat acattggttt 960
cgaggagccc gtggaggcca aggatgatgg cteggctggt gcagatgatg cgggttcctt 1020
tgaacatcac cagaatcatg attccggacc tttggcaggg gagaacgtca tgaacgtggt 1080
cgtcgttgcct gctgaatggt ctcccctgggt caaacacaggt ggtcttggag atgttgcggg 1140
tgctttgccc aaggctttgg ctaagagagg acatcgtggt atggttgtgg taccaaggta 1200
tggggactat gaggaagcct acgatgtcgg agtccgaaaa tactacaagg ctgctggaca 1260
ggatatggaa gtgaattatt tccatgctta tatcgatgga gtggattttg tgttcattga 1320
cgctcctctc ttccgacacc gtcagcaaga catttatggg ggcagcagac aggaaattat 1380
gaagcgcatg attttgttct gcaaggccgc tgtcaggggt ccttggcacg ttccatgcgg 1440
cgggtccctc tacggggatg gaaatctggt ctteattgca aatgattgga acacggcact 1500
cctgcctgtc tatctgaaaag catattacag ggaccatggt ttgatgcaat acagtcgctc 1560
cgttatggtg atacataaca tcgctcacca gggccgtggc cctgtagatg aatccccgtt 1620
caccgagtgt cctgagcact acctggaaca ctccagactg tacgaccccg tcggcggtga 1680
gcacgccaac tacttcgccc cggcctgaa gatggcggac caggttgtcg tcgtgagccc 1740
cgggtacctg tgggagctga agacgggtgga gggcggtcgg gggcttcacg acatcatacg 1800
gcagaacgac tgggaagacc cgggcatcgt gaacggcacc gacaacatgg agtgaacccc 1860
tgaggtggac gtccacctga agtcggacgg ctacaccaac ttctccctga agacgctgga 1920
ctccggcaag cggcagtgca aggagccctc gcagcgcgag ctggggctgc aggtcccggg 1980
cgacgtgccc ctgctcgggt tcctcggggc gctggacggg cagaagggcg tggagatcat 2040
cgcggacgag atgccctgga tcgtgagcca ggactgacg ctgggtgatg tgggcacggg 2100
gcgccacgac ctggagagca tgctgcagca ctctgagcgg gagcaccacg acaaggtgcg 2160
cgggtgggtg ggggtctccg tgcgcctggc gcaccggatc acggcggggc ccgacgcgct 2220
cctcatgccc tcccggttcg agccgtgccc gctgaaccag ctctacgcga tggcctacgg 2280
caccatccct gtcgtgcacg ccgtcggcgg cctgagggat accgtgccgc cgttcgaccc 2340
cttcaaccac tccgggctcg ggtggacggt cgaccgcgcc gagggcgaca agctgatcga 2400
ggcgctcggg cactgcctcc gcacctaccg ggaccacaag gagagctgga ggggcctcca 2460
ggagcgcgcc atgtcgcagg acttcagctg ggaacatgcc gccaaactct acgaggacgt 2520
cctcgtccag gccaaagtacc agtggatgaa gctgtaccce ggtccagccc cgcagcgtg 2580
catgagagga tggaaatgag cattgcgcac ttgcagattt ggcgcacgca ggaacgtgcc 2640
gtccttcttg atgagaacgc cggcatccgc gaggttgaga cgctgattcc gatctggtcc 2700
gtcgcagagt agagtgaac gctcctgtt gcaggtatat gggaaatggt tttttcctt 2760
ttttttgcga gggaggtata tgggaatggt aacttgggat tgtaatgtgg tatgctgtgt 2820
gcattattac atcggttggt gttgcttatt cttgctagct aagtcggagg ccaagagcga 2880
aagctagctc acatgtctga tgtatgcaag tgacatggtt ggtttgggtt gcagtgcaa 2940
acggca

```

- <210> 5
- 5 <211> 802
- <212> PRT
- <213> *Hordeum vulgare*

- <220>
- 10 <223> Secuencia de aminoácidos deducida para SSII del cultivar Morex de la cebada

<400> 5

```

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Pro Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala
1                               10                    15
Ser Ala Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly
20                               25                    30
Ala Ser Pro Thr Arg Ala Gly Ala Gly Arg Leu Gln Trp Arg Pro
35                               40                    45

```

ES 2 380 362 T3

Ser Pro Leu Gln Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Arg
 50 55 60
 Ala Ala Gly Ile Asp Asp Ala Ala Pro Gly Arg Gln Pro Arg Ala
 65 70 75
 Arg Arg Tyr Gly Ala Ala Thr Lys Val Ala Asp Pro Val Lys Thr
 80 85 90
 Leu Asp Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala
 95 100 105
 Pro Arg Gln Asp Ala Ala Arg Leu Pro Ser Lys Asn Gly Thr Leu
 110 115 120
 Ile Asn Gly Glu Asn Lys Pro Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys
 125 130 135
 Asp Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Leu Ser Ile
 140 145 150
 Gln Asn Arg Val Pro Val Asn Gly Glu Asn Lys His Lys Val Ala
 155 160 165
 Ser Pro Pro Thr Ser Ile Val Asp Val Ala Ser Pro Gly Ser Ala
 170 175 180
 Ala Asn Ile Ser Ile Ser Asn Lys Val Pro Pro Ser Val Val Pro
 185 190 195
 Ala Lys Lys Thr Pro Pro Ser Ser Val Phe Pro Ala Lys Lys Thr
 200 205 210
 Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Val Ser Ser Ala Ser Ala Pro
 215 220 225
 Arg Leu Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Leu Ala Gln Lys Lys Asp
 230 235 240
 Ala Leu Ile Val Lys Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Ala
 245 250 255
 Pro Ala Ala Pro Ala Val Gln Glu Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys
 260 265 270
 Tyr Ile Gly Phe Glu Glu Pro Val Glu Ala Lys Asp Asp Gly Ser
 275 280 285
 Ala Val Ala Asp Asp Ala Gly Ser Phe Glu His His Gln Asn His
 290 295 300
 Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn Val Val Val
 305 310 315
 Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly
 320 325 330
 Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Lys Arg Gly His
 335 340 345
 Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Glu Glu Ala
 350 355 360
 Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp
 365 370 375
 Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly Val Asp Phe
 380 385 390
 Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Gln Asp Ile
 395 400 405
 Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe
 410 415 420
 Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly
 425 430 435

ES 2 380 362 T3

Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp
 440 445 450
 His Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp
 455 460 465
 His Gly Leu Met Gln Tyr Ser Arg Ser Val Met Val Ile His Asn
 470 475 480
 Ile Ala His Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr
 485 490 495
 Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro
 500 505 510
 Val Gly Gly Glu His Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met
 515 520 525
 Ala Asp Gln Val Val Val Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu
 530 535 540
 Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln
 545 550 555
 Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Asn Met
 560 565 570
 Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Val His Leu Lys Ser Asp Gly Tyr
 575 580 585
 Thr Asn Phe Ser Leu Lys Thr Leu Asp Ser Gly Lys Arg Gln Cys
 590 595 600
 Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln Val Arg Gly Asp
 605 610 615
 Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly
 620 625 630
 Val Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp Ile Val Ser Gln Asp
 635 640 645
 Val Gln Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His Asp Leu Glu Ser
 650 655 660
 Met Leu Gln His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly
 665 670 675
 Trp Val Gly Phe Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly
 680 685 690
 Ala Asp Ala Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu
 695 700 705
 Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala Tyr Gly Thr Ile Pro Val Val His
 710 715 720
 Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe
 725 730 735
 Asn His Ser Gly Leu Gly Trp Thr Phe Asp Arg Ala Glu Ala His
 740 745 750
 Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu Arg Thr Tyr Arg Asp
 755 760 765
 His Lys Glu Ser Trp Arg Gly Leu Gln Glu Arg Gly Met Ser Gln
 770 775 780
 Asp Phe Ser Trp Glu His Ala Ala Lys Leu Tyr Glu Asp Val Leu
 785 790 795
 Val Gln Ala Lys Tyr Gln Trp
 800

<210> 6
 <211> 802
 5 <212> PRT
 <213> *Hordeum vulgare*

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos deducida para SSII del cultivar Himalaya de cebada

10 <400> 6

ES 2 380 362 T3

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Pro Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15
Ser Ala Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly
20 25 30
Ala Ser Pro Thr Arg Ala Gly Ala Gly Arg Leu Gln Trp Arg Pro
35 40 45
Ser Pro Leu Gln Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Arg
50 55 60
Ala Ala Gly Ile Asp Asp Ala Ala Pro Gly Arg Gln Pro Arg Ala
65 70 75
Arg Arg Tyr Gly Ala Ala Thr Lys Val Ala Asp Pro Val Lys Thr
80 85 90
Leu Asp Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala
95 100 105
Pro Arg Gln Asp Ala Ala Arg Leu Pro Ser Lys Asn Gly Thr Leu
110 115 120
Ile Asn Gly Glu Asn Lys Pro Thr Gly Gly Gly Ala Thr Lys
125 130 135
Asp Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Leu Ser Ile
140 145 150
Gln Asn Arg Val Pro Val Asn Gly Glu Asn Lys His Lys Val Ala
155 160 165
Ser Pro Pro Thr Ser Ile Val Asp Val Ala Ser Pro Gly Ser Ala
170 175 180
Ala Asn Ile Ser Ile Ser Asn Lys Val Pro Pro Ser Val Val Pro
185 190 195
Ala Lys Lys Thr Pro Pro Ser Ser Val Phe Pro Ala Lys Lys Thr
200 205 210
Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Val Ser Ser Ala Ser Ala Pro
215 220 225
Arg Leu Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Leu Ala Gln Lys Lys Asp
230 235 240
Ala Leu Ile Val Lys Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Ala
245 250 255
Pro Ala Ala Pro Ala Val Gln Glu Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys
260 265 270
Tyr Ile Gly Phe Glu Glu Pro Val Glu Ala Lys Asp Asp Gly Ser
275 280 285
Ala Val Ala Asp Asp Ala Gly Ser Phe Glu His His Gln Asn His
290 295 300
Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn Val Val Val
305 310 315
Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly
320 325 330
Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Lys Arg Gly His
335 340 345

ES 2 380 362 T3

Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Glu Glu Ala
 350 355 360
 Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp
 365 370 375
 Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly Val Asp Phe
 380 385 390
 Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Gln Asp Ile
 395 400 405
 Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe
 410 415 420
 Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly
 425 430 435
 Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp
 440 445 450
 His Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp
 455 460 465
 His Gly Leu Met Gln Tyr Ser Arg Ser Val Met Val Ile His Asn
 470 475 480
 Ile Ala His Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr
 485 490 495
 Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro
 500 505 510
 Val Gly Gly Glu His Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met
 515 520 525
 Ala Asp Gln Val Val Val Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu
 530 535 540
 Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln
 545 550 555
 Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Asn Met
 560 565 570
 Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Val His Leu Lys Ser Asp Gly Tyr
 575 580 585
 Thr Asn Phe Ser Leu Lys Thr Leu Asp Ser Gly Lys Arg Gln Cys
 590 595 600
 Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln Val Arg Gly Asp
 605 610 615
 Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly
 620 625 630
 Val Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp Ile Val Ser Gln Asp
 635 640 645
 Val Gln Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His Asp Leu Glu Ser
 650 655 660
 Met Leu Gln His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly
 665 670 675
 Trp Val Gly Phe Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly
 680 685 690
 Ala Asp Ala Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu
 695 700 705
 Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala Tyr Gly Thr Ile Pro Val Val His
 710 715 720
 Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe
 725 730 735

 Asn His Ser Gly Leu Gly Trp Thr Phe Asp Arg Ala Glu Ala His
 740 745 750
 Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu Arg Thr Tyr Arg Asp
 755 760 765
 His Lys Glu Ser Trp Arg Gly Leu Gln Glu Arg Gly Met Ser Gln
 770 775 780
 Asp Phe Ser Trp Glu His Ala Ala Lys Leu Tyr Glu Asp Val Leu
 785 790 795
 Val Gln Ala Lys Tyr Gln Trp
 800

5 <210> 7
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> *Hordeum vulgare*

10 <220>
 <221> SITIO

ES 2 380 362 T3

<222> 583

<223> Secuencia de aminoácidos deducida para SSII de la línea 292 de la cebada con terminación prematura

<400> 7

5

```

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Pro Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala
1          5          10          15
Ser Ala Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly
          20          25          30
Ala Ser Pro Thr Arg Ala Gly Ala Gly Arg Leu Gln Trp Arg Pro
          35          40          45
Ser Pro Leu Gln Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Arg
          50          55          60
Ala Ala Gly Ile Asp Asp Ala Ala Pro Gly Arg Gln Pro Arg Ala
          65          70          75
Arg Arg Tyr Gly Ala Ala Thr Lys Val Ala Asp Pro Val Lys Thr
          80          85          90
Leu Asp Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala
          95          100         105
Pro Arg Gln Asp Ala Ala Arg Leu Pro Ser Lys Asn Gly Thr Leu
          110         115         120
Ile Asn Gly Glu Asn Lys Pro Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys
          125         130         135
Asp Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Leu Ser Ile
          140         145         150
Gln Asn Arg Val Pro Val Asn Gly Glu Asn Lys His Lys Val Ala
          155         160         165
Ser Pro Pro Thr Ser Ile Val Asp Val Ala Ser Pro Gly Ser Ala
          170         175         180
Ala Asn Ile Ser Ile Ser Asn Lys Val Pro Pro Ser Val Val Pro
          185         190         195
Ala Lys Lys Thr Pro Pro Ser Ser Val Phe Pro Ala Lys Lys Thr
          200         205         210
Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Val Ser Ser Ala Ser Ala Pro
          215         220         225
Arg Leu Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Leu Ala Gln Lys Lys Asp

```

ES 2 380 362 T3

	230		235		240
Ala Leu Ile Val	Lys Glu Ala Pro Lys	Pro Lys Ala Leu Ser	Ala		
	245		250		255
Pro Ala Ala Pro	Ala Val Gln Glu Asp	Leu Trp Asp Phe Lys	Lys		
	260		265		270
Tyr Ile Gly Phe	Glu Glu Pro Val Glu	Ala Lys Asp Asp Gly	Ser		
	275		280		285
Ala Val Ala Asp	Asp Ala Gly Ser Phe	Glu His His Gln Asn	His		
	290		295		300
Asp Ser Gly Pro	Leu Ala Gly Glu Asn	Val Met Asn Val Val	Val		
	305		310		315
Val Ala Ala Glu	Cys Ser Pro Trp Cys	Lys Thr Gly Gly Leu	Gly		
	320		325		330
Asp Val Ala Gly	Ala Leu Pro Lys Ala	Leu Ala Lys Arg Gly	His		
	335		340		345
Arg Val Met Val	Val Val Pro Arg Tyr	Gly Asp Tyr Glu Glu	Ala		
	350		355		360
Tyr Asp Val Gly	Val Arg Lys Tyr Tyr	Lys Ala Ala Gly Gln	Asp		
	365		370		375
Met Glu Val Asn	Tyr Phe His Ala Tyr	Ile Asp Gly Val Asp	Phe		
	380		385		390
Val Phe Ile Asp	Ala Pro Leu Phe Arg	His Arg Gln Gln Asp	Ile		
	395		400		405
Tyr Gly Gly Ser	Arg Gln Glu Ile Met	Lys Arg Met Ile Leu	Phe		
	410		415		420
Cys Lys Ala Ala	Val Glu Val Pro Trp	His Val Pro Cys Gly	Gly		
	425		430		435
Val Pro Tyr Gly	Asp Gly Asn Leu Val	Phe Ile Ala Asn Asp	Trp		
	440		445		450
His Thr Ala Leu	Leu Pro Val Tyr Leu	Lys Ala Tyr Tyr Arg	Asp		
	455		460		465
His Gly Leu Met	Gln Tyr Ser Arg Ser	Val Met Val Ile His	Asn		
	470		475		480
Ile Ala His Gln	Gly Arg Gly Pro Val	Asp Glu Phe Pro Phe	Thr		
	485		490		495
Glu Leu Pro Glu	His Tyr Leu Glu His	Phe Arg Leu Tyr Asp	Pro		
	500		505		510
Val Gly Gly Glu	His Ala Asn Tyr Phe	Ala Ala Gly Leu Lys	Met		
	515		520		525
Ala Asp Gln Val	Val Val Val Ser Pro	Gly Tyr Leu Trp Glu	Leu		
	530		535		540
Lys Thr Val Glu	Gly Gly Trp Gly Leu	His Asp Ile Ile Arg	Gln		
	545		550		555
Asn Asp Trp Lys	Thr Arg Gly Ile Val	Asn Gly Ile Asp Asn	Met		
	560		565		570
Glu					

5 <210> 8
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> *Hordeum vulgare*

10 <220>
 <221> SITIO
 <222> 42
 <223> Secuencia de aminoácidos deducida para SSII de la línea MK6827 de la cebada con terminación prematura

15 <400> 8

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Pro Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala			
1	5	10	15
Ser Ala Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Gly			
	20	25	30
Ala Ser Pro Thr Arg Ala Gly Ala Gly Arg Leu Gln			
	35	40	

20 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN

ES 2 380 362 T3

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador de PCR ssla
5
<400> 9
tggtgaggt ccatggcag ttc 23
<210> 10
10 <211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> Cebador de PCR sslb
<400> 10
agtcgttctg ccgatgatg tcg 23
20 <210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223> Cebador de PCR ZLSS2P4
<400> 11
30 cctggaacac ttcagactgt acg 23
<210> 12
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> Cebador de PCR ZLBSSIIS
<400> 12
40 ctcaggag aagtggtgt agc 23

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un grano de una planta de cebada que comprende un gen SSII mutado, de manera que la actividad SSII codificada por dicho gen SSII mutado está suprimida y el contenido total de almidón de dicho grano tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p), determinado por HPLC, y que
- 10 a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y
- b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y
- c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%.
- 15 **2.** El grano de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho gen SSII contiene la secuencia representada en SEQ ID NO 1 y la mutación se selecciona entre un mutante de truncamiento, o comprende una delección, inversión, duplicación o mutación puntual.
- 20 **3.** El grano de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho gen SSII mutado es un mutante de truncamiento, de manera que el dominio catalítico C-terminal del gen SSII mutado no se traduce.
- 4.** El grano de acuerdo con la reivindicación 1, donde la secuencia del ADNc de dicho gen SSII mutado es la representada en la SEQ ID NO 4.
- 25 **5.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde
- a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 35%, y
- 30 b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 60%, y
- c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 8%.
- 35 **6.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la harina o el producto integral obtenidos a partir del grano presentan un volumen de hinchamiento inferior a 3.2.
- 7.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la harina obtenida a partir del grano presenta un volumen de hinchamiento de al menos 2.
- 40 **8.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho grano comprende al menos un 6% de β -glucano como porcentaje del peso total del grano sin cáscara.
- 9.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho grano presenta una característica seleccionada del grupo constituido por: tener un contenido de almidón superior a un 12% del grano sin cáscara, ser gimnospermo y tener un cociente de la longitud entre el grosor inferior a 5.8.
- 45 **10.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho grano tiene un cociente de la longitud entre el grosor inferior a 5.5.
- 50 **11.** El grano de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho grano tiene un cociente de la longitud entre el grosor comprendido en el intervalo de 4 a 5.
- 12.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el almidón de dicho grano **se caracteriza por que** presenta al menos una de las siguientes propiedades:
- 55 a) el inicio del primer pico de gelatinización detectado por calorimetría diferencial de barrido es inferior a 53 °C,
- b) el primer pico de gelatinización detectado por calorimetría diferencial de barrido es inferior a 60 °C, y
- c) la entalpía (ΔH) del primer pico de gelatinización detectado por calorimetría diferencial de barrido es inferior a 3.5.
- 60 **13.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el almidón de dicho grano presenta una temperatura de pastificación superior a 75 °C.
- 65 **14.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la proporción de almidón de dicho grano que exhibe cristalinidad es inferior a un 20%.

- 5 **15.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la proporción del almidón cristalino contenido en el almidón de dicho grano que exhibe una forma cristalina característica de un complejo de almidón-lípido es superior a un 50%.
- 16.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde el contenido total de almidón de dicho grano comprende al menos un 60% (p/p) de amilosa, determinado por HPLC.
- 10 **17.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es superior a un 5%.
- 18.** Una planta capaz de producir un grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
- 15 **19.** El almidón de una planta de cebada, donde dicho almidón tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p), determinado por HPLC, y donde
- a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y
- 20 b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y
- c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%.
- 25 **20.** El almidón de acuerdo con la reivindicación 19, donde
- a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 35%, y
- 30 b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 60%, y
- c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 8%.
- 21.** El almidón de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, que comprende un lípido asociado al almidón, donde el almidón con el lípido asociado exhibe una forma cristalina de tipo complejo V, donde la forma cristalina de tipo complejo V representa al menos un 10% del almidón cristalino.
- 35 **22.** El grano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde dicho grano está molido, triturado, troceado, descascarillado o enrollado.
- 40 **23.** Un producto alimentario o aditivo alimentario que comprende el almidón de acuerdo con la reivindicación 19, 20 o 21 o un grano de acuerdo con la reivindicación 22.
- 24.** El producto alimentario o aditivo alimentario de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicho producto o aditivo alimentario se selecciona del grupo constituido por harina, pan, pasteles, galletas, espesantes, bebidas malteadas, bebidas de cebada, fideos o sopas instantáneas.
- 45 **25.** El uso del almidón de acuerdo con la reivindicación 19, 20 o 21 o un grano de acuerdo con la reivindicación 22 para preparar un producto alimentario.
- 50 **26.** El uso de una planta de cebada que comprende un gen SSII mutado, de manera que la actividad SSII codificada por dicho gen SSII mutado está suprimida y el contenido total de almidón del grano obtenido de dicha planta tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p), determinado por HPLC, y que
- 55 a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y
- b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y
- 60 c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%,
- para producir un grano de cebada, teniendo el contenido total de almidón de dicho grano un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p), determinado por HPLC.

27. El uso de un constructo de ADN para reducir la expresión del gen SSII en una planta de cebada, de manera que el almidón del grano obtenido de dicha planta tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p), determinado por HPLC, y que

- 5 a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y
b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y
10 c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%,

donde dicho constructo de ADN comprende una secuencia que codifica

- 15 a) una molécula de ARN antisentido capaz de interferir en la transcripción o el procesamiento de la enzima SSII, o
b) una ribozima, o
c) una copia adicional en la misma orientación que el gen que codifica la enzima SSII, o
d) una molécula de ARN bicatenaria, o
20 e) un constructo de horquilla diseñado para producir una molécula de ARN bicatenaria capaz de suprimir la actividad SSII endógena.

28. El uso de

- 25 a) una molécula de ARN antisentido capaz de interferir en la transcripción o el procesamiento de la enzima SSII, o
b) una ribozima, o
c) una copia adicional en la misma orientación que el gen que codifica la enzima SSII, o
d) una molécula de ARN bicatenaria, o
30 e) un constructo de horquilla diseñado para producir una molécula de ARN bicatenaria capaz de suprimir la actividad SSII endógena,

para reducir la expresión del gen SSII en una planta de cebada, de manera que el almidón del grano obtenido de dicha planta tiene un contenido relativo de amilosa de al menos un 50% (p/p), determinado por HPLC, y que

- 35 a) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 6 a 11 residuos es de al menos un 30%, y
b) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 12 a 30 residuos es inferior a un 65%, y
40 c) la proporción de cadenas de amilopectina contenidas en el almidón de dicho grano que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 31 a 60 residuos es inferior a un 10%.

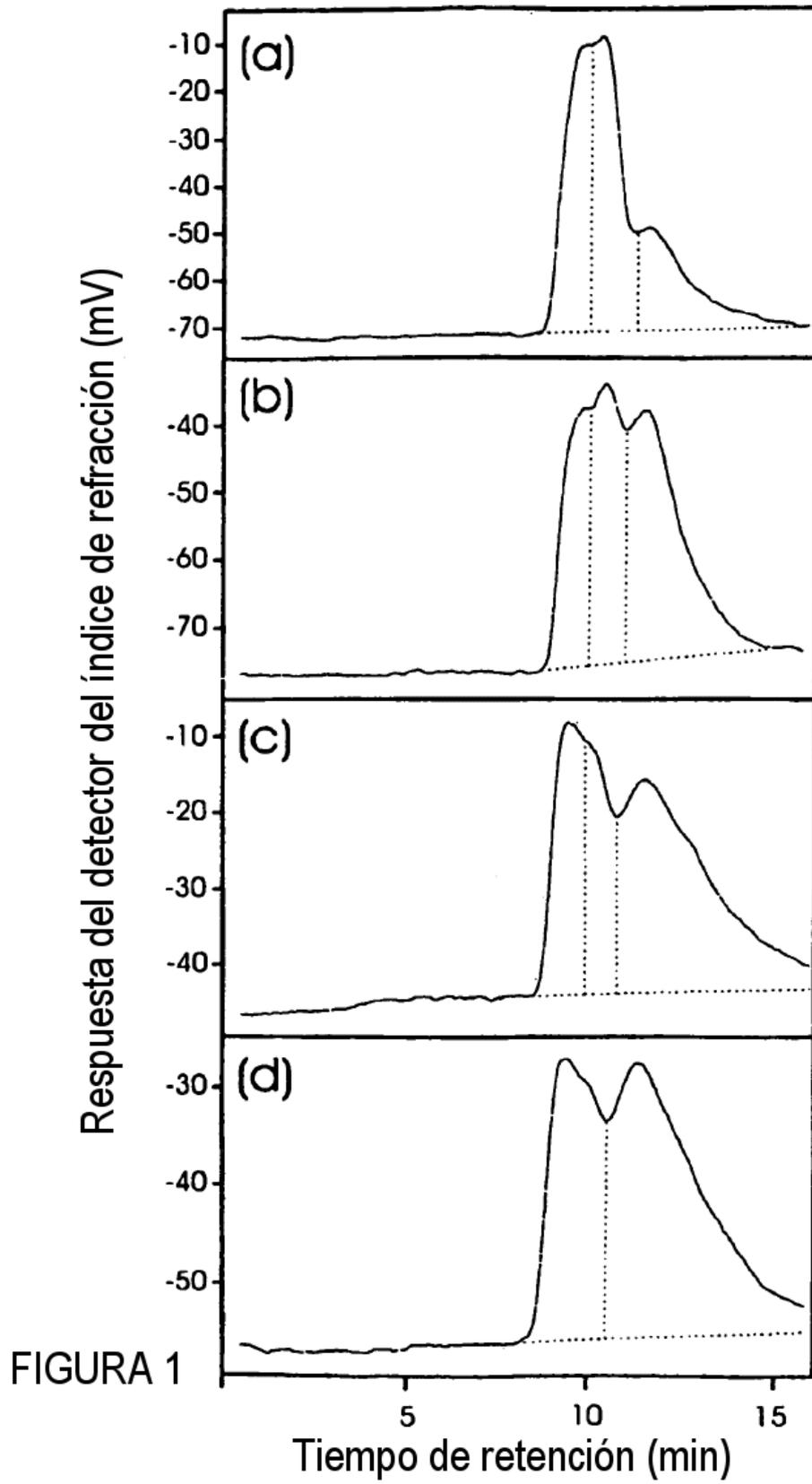


FIGURA 1

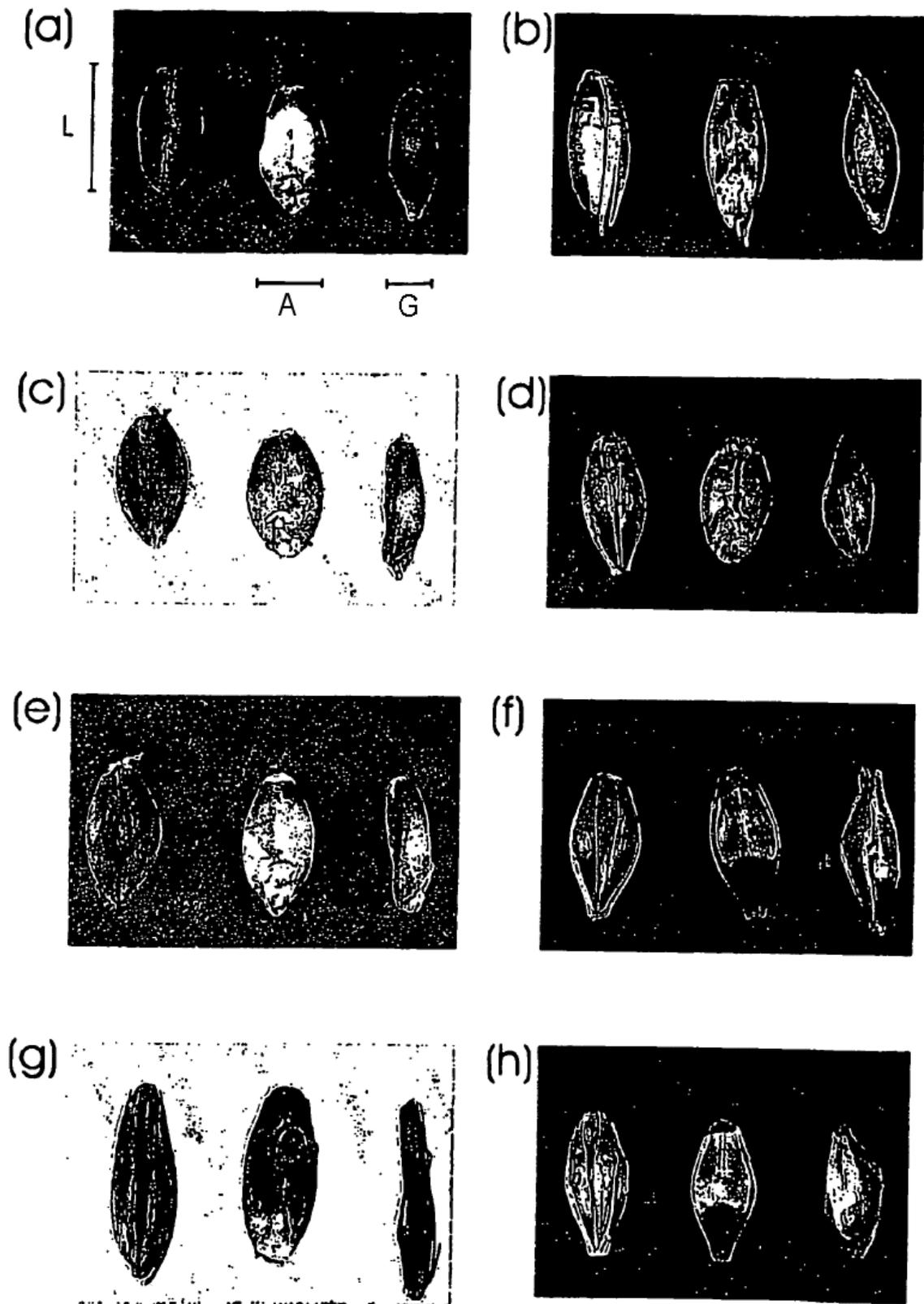


FIGURA 2

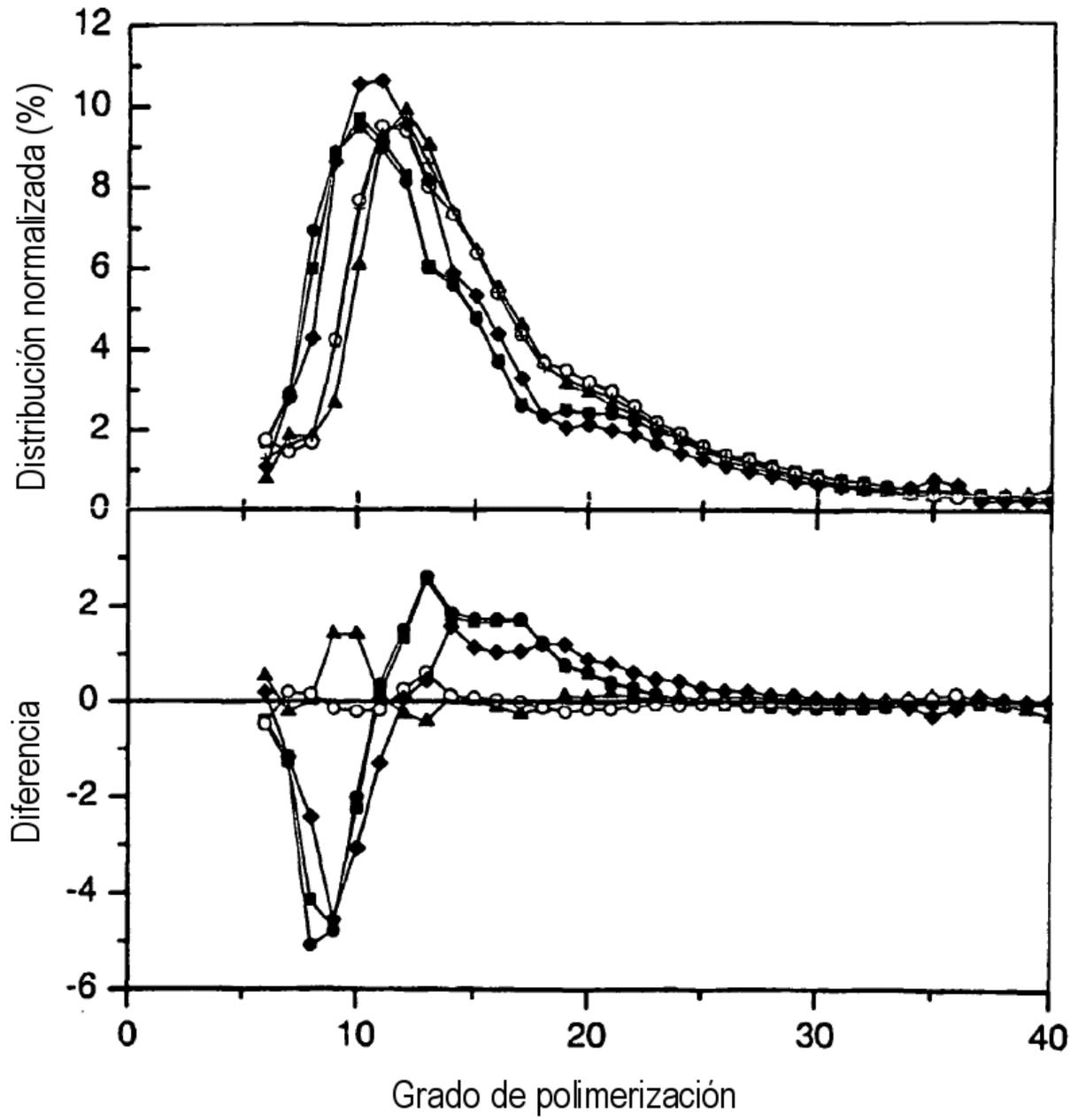


FIGURA 3

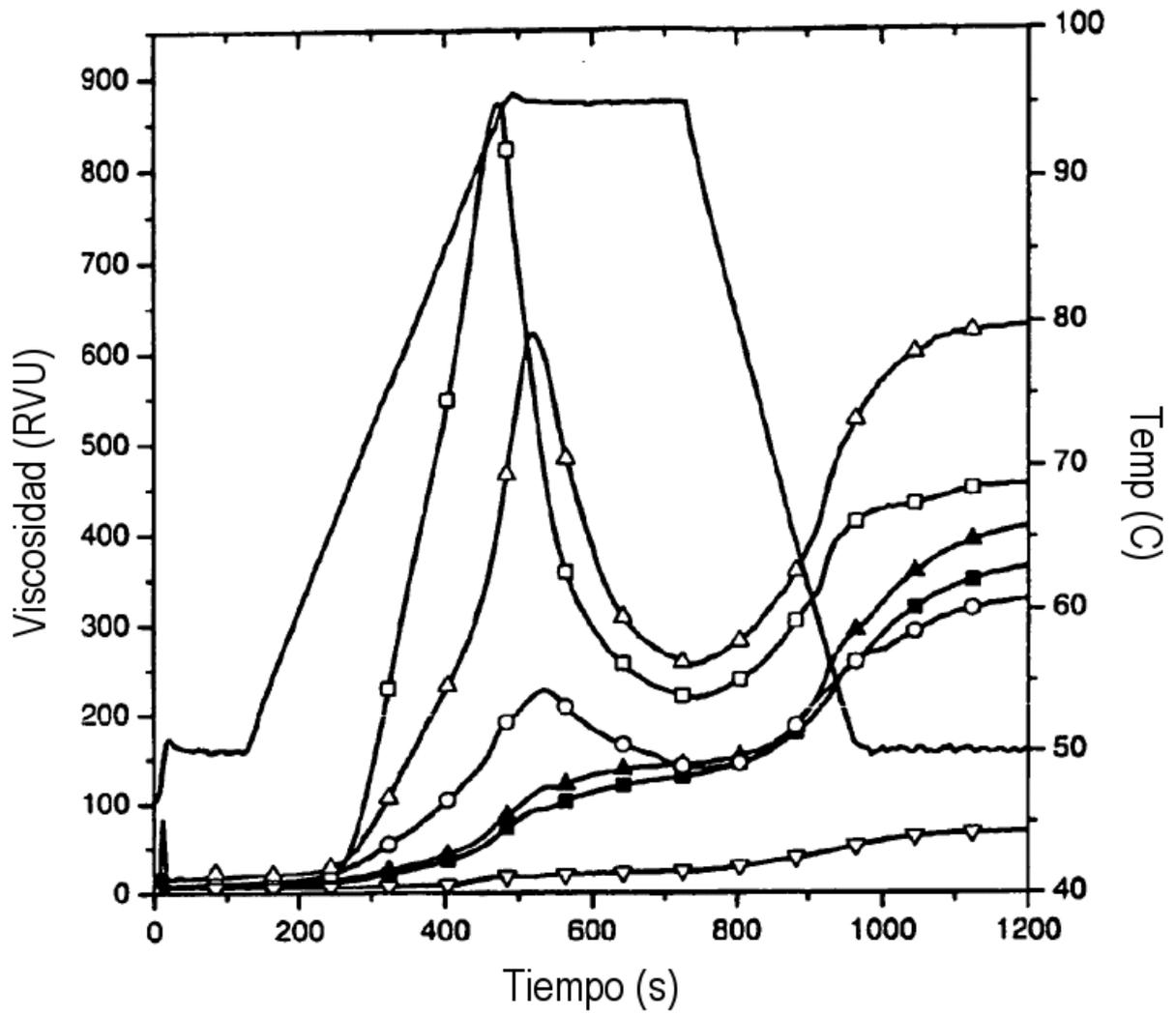
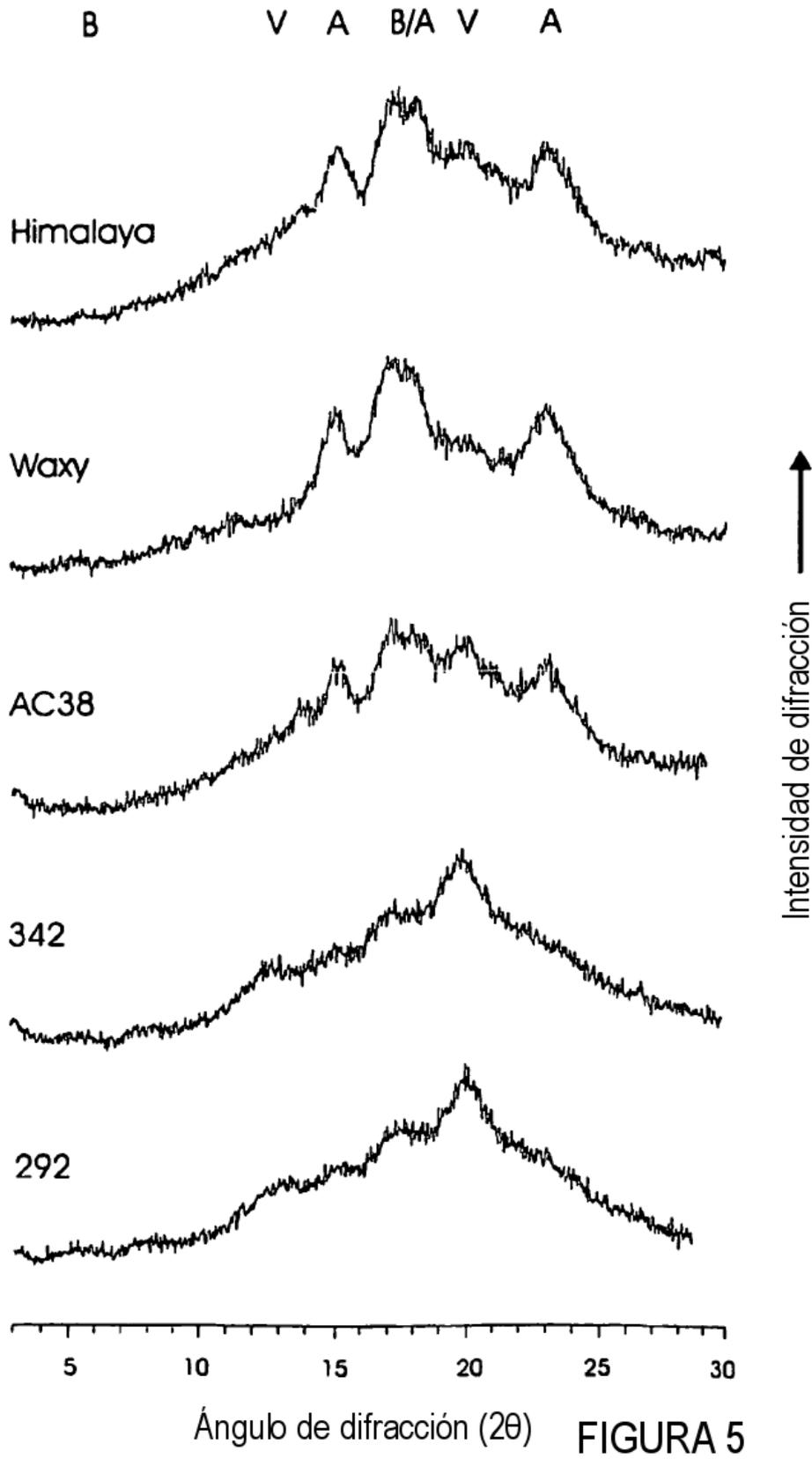


FIGURA 4



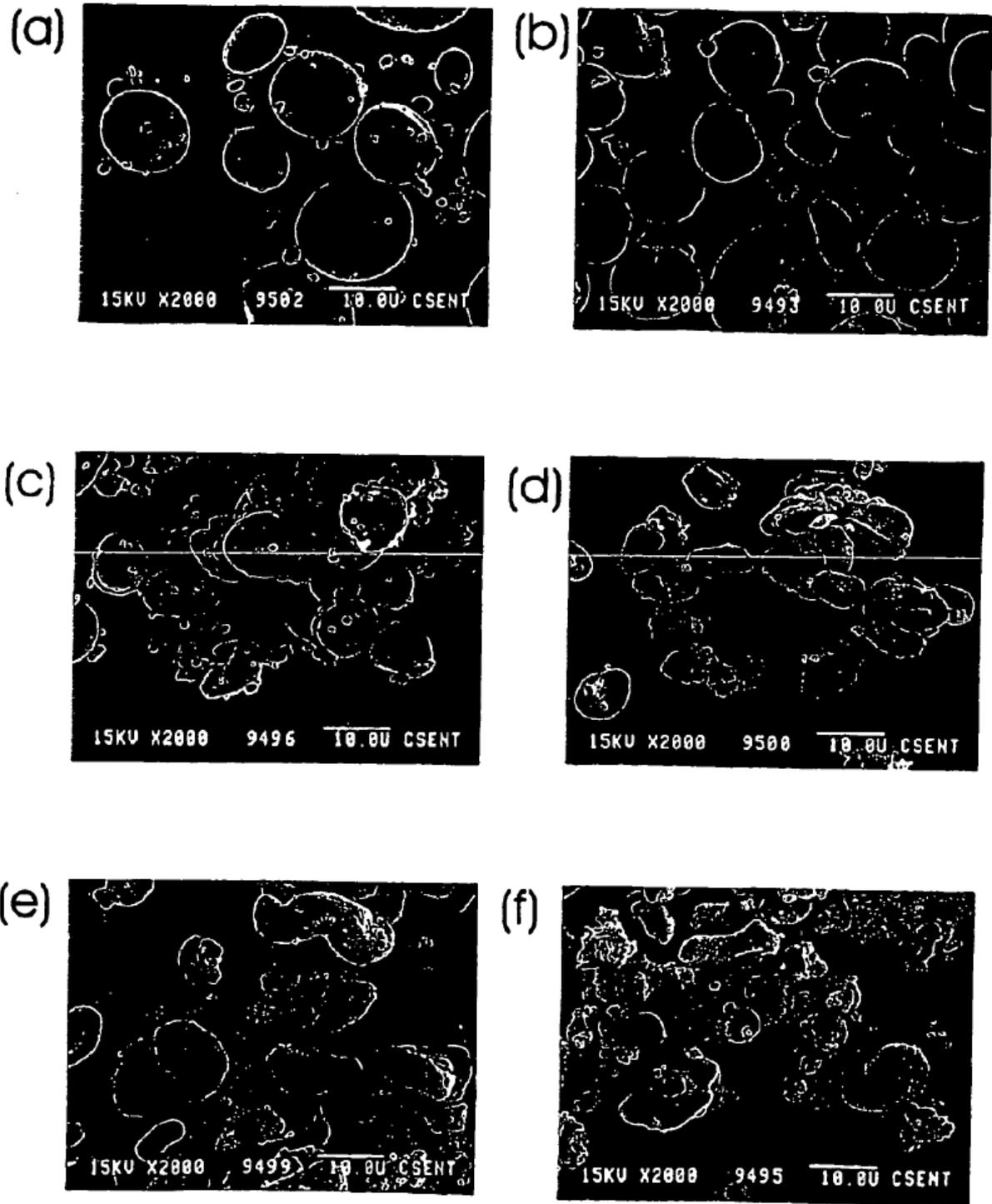


FIGURA 6

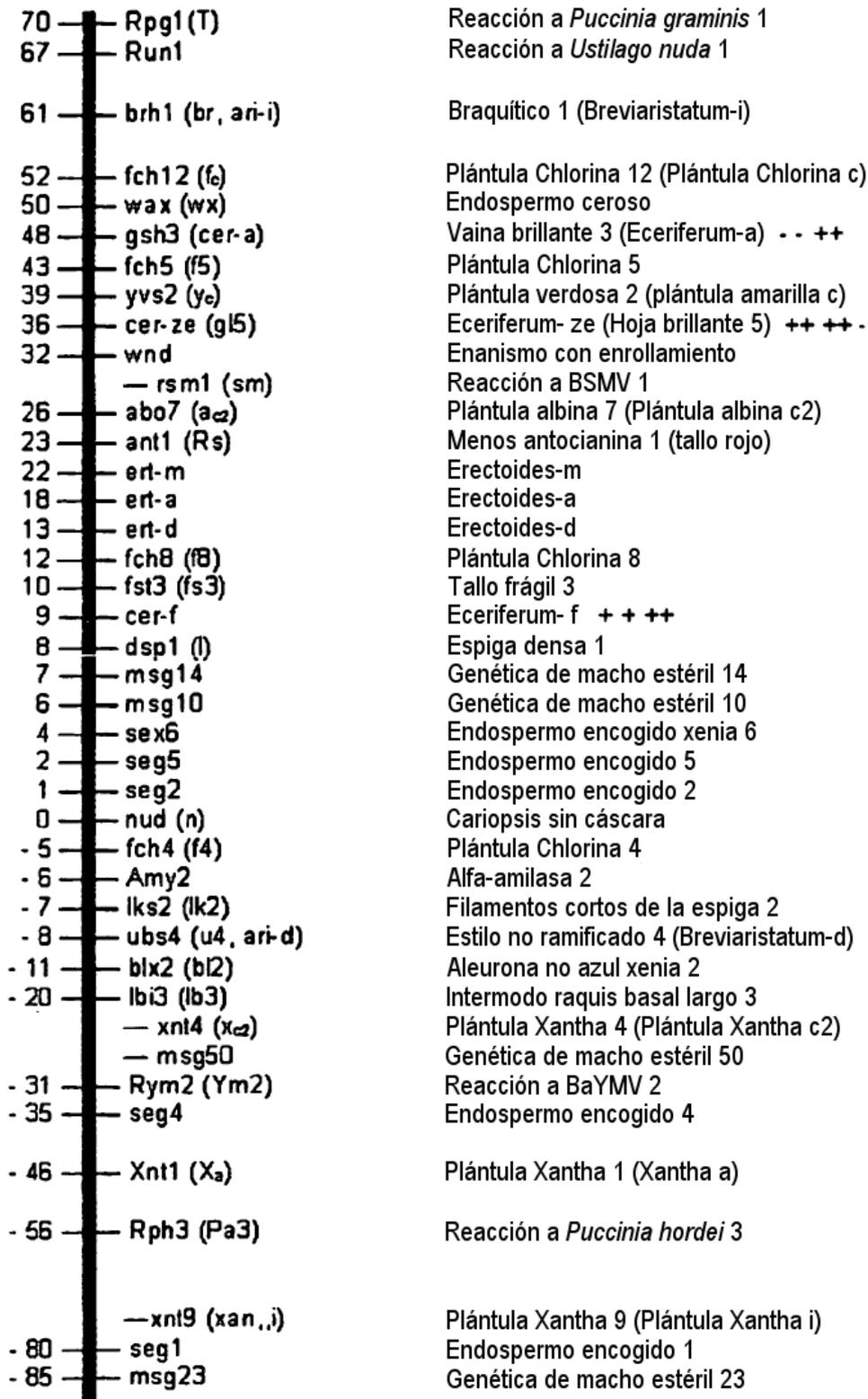


FIGURA 7

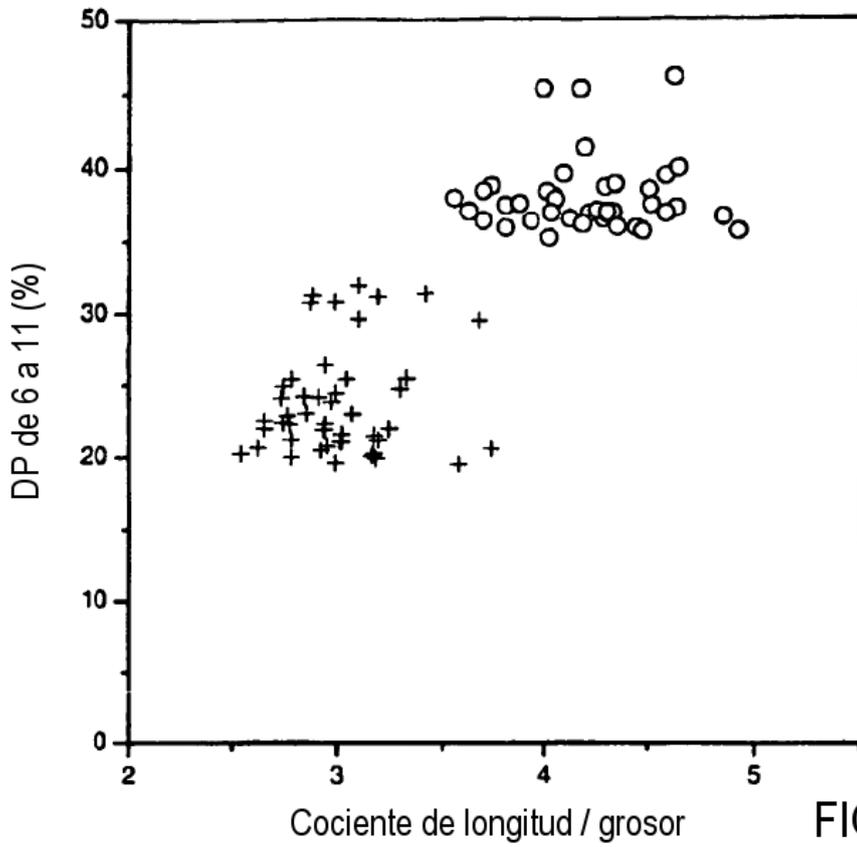
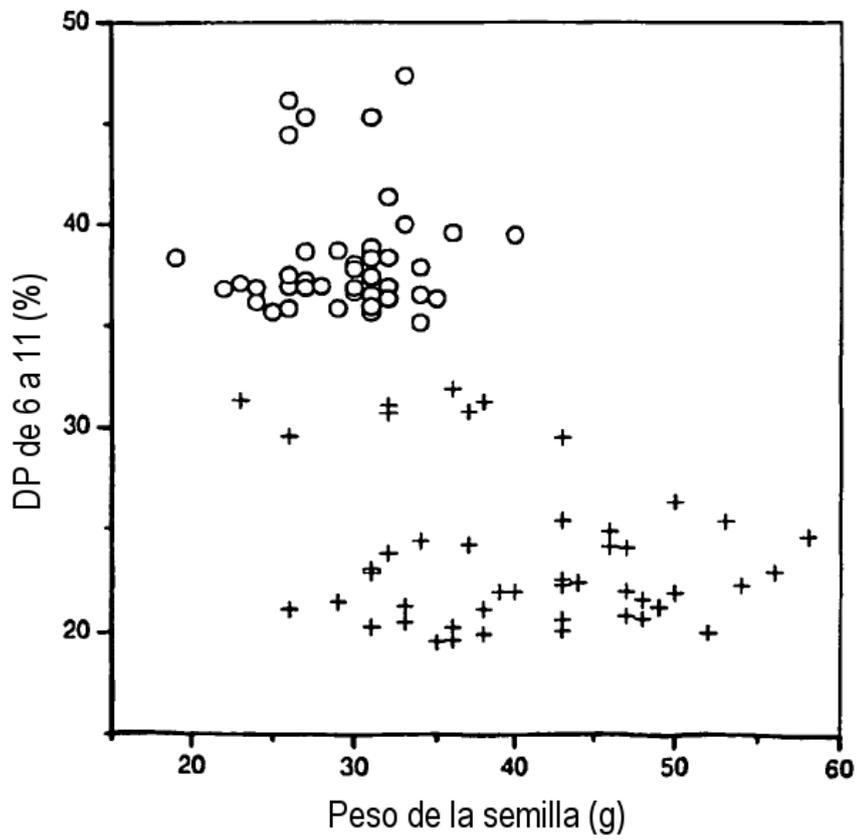


FIGURA 8



Secuencia del ADNc de SSII de cebada **FIGURA 9**

```

1 CCTCGAGGTG CGTTTACCCC ACACAGAGTA CACTCCAAC T CCAGTCCAAT
51 CCAGCCCAC T GCCGCTTCTG CCCGCCCATC GTACCGTCGC CCGCCCCGAT
101 CCCGCCCGCC GCCATGTCGT CGGCGGTCGC GTCCCCCGCG TCCTTCCTCG
151 CGCTCGCGTC CGCCTCGCCC GGGAGATCAT CACGGAGGAG GGGGAGGGTG
201 GGC GCGTCGC CAACCCGCGC TGGGGCCGGC AGGCTGCAAT GGC GCGCGTC
251 GCCGCTGCAG CGCACGGCTC GCGACGGAGC GGTGGCCGCG CGCGCCGCCG
301 GGATCGACGA CGCCGCGCCC GGTAGGCAGC CCCGCGCTCG CCGCTATGGC
351 GCCGCCACCA AGGTCGCGGA TCCC GTCAAG ACGCTCGATC GCGACGCCGC
401 GGAAGGTGGT GGGCCGTCCC CGCCGGCACC GAGGCAGGAC GCCGCCCGTC
451 TGCCGAGTAA GAACGGCACG CTGATCAACG GTGAGAACA ACCTACCGGC
501 GCGCGTGGCG CGACTAAAGA CAGCGGGCTT GCCACACCCG CACCGCGCC
551 CCATCTGTCA ATCCAAAACA GAGTACCGGT GAACCGTGAA AACAAACATA
601 AGGTCGCCCTC GCCGCCGACC AGCATAGTGG ATGTCGCGTC TCCGGGTTC
651 GCAGCTAACA TTTCCATCAG TAACAAGGTG CCGCCGTCCG TTGTCCCAGC
701 CAAGAAGACG CCGCCGTCTG CCGTTTTCCC GGCCAAGAAG ACGCTGCCGT
751 CGTCCGGCTC AAATTTGTG TCCTCGGCCT CTGCTCCAG GCTGGACACT
801 GTCAGCGATG TGAAC TTGC ACAGAAGAAG GATGCGCTGA TTGTCAAAGA
851 AGCTCCAAA CCAAAGGCTC TTTCCGCCCC TGCAGCCCC GCTGTACAAG
901 AAGACCTTTG GGATTTCAAG AAATACATG GTTTCGAGGA GCCCGTGGAG
951 GCCAAGGATG ATGGCTCGGC TGTGTCAGAT GATGCGGGTT CCTTGAACA
1001 TCACCAGAAT CATGATCCG GACCTTTGGC AGGGGAGAAC GTCATGAACG
1051 TGGTCGTCTG TGCTGCTGAA TGTTCTCCCT GGTGCAAAAC AGGTGGTCTT
1101 GGAGATGTTG CGGGTGCTTT GCCCAAGGCT TTGGCTAAGA GAGGACATCC
1151 TGTTATGGTT GTGGTACCAA GGTATGGGA CTATGAGGAA GCCTACGATG
1201 TCGGAGTCCG AAAATACTAC AAGGCTGCTG GACAGGATAT GGAAGTGAAT
1251 TATTTCATG CTTATATCGA TGGAGTGGAT TTTGTGTTCA TTGACGCTCC
1301 TCTCTTCCGA CACCGTCAGC AAGACATTA TGGGGCAGC AGACAGAAA
1351 TTATGAAGCG CATGATTTG TTCTGCAAGG CCGCTGTCGA GGTTCTTGG
1401 CACGTTCCAT GCGGCGGTGT CCCTTACGGG GATGGAATC TGGTCTTCAT
1451 TGCAAATGAT TGGCACACGG CACTCCTGCC TGTCTATCTG AAAGCATATT
1501 ACAGGGACCA TGGTTTGATG CAATACAGTC GCTCCGTTAT GGTGATACAT
1551 AACATCGCTC ACCAGGGCCG TGGCCCTGTA GATGAATTCC CGTTCACCGA
1601 GTTGCCTGAG CACTACCTGG AACACTTCAG ACTGTACGAC CCCGTCGGCG
1651 GTGAGCACGC CAACTACTTC GCCGCCGGCC TGAAGATGGC GGACCAGGTT
1701 GTCGTCGTGA GCCCCGGTA CCTGTGGGAG CTGAAGACGG TGGAGGGCGG
1751 CTGGGGGCTT CACGACATCA TACGGCAGAA CGACTGGAAG ACCCGCGGCA
1801 TCGTGAACGG CATCGACAAC ATGGAGTGA ACCCTGAGGT GGACGTCCAC
1851 CTGAAGTCGG ACGGCTACAC CAACTTCTCC CTGAAGACGC TGGACTCCGG
1901 CAAGCGGACG TGCAAGGAGG CCCTGCAGCG CGAGCTGGGG CTGCAGGTCC
1951 GCGGCGACGT GCCGCTGCTC GGGTTCATCG GCGGCTGGA CGGGCAGAAG
2001 GCGTGGAGA TCATCGCGGA CGCGATGCC TGGATCGTGA GCCAGGACGT
2051 GCAGCTGGTG ATGCTGGGCA CGGGGCGCCA CGACCTGGAG AGCATGCTGC
2101 AGCAC TTCGA GCGGGAGCAC CACGACAAGG TCGCGGGTG GGTGGGGTTC
2151 TCCGTGCGCC TGGCGCACCG GATCACGGCG GCGCGCGACG CGCTCCTCAT
2201 GCCCTCCCGG TTCGAGCCGT GCGGGCTGAA CCAGCTCTAC GCGATGGCCT
2251 ACGGCACCGT CCCCCTCGTG CACGCCGTCG GCGGCTTGAG GGATACCGTG
2301 CCGCCGTTCTG ACCCTTCAA CCACTCCGGG CTCGGGTGGA CGTTCGACCG
2351 CGCCGAGGCG CACAAGCTGA TCGAGGCGCT CCGGCACTGC CTCCGCACCT
2401 ACCGGGACCA CAAGGAGAGC TGGAGGGGCC TCCAGGAGCG CGGCATGTCC
2451 CAGGACTTCA GCTGGGAACA TGCCGCCAAG CTCTACGAGG ACGTCCCTCGT
2501 CCAGGCCAAG TACCAGTGGT GAACGCTGCT ACCCGGTCCA GCCCCGCATG
2551 CGTGCATGAG AGGATGGAAA TGCCGATTGC GCACTTGCAG ATTTGGCGCA
2601 CGCAGGAACG TGCCGTCCTT CTTGATGAGA ACGCCGGCAT CCGCGAGGTT
2651 GAGACGCTGA TTCCGATCTG GTCCGTCGCA GAGTAGAGTG AAACGCTCCT
2701 TGTTGCAGGT ATATGGGAAT GTTTTPTTTC CTTTTTTTTT GCGAGGGAGC
2751 TATATGGGAA TGTTAACTTG GTATTGTAAT GTGGTATGCT GTGTGCATTA
2801 TTACATCGGT TGTTGTTGCT TATTCTTGCT AGCTAAGTCG GAGGCCAAGA
    
```

2851 GCGAAAGCTA GTCACATGT CTGATGTATG CAAGTGACAT GGTGGTTTG
2901 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

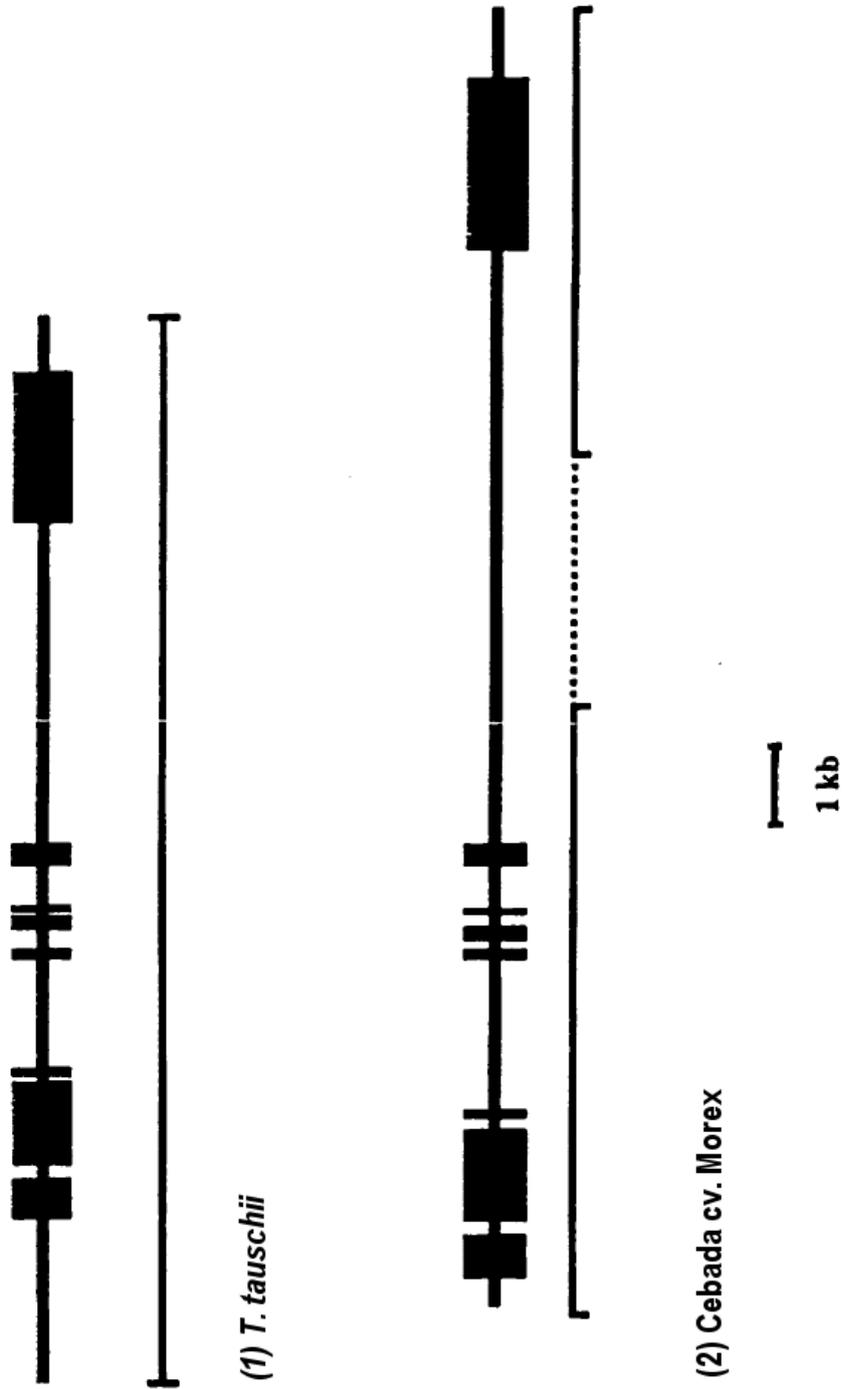


FIGURA 10

Comparación de secuencias de ADNc

	1				50
MK6827	-----GTG	CGTTTACCCC	ACACAGAGTA	CACTCCAACCT	CCAGTCCAGT
MOREX	-----GTG	CGTTTACCCC	ACACAGAGTA	CACTCCAACCT	CCAGTCCAGT
292	-----GTG	CGTTTACCCC	ACACAGAGTA	CACTCCAACCT	CCAGTCCAGT
HIMALAYA	CCTCGAGGTG	CGTTTACCCC	ACACAGAGTA	CACTCCAACCT	CCAGTCCAAT
	51				100
MK6827	CCAGCCCACT	GCCGCTTCTG	CCCGCCCATC	GTACCGTCGC	CCGCCCCGAT
MOREX	CCAGCCCACT	GCCGCTTCTG	CCCGCCCATC	GTACCGTCGC	CCGCCCCGAT
292	CCAGCCCACT	GCCGCTTCTG	CCCGCCCATC	GTACCGTCGC	CCGCCCCGAT
HIMALAYA	CCAGCCCACT	GCCGCTTCTG	CCCGCCCATC	GTACCGTCGC	CCGCCCCGAT
	101	*** Codón de inicio			150
MK6827	CCCGGCCGCC	GCCATGTCGT	CGGCGGTGCG	GTCCCCCGCG	TCCTTCCTCG
MOREX	CCCGGCCGCC	GCCATGTCGT	CGGCGGTGCG	GTCCCCCGCG	TCCTTCCTCG
292	CCCGGCCGCC	GCCATGTCGT	CGGCGGTGCG	GTCCCCCGCG	TCCTTCCTCG
HIMALAYA	CCCGGCCGCC	GCCATGTCGT	CGGCGGTGCG	GTCCCCCGCG	TCCTTCCTCG
	151				200
MK6827	CGCTCGCGTC	CGCCTCGCCC	GGGAGATCAT	CACGGAGGAG	GGCGAGGGTG
MOREX	CGCTCGCGTC	CGCCTCGCCC	GGGAGATCAT	CACGGAGGAG	GGCGAGGGTG
292	CGCTCGCGTC	CGCCTCGCCC	GGGAGATCAT	CACGGAGGAG	GGCGAGGGTG
HIMALAYA	CGCTCGCGTC	CGCCTCGCCC	GGGAGATCAT	CACGGAGGAG	GGCGAGGGTG
	201			#	
MK6827	GGCGCGTCGC	CAACCCGCGC	TGGGGCCGGC	AGGCTGCAAT	GACGGCCGTC
MOREX	GGCGCGTCGC	CAACCCGCGC	TGGGGCCGGC	AGGCTGCAAT	GGCGGCCGTC
292	GGCGCGTCGC	CAACCCGCGC	TGGGGCCGGC	AGGCTGCAAT	GGCGGCCGTC
HIMALAYA	GGCGCGTCGC	CAACCCGCGC	TGGGGCCGGC	AGGCTGCAAT	GGCGGCCGTC
	251				300
MK6827	GCCGCTGCAG	CGCACGGCTC	GCGACGGAGC	GGTGGCCGCG	CGCGCCGCCG
MOREX	GCCGCTGCAG	CGCACGGCTC	GCGACGGAGC	GGTGGCCGCG	CGCGCCGCCG
292	GCCGCTGCAG	CGCACGGCTC	GCGACGGAGC	GGTGGCCGCG	CGCGCCGCCG
HIMALAYA	GCCGCTGCAG	CGCACGGCTC	GCGACGGAGC	GGTGGCCGCG	CGCGCCGCCG
	301				350
MK6827	GGATCGACGA	CGCCCGCCCC	GGTAGGCAGC	CCCGCGCTCG	CCGCTATGGC
MOREX	GGATCGACGA	CGCCCGCCCC	GGTAGGCAGC	CCCGCGCTCG	CCGCTATGGC
292	GGATCGACGA	CGCCCGCCCC	GGTAGGCAGC	CCCGCGCTCG	CCGCTATGGC
HIMALAYA	GGATCGACGA	CGCCCGCCCC	GGTAGGCAGC	CCCGCGCTCG	CCGCTATGGC
	351				400
MK6827	GCCGCCACCA	AGGTCGCGGA	TCCCGTCAAG	ACGCTCGATC	GCGACGCCGC
MOREX	GCCGCCACCA	AGGTCGCGGA	TCCCGTCAAG	ACGCTCGATC	GCGACGCCGC
292	GCCGCCACCA	AGGTCGCGGA	TCCCGTCAAG	ACGCTCGATC	GCGACGCCGC
HIMALAYA	GCCGCCACCA	AGGTCGCGGA	TCCCGTCAAG	ACGCTCGATC	GCGACGCCGC
	401				450
MK6827	GGAAGGTGGT	GGGCCGTCCC	CGCCGGCACC	GAGGCAGGAC	GCCGCCCGTC
MOREX	GGAAGGTGGT	GGGCCGTCCC	CGCCGGCACC	GAGGCAGGAC	GCCGCCCGTC
292	GGAAGGTGGT	GGGCCGTCCC	CGCCGGCACC	GAGGCAGGAC	GCCGCCCGTC
HIMALAYA	GGAAGGTGGT	GGGCCGTCCC	CGCCGGCACC	GAGGCAGGAC	GCCGCCCGTC
	451				500
MK6827	TGCCGAGTAA	GAACGGCACG	CTGATCAACG	GTGAGAACAA	ACCTACCGGC
MOREX	TGCCGAGTAA	GAACGGCACG	CTGATCAACG	GTGAGAACAA	ACCTACCGGC
292	TGCCGAGTAA	GAACGGCACG	CTGATCAACG	GTGAGAACAA	ACCTACCGGC
HIMALAYA	TGCCGAGTAA	GAACGGCACG	CTGATCAACG	GTGAGAACAA	ACCTACCGGC

FIGURA 11

	501				550
MK6827	GGCGGTGGCG	CGACTAAAGA	CAGCGGGCTG	CCCACACCCG	CACGCGCGCC
MOREX	GGCGGTGGCG	CGACTAAAGA	CAGCGGGCTG	CCCACACCCG	CACGCGCGCC
292	GGCGGTGGCG	CGACTAAAGA	CAGCGGGCTG	CCCACACCCG	CACGCGCGCC
HIMALAYA	GGCGGTGGCG	CGACTAAAGA	CAGCGGGCTT	GCCACACCCG	CACGCGCGCC
	551				600
MK6827	CCATCTGTCA	ATCCAGAACA	GAGTACCGGT	GAACGGTGAA	AACAAACATA
MOREX	CCATCTGTCA	ATCCAGAACA	GAGTACCGGT	GAACGGTGAA	AACAAACATA
292	CCATCTGTCA	ATCCAGAACA	GAGTACCGGT	GAACGGTGAA	AACAAACATA
HIMALAYA	CCATCTGTCA	ATCCAAAACA	GAGTACCGGT	GAACGGTGAA	AACAAACATA
	601				650
MK6827	AGGTCGCCTC	GCCGCCGACC	AGCATAGTGG	ATGTCGCGTC	TCCGGGTTC
MOREX	AGGTCGCCTC	GCCGCCGACC	AGCATAGTGG	ATGTCGCGTC	TCCGGGTTC
292	AGGTCGCCTC	GCCGCCGACC	AGCATAGTGG	ATGTCGCGTC	TCCGGGTTC
HIMALAYA	AGGTCGCCTC	GCCGCCGACC	AGCATAGTGG	ATGTCGCGTC	TCCGGGTTC
	651				700
MK6827	GCAGCTAACA	TTTCCATCAG	TAACAAGGTG	CCGCCGTCCG	TTGTCCCAGC
MOREX	GCAGCTAACA	TTTCCATCAG	TAACAAGGTG	CCGCCGTCCG	TTGTCCCAGC
292	GCAGCCAACA	TTTCCATCAG	TAACAAGGTG	CCGCCGTCCG	TTGTCCCAGC
HIMALAYA	GCAGCTAACA	TTTCCATCAG	TAACAAGGTG	CCGCCGTCCG	TTGTCCCAGC
	701				750
MK6827	CAAGAAGACG	CCGCCGTCCG	CCGTTTTC	GGCCAAGAAG	GCGCCGCCG'
MOREX	CAAGAAGACG	CCGCCGTCCG	CCGTTTTC	GGCCAAGAAG	GCGCCGCCGT
292	CAAGAAGACG	CCGCCGTCCG	CCGTTTTC	GGCCAAGAAG	GCGCCGCCGT
HIMALAYA	CAAGAAGACG	CCGCCGTCCG	CCGTTTTC	GGCCAAGAAG
	751				800
MK6827	CGTCCGTTGT	CCCGGCCAAG	AAGACGCTGC	CGTCGTCCGG	CTCAAATTTT
MOREX	CGTCCGTTGT	CCCGGCCAAG	AAGACGCTGC	CGTCGTCCGG	CTCAAATTTT
292	CGTCCGTTGT	CCCGGCCAAG	AAGACGCTGC	CGTCGTCCGG	CTCAAATTTT
HIMALAYAACGCTGC	CGTCGTCCGG	CTCAAATTTT
	801				850
MK6827	GTGTCCCTCGG	CCTCTGCTCC	CAGGCTGGAC	ACTGTCAGCG	ATGTGGAAC
MOREX	GTGTCCCTCGG	CCTCTGCTCC	CAGGCTGGAC	ACTGTCAGCG	ATGTGGAAC
292	GTGTCCCTCGG	CCTCTGCTCC	CAGGCTGGAC	ACTGTCAGCG	ATGTGGAAC
HIMALAYA	GTGTCCCTCGG	CCTCTGCTCC	CAGGCTGGAC	ACTGTCAGCG	ATGTGGAAC
	851				900
MK6827	TGCACAGAAG	AAGGATGCGC	TGATTGTCAA	AGAAGCTCCA	AAACCAAAGG
MOREX	TGCACAGAAG	AAGGATGCGC	TGATTGTCAA	AGAAGCTCCA	AAACCAAAGG
292	TGCACAGAAG	AAGGATGCGC	TGATTGTCAA	AGAAGCTCCA	AAACCAAAGG
HIMALAYA	TGCACAGAAG	AAGGATGCGC	TGATTGTCAA	AGAAGCTCCA	AAACCAAAGG
	901				950
MK6827	CTCTTTCGGC	CCCTGCAGCC	CCCCTGTAC	AAGAAGACCT	TTGGGATTTT
MOREX	CTCTTTCGGC	CCCTGCAGCC	CCCCTGTAC	AAGAAGACCT	TTGGGATTTT
292	CTCTTTCGGC	CCCTGCAGCC	CCCCTGTAC	AAGAAGACCT	TTGGGATTTT
HIMALAYA	CTCTTTCGGC	CCCTGCAGCC	CCCCTGTAC	AAGAAGACCT	TTGGGATTTT
	951				1000
MK6827	AAGAAATACA	TTGGTTTCGA	GGAGCCCGTG	GAGGCCAAGG	ATGATGGCTC
MOREX	AAGAAATACA	TTGGTTTCGA	GGAGCCCGTG	GAGGCCAAGG	ATGATGGCTC
292	AAGAAATACA	TTGGTTTCGA	GGAGCCCGTG	GAGGCCAAGG	ATGATGGCTC
HIMALAYA	AAGAAATACA	TTGGTTTCGA	GGAGCCCGTG	GAGGCCAAGG	ATGATGGCTC

	1001				1050
MK6827	GGCTGTTGCA	GATGATGCGG	GTTCCTTTGA	ACATCACCAG	AATCATGATT
MOREX	GGCTGTTGCA	GATGATGCGG	GTTCCTTTGA	ACATCACCAG	AATCATGATT
292	GGCTGTTGCA	GATGATGCGG	GTTCCTTTGA	ACATCACCAG	AATCATGATT
HIMALAYA	GGCTGTTGCA	GATGATGCGG	GTTCCTTTGA	ACATCACCAG	AATCATGATT
	1051				1100
MK6827	CCGGACCTTT	GGCAGGGGAG	AACGTCATGA	ACGTGGTCGT	CGTTGCTGCT
MOREX	CCGGACCTTT	GGCAGGGGAG	AACGTCATGA	ACGTGGTCGT	CGTTGCTGCT
292	CCGGACCTTT	GGCAGGGGAG	AACGTCATGA	ACGTGGTCGT	CGTTGCTGCT
HIMALAYA	CCGGACCTTT	GGCAGGGGAG	AACGTCATGA	ACGTGGTCGT	CGTTGCTGCT
	1101				1150
MK6827	GAATGTTCTC	CCTGGTGCAA	AACAGGTGGT	CTTGGAGATA	TTGCGGGTGC
MOREX	GAATGTTCTC	CCTGGTGCAA	AACAGGTGGT	CTTGGAGATG	TTGCGGGTGC
292	GAATGTTCTC	CCTGGTGCAA	AACAGGTGGT	CTTGGAGATG	TTGCGGGTGC
HIMALAYA	GAATGTTCTC	CCTGGTGCAA	AACAGGTGGT	CTTGGAGATG	TTGCGGGTGC
	1151				1200
MK6827	TTTGCCCAAG	GCTTTGGCTA	AGAGAGGACA	TCGTGTTATG	GTTGTGGTAC
MOREX	TTTGCCCAAG	GCTTTGGCTA	AGAGAGGACA	TCGTGTTATG	GTTGTGGTAC
292	TTTGCCCAAG	GCTTTGGCTA	AGAGAGGACA	TCGTGTTATG	GTTGTGGTAC
HIMALAYA	TTTGCCCAAG	GCTTTGGCTA	AGAGAGGACA	TCGTGTTATG	GTTGTGGTAC
	1201				1250
MK6827	CAAGGTATGG	GGACTATGAG	GAAGCCTACG	ATGTCGGAGT	CCGAAAATAC
MOREX	CAAGGTATGG	GGACTATGAG	GAAGCCTACG	ATGTCGGAGT	CCGAAAATAC
292	CAAGGTATGG	GGACTATGAG	GAAGCCTACG	ATGTCGGAGT	CCGAAAATAC
HIMALAYA	CAAGGTATGG	GGACTATGAG	GAAGCCTACG	ATGTCGGAGT	CCGAAAATAC
	1251				1300
MK6827	TACAAGGCTG	CTGGACAGGA	TATGGAAGTG	AATTATTTC	ATGCTTATAT
MOREX	TACAAGGCTG	CTGGACAGGA	TATGGAAGTG	AATTATTTC	ATGCTTATAT
292	TACAAGGCTG	CTGGACAGGA	TATGGAAGTG	AATTATTTC	ATGCTTATAT
HIMALAYA	TACAAGGCTG	CTGGACAGGA	TATGGAAGTG	AATTATTTC	ATGCTTATAT
	1301				1350
MK6827	CGATGGAGTG	GATTTTG TGT	TCATTGACGC	TCCTCTCTTC	CGACACCGTC
MOREX	CGATGGAGTG	GATTTTG TGT	TCATTGACGC	TCCTCTCTTC	CGACACCGTC
292	CGATGGAGTG	GATTTTG TGT	TCATTGACGC	TCCTCTCTTC	CGACACCGTC
HIMALAYA	CGATGGAGTG	GATTTTG TGT	TCATTGACGC	TCCTCTCTTC	CGACACCGTC
	1351				1400
MK6827	AGCAAGACAT	TTATGGGGGC	AGCAGACAGG	AAATTATGAA	GCGCATGATT
MOREX	AGCAAGACAT	TTATGGGGGC	AGCAGACAGG	AAATTATGAA	GCGCATGATT
292	AGCAAGACAT	TTATGGGGGC	AGCAGACAGG	AAATTATGAA	GCGCATGATT
HIMALAYA	AGCAAGACAT	TTATGGGGGC	AGCAGACAGG	AAATTATGAA	GCGCATGATT
	1401				1450
MK6827	TTGTTCTGCA	AGGCCGCTGT	CGAGGTTCC	TGGCACGTT	CATGCGGCGG
MOREX	TTGTTCTGCA	AGGCCGCTGT	CGAGGTTCC	TGGCACGTT	CATGCGGCGG
292	TTGTTCTGCA	AGGCCGCTGT	CGAGGTTCC	TGGCACGTT	CATGCGGCGG
HIMALAYA	TTGTTCTGCA	AGGCCGCTGT	CGAGGTTCC	TGGCACGTT	CATGCGGCGG
	1451				1500
MK6827	TGTCCCTTAC	GGGGATGGAA	ATCTGGTCTT	CATTGCAAAT	GATTGGCACA
MOREX	TGTCCCTTAC	GGGGATGGAA	ATCTGGTCTT	CATTGCAAAT	GATTGGCACA
292	TGTCCCTTAC	GGGGATGGAA	ATCTGGTCTT	CATTGCAAAT	GATTGGCACA
HIMALAYA	TGTCCCTTAC	GGGGATGGAA	ATCTGGTCTT	CATTGCAAAT	GATTGGCACA

	1501				1550
MK6827	CGGCACTCCT	GCCTGTCTAT	CTGAAAGCAT	ATTACAGGGA	CCATGGTTTG
MOREX	CGGCACTCCT	GCCTGTCTAT	CTGAAAGCAT	ATTACAGGGA	CCATGGTTTG
292	CGGCACTCCT	GCCTGTCTAT	CTGAAAGCAT	ATTACAGGGA	CCATGGTTTG
HIMALAYA	CGGCACTCCT	GCCTGTCTAT	CTGAAAGCAT	ATTACAGGGA	CCATGGTTTG
	1551				1600
MK6827	ATGCAATACA	GTCGCTCCGT	TATGGTGATA	CATAACATCG	CTCACCAGGG
MOREX	ATGCAATACA	GTCGCTCCGT	TATGGTGATA	CATAACATCG	CTCACCAGGG
292	ATGCAATACA	GTCGCTCCGT	TATGGTGATA	CATAACATCG	CTCACCAGGG
HIMALAYA	ATGCAATACA	GTCGCTCCGT	TATGGTGATA	CATAACATCG	CTCACCAGGG
	1601				1650
MK6827	CCGTGGCCCT	GTAGATGAAT	TCCCGTTCAC	CGAGTTGCCT	GAGCACTACC
MOREX	CCGTGGCCCT	GTAGATGAAT	TCCCGTTCAC	CGAGTTGCCT	GAGCACTACC
292	CCGTGGCCCT	GTAGATGAAT	TCCCGTTCAC	CGAGTTGCCT	GAGCACTACC
HIMALAYA	CCGTGGCCCT	GTAGATGAAT	TCCCGTTCAC	CGAGTTGCCT	GAGCACTACC
	1651				1700
MK6827	TGGAACACTT	CAGACTGTAC	GACCCCGTCG	GCGGTGAGCA	CGCCAACCTAC
MOREX	TGGAACACTT	CAGACTGTAC	GACCCCGTCG	GCGGTGAGCA	CGCCAACCTAC
292	TGGAACACTT	CAGACTGTAC	GACCCCGTCG	GCGGTGAGCA	CGCCAACCTAC
HIMALAYA	TGGAACACTT	CAGACTGTAC	GACCCCGTCG	GCGGTGAGCA	CGCCAACCTAC
	1701				1750
MK6827	TTCGCCGCCG	GCCTGAAGAT	GGCGGACCAG	GTTGTCTGTCG	TGAGCCCCGG
MOREX	TTCGCCGCCG	GCCTGAAGAT	GGCGGACCAG	GTTGTCTGTCG	TGAGCCCCGG
292	TTCGCCGCCG	GCCTGAAGAT	GGCGGACCAG	GTTGTCTGTCG	TGAGCCCCGG
HIMALAYA	TTCGCCGCCG	GCCTGAAGAT	GGCGGACCAG	GTTGTCTGTCG	TGAGCCCCGG
	1751				1800
MK6827	GTACCTGTGG	GAGCTGAAGA	CGGTGGAGGG	CGGCTGGGGG	CTTCACGACA
MOREX	GTACCTGTGG	GAGCTGAAGA	CGGTGGAGGG	CGGCTGGGGG	CTTCACGACA
292	GTACCTGTGG	GAGCTGAAGA	CGGTGGAGGG	CGGCTGGGGG	CTTCACGACA
HIMALAYA	GTACCTGTGG	GAGCTGAAGA	CGGTGGAGGG	CGGCTGGGGG	CTTCACGACA
	1801				1850
MK6827	TCATACGGCA	GAACGACTGG	AAGACCCGCG	GCATCGTGAA	CGGCATCGAC
MOREX	TCATACGGCA	GAACGACTGG	AAGACCCGCG	GCATCGTGAA	CGGCATCGAC
292	TCATACGGCA	GAACGACTGG	AAGACCCGCG	GCATCGTGAA	CGGCATCGAC
HIMALAYA	TCATACGGCA	GAACGACTGG	AAGACCCGCG	GCATCGTGAA	CGGCATCGAC
	1851	&		1900	
MK6827	AACATGGAGT	GGAACCCTGA	GGTGGACGTC	CACCTGAAGT	CGGACGGCTA
MOREX	AACATGGAGT	GGAACCCTGA	GGTGGACGTC	CACCTGAAGT	CGGACGGCTA
292	AACATGGAGT	GGAACCCTGA	GGTGGACGTC	CACCTGAAGT	CGGACGGCTA
HIMALAYA	AACATGGAGT	GGAACCCTGA	GGTGGACGTC	CACCTGAAGT	CGGACGGCTA
	1901				1950
MK6827	CACCAACTTC	TCCCTGAAGA	CGCTGGACTC	CGGCAAGCGG	CAGTGCAAGG
MOREX	CACCAACTTC	TCCCTGAAGA	CGCTGGACTC	CGGCAAGCGG	CAGTGCAAGG
292	CACCAACTTC	TCCCTGAAGA	CGCTGGACTC	CGGCAAGCGG	CAGTGCAAGG
HIMALAYA	CACCAACTTC	TCCCTGAAGA	CGCTGGACTC	CGGCAAGCGG	CAGTGCAAGG
	1951				2000
MK6827	AGGCCCTGCA	GCGCGAGCTG	GGGCTGCAGG	TCCGCGGCGA	CGTGCCGCTG
MOREX	AGGCCCTGCA	GCGCGAGCTG	GGGCTGCAGG	TCCGCGGCGA	CGTGCCGCTG
292	AGGCCCTGCA	GCGCGAGCTG	GGGCTGCAGG	TCCGCGGCGA	CGTGCCGCTG
HIMALAYA	AGGCCCTGCA	GCGCGAGCTG	GGGCTGCAGG	TCCGCGGCGA	CGTGCCGCTG

	2001				2050
MK6827	CTCGGGTTCA	TCGGGCGGCT	GGACGGGCAG	AAGGGCGTGG	AGATCATCGC
MOREX	CTCGGGTTCA	TCGGGCGGCT	GGACGGGCAG	AAGGGCGTGG	AGATCATCGC
292	CTCGGGTTCA	TCGGGCGGCT	GGACGGGCAG	AAGGGCGTGG	AGATCATCGC
HIMALAYA	CTCGGGTTCA	TCGGGCGGCT	GGACGGGCAG	AAGGGCGTGG	AGATCATCGC
	2051				2100
MK6827	GGACGCGATG	CCCTGGATCG	TGAGCCAGGA	CGTGCAGCTG	GTGATGCTGG
MOREX	GGACGCGATG	CCCTGGATCG	TGAGCCAGGA	CGTGCAGCTG	GTGATGCTGG
292	GGACGCGATG	CCCTGGATCG	TGAGCCAGGA	CGTGCAGCTG	GTGATGCTGG
HIMALAYA	GGACGCGATG	CCCTGGATCG	TGAGCCAGGA	CGTGCAGCTG	GTGATGCTGG
	2101				2150
MK6827	GCACGGGGCG	CCACGACCTG	GAGAGCATGC	TGCAGCACTT	CGACCGGGAG
MOREX	GCACGGGGCG	CCACGACCTG	GAGAGCATGC	TGCAGCACTT	CGACCGGGAG
292	GCACGGGGCG	CCACGACCTG	GAGAGCATGC	TGCAGCACTT	CGACCGGGAG
HIMALAYA	GCACGGGGCG	CCACGACCTG	GAGAGCATGC	TGCAGCACTT	CGACCGGGAG
	2151				2200
MK6827	CACCACGACA	AGGTGCGCGG	GTGGGTGGGG	TTCTCCGTGC	GCCTGGCGCA
MOREX	CACCACGACA	AGGTGCGCGG	GTGGGTGGGG	TTCTCCGTGC	GCCTGGCGCA
292	CACCACGACA	AGGTGCGCGG	GTGGGTGGGG	TTCTCCGTGC	GCCTGGCGCA
HIMALAYA	CACCACGACA	AGGTGCGCGG	GTGGGTGGGG	TTCTCCGTGC	GCCTGGCGCA
	2201				2250
MK6827	CCGGATCACG	GCGGGCGCCG	ACGCGCTCCT	CATGCCCTCC	CGGTTGAGC
MOREX	CCGGATCACG	GCGGGCGCCG	ACGCGCTCCT	CATGCCCTCC	CGGTTGAGC
292	CCGGATCACG	GCGGGCGCCG	ACGCGCTCCT	CATGCCCTCC	CGGTTGAGC
HIMALAYA	CCGGATCACG	GCGGGCGCCG	ACGCGCTCCT	CATGCCCTCC	CGGTTGAGC
	2251				2300
MK6827	CGTGCGGGCT	GAACCAGCTC	TACGCGATGG	CCTACGGCAC	CATCCCTGTC
MOREX	CGTGCGGGCT	GAACCAGCTC	TACGCGATGG	CCTACGGCAC	CATCCCTGTC
292	CGTGCGGGCT	GAACCAGCTC	TACGCGATGG	CCTACGGCAC	CATCCCTGTC
HIMALAYA	CGTGCGGGCT	GAACCAGCTC	TACGCGATGG	CCTACGGCAC	CGTCCCCGTC
	2301				2350
MK6827	GTGCACGCCG	TCGGCGGCCT	GAGGGATACC	GTGCCGCCGT	TCGACCCCTT
MOREX	GTGCACGCCG	TCGGCGGCCT	GAGGGATACC	GTGCCGCCGT	TCGACCCCTT
292	GTGCACGCCG	TCGGCGGCCT	GAGGGATACC	GTGCCGCCGT	TCGACCCCTT
HIMALAYA	GTGCACGCCG	TCGGCGGCCT	GAGGGATACC	GTGCCGCCGT	TCGACCCCTT
	2351				2400
MK6827	CAACCACTCC	GGGCTCGGGT	GGACGTTCGA	CCGCGCCGAG	GCGACAAGC
MOREX	CAACCACTCC	GGGCTCGGGT	GGACGTTCGA	CCGCGCCGAG	GCGACAAGC
292	CAACCACTCC	GGGCTCGGGT	GGACGTTCGA	CCGCGCCGAG	GCGACAAGC
HIMALAYA	CAACCACTCC	GGGCTCGGGT	GGACGTTCGA	CCGCGCCGAG	GCGACAAGC
	2401				2450
MK6827	TGATCGAGGC	GCTCGGGCAC	TGCTCCGCA	CCTACCGGGA	CCACAAGGAG
MOREX	TGATCGAGGC	GCTCGGGCAC	TGCTCCGCA	CCTACCGGGA	CCACAAGGAG
292	TGATCGAGGC	GCTCGGGCAC	TGCTCCGCA	CCTACCGGGA	CCACAAGGAG
HIMALAYA	TGATCGAGGC	GCTCGGGCAC	TGCTCCGCA	CCTACCGGGA	CCACAAGGAG
	2451				2500
MK6827	AGCTGGAGGG	GCCTCCAGGA	GCGGGCATG	TCGCAGGACT	TCAGCTGGGA
MOREX	AGCTGGAGGG	GCCTCCAGGA	GCGGGCATG	TCGCAGGACT	TCAGCTGGGA
292	AGCTGGAGGG	GCCTCCAGGA	GCGGGCATG	TCGCAGGACT	TCAGCTGGGA
HIMALAYA	AGCTGGAGGG	GCCTCCAGGA	GCGGGCATG	TCGCAGGACT	TCAGCTGGGA

	2501				2550
MK6827	ACATGCCGCC	AAGCTCTACG	AGGACGTCCT	CGTCCAGGCC	AAGTACCAGT
MOREX	ACATGCCGCC	AAGCTCTACG	AGGACGTCCT	CGTCCAGGCC	AAGTACCAGT
292	ACATGCCGCC	AAGCTCTACG	AGGACGTCCT	CGTCCAGGCC	AAGTACCAGT
HIMALAYA	ACATGCCGCC	AAGCTCTACG	AGGACGTCCT	CGTCCAGGCC	AAGTACCAGT
	2551				2600
	*** Codón de parada				
MK6827	GGTGAACGCT	GCTACCCGGT	CCAGCCCCGC	ATGCGTGCAT	GAGAGGATGG
MOREX	GGTGAACGCT	GCTACCCGGT	CCAGCCCCGC	ATGCGTGCAT	GAGAGGATGG
292	GGTGAACGCT	GCTACCCGGT	CCAGCCCCGC	ATGCGTGCAT	GAGAGGATGG
HIMALAYA	GGTGAACGCT	GCTACCCGGT	CCAGCCCCGC	ATGCGTGCAT	GAGAGGATGG
	2601				2650
MK6827	AAATGCGCAT	TGCGCACTTG	CAGATTTGGC	GCATGCAGGA	ACGTGCCGTC
MOREX	AAATGCGCAT	TGCGCACTTG	CAGATTTGGC	GCATGCAGGA	ACGTGCCGTC
292	AAATGCGCAT	TGCGCACTTG	CAGATTTGGC	GCACGCAGGA	ACGTGCCGTC
HIMALAYA	AAATGCGCAT	TGCGCACTTG	CAGATTTGGC	GCACGCAGGA	ACGTGCCGTC
	2651				2700
MK6827	CTTCTTGATG	GGAACGCCGG	CATCCGCGAG	GTTGAGACGC	TGATTCCGAT
MOREX	CTTCTTGATG	GGAACGCCGG	CATCCGCGAG	GTTGAGACGC	TGATTCCGAT
292	CTTCTTGATG	AGAACGCCGG	CATCCGCGAG	GTTGAGACGC	TGATTCCGAT
HIMALAYA	CTTCTTGATG	AGAACGCCGG	CATCCGCGAG	GTTGAGACGC	TGATTCCGAT
	2701				2750
MK6827	CTGGTCCGTC	GCAGAGTAGA	GTGAAACGCT	CCTTGTTGCA	GGTATATGGG
MOREX	CTGGTCCGTC	GCAGAGTAGA	GTGAAACGCT	CCTTGTTGCA	GGTATATGGG
292	CTGGTCCGTC	GCAGAGTAGA	GTGAAACGCT	CCTTGTTGCA	GGTATATGGG
HIMALAYA	CTGGTCCGTC	GCAGAGTAGA	GTGAAACGCT	CCTTGTTGCA	GGTATATGGG
	2751				2800
MK6827	AATGTTTTTT	TTTTCC . TTT	TTTTTTTTGC	GAGGGAGGTA	TATGGGAATG
MOREX	AATGTTTTTT	TTTTCCTTTT	TTTTTTTTGC	GAGGGAGGTA	TATGGGAATG
292	AATGTTTTTT	TT . . CC . . . T	TTTTTTTTGC	GAGGGAGGTA	TATGGGAATG
HIMALAYA	AATGTTTTTT	TT . . CC . . . T	TTTTTTTTGC	GAGGGAGGTA	TATGGGAATG
	2801				2850
MK6827	TTAACTTGGT	ATTGTAATGT	GGTATGCTGT	GTGCATTATT	ACATCGGTTG
MOREX	TTAACTTGGT	ATTGTAATGT	GGTATGCTGT	GTGCATTATT	ACATCGGTTG
292	TTAACTTGGT	ATTGTAATGT	GGTATGCTGT	GTGCATTATT	ACATCGGTTG
HIMALAYA	TTAACTTGGT	ATTGTAATGT	GGTATGCTGT	GTGCATTATT	ACATCGGTTG
	2851				2900
MK6827	TTGTTGCTTA	TTCTTGCTAG	CTAAGTCGGA	GGCCAAGAGC	GAAAGCTAGC
MOREX	TTGTTGCTTA	TTCTTGCTAG	CTAAGTCGGA	GGCCAAGAGC	GAAAGCTAGC
292	TTGTTGCTTA	TTCTTGCTAG	CTAAGTCGGA	GGCCAAGAGC	GAAAGCTAGC
HIMALAYA	TTGTTGCTTA	TTCTTGCTAG	CTAAGTCGGA	GGCCAAGAGC	GAAAGCTAGC
	2901				2950
MK6827	TCACATGTCT	GATGTATGCA	AGTGACATGG	TTGGTTTGGT	TGTGCAGTGC
MOREX	TCACATGTCT	GATGTATGCA	AGTGACATGG	TTGGTTTGGT	TGTGCAGTGC
292	TCACATGTCT	GATGTATGCA	AGTGACATGG	TTGGTTTGGT	TGTGCAGTGC
HIMALAYA	TCACATGTCT	GATGTATGCA	AGTGACATGG	TTGGTTTGGT	TGTGCAGTGC
	2951				
MK6827	AAACGGCA				
MOREX	AAACGGCA				
292	AAACGGCA				
HIMALAYA	AAAAAAA				

Comparación de secuencias de aminoácidos de SSII

	1	mutación MK6827 #			
Morex	MSSAVASPAS	FLALASASPG	RSSRRRARVG	ASPTRAGAGR	LQWRPSPLQR
Himalaya	MSSAVASPAS	FLALASASPG	RSSRRRARVG	ASPTRAGAGR	LQWRPSPLQR
292	MSSAVASPAS	FLALASASPG	RSSRRRARVG	ASPTRAGAGR	LQWRPSPLQR
MK6827	MSSAVASPAS	FLALASASPG	RSSRRRARVG	ASPTRAGAGR	LQ*RPSPPLQR
	51	100			
Morex	TARDGAVAAR	AAGIDDAAPG	RQPRARRYGA	ATKVADPVKT	LDRDAAEGGG
Himalaya	TARDGAVAAR	AAGIDDAAPG	RQPRARRYGA	ATKVADPVKT	LDRDAAEGGG
292	TARDGAVAAR	AAGIDDAAPG	RQPRARRYGA	ATKVADPVKT	LDRDAAEGGG
MK6827	TARDGAVAAR	AAGIDDAAPG	RQPRARRYGA	ATKVADPVKT	LORDAAEGGG
	101	150			
Morex	PSPPAPRQDA	ARLPSKNGTL	INGENKPTGG	GGATKDSGLP	TPARAPHLSI
Himalaya	PSPPAPRQDA	ARLPSKNGTL	INGENKPTGG	GGATKDSGLP	TPARAPHLSI
292	PSPPAPRQDA	ARLPSKNGTL	INGENKPTGG	GGATKDSGLP	TPARAPHLSI
MK6827	PSPPAPRQDA	ARLPSKNGTL	INGENKPTGG	GGATKDSGLP	TPARAPHLSI
	151	200			
Morex	QNRVPVNGEN	KHKVASPPTS	IVDVASPGSA	ANISISNKVP	PSVVPKAKTP
Himalaya	QNRVPVNGEN	KHKVASPPTS	IVDVASPGSA	ANISISNKVP	PSVVPKAKTP
292	QNRVPVNGEN	KHKVASPPTS	IVDVASPGSA	ANISISNKVP	PSVVPKAKTP
MK6827	QNRVPVNGEN	KHKVASPPTS	IVDVASPGSA	ANISISNKVP	PSVVPKAKTP
	201	250			
Morex	PSSVFPKAKT	LPSSGSNFVS	SASAPRLDTV	SDVELAQKGD	ALIVKEAPKP
Himalaya	PSSVFPKAKT	LPSSGSNFVS	SASAPRLDTV	SDVELAQKGD	ALIVKEAPKP
292	PSSVFPKAKT	LPSSGSNFVS	SASAPRLDTV	SDVELAQKGD	ALIVKEAPKP
MK6827	PSSVFPKAKT	LPSSGSNFVS	SASAPRLDTV	SDVELAQKGD	ALIVKEAPKP
	251	300			
Morex	KALSAPAAPA	VQEDLWDFKK	YIGFEEPVEA	KDDGSVAVDD	AGSFEHHQNH
Himalaya	KALSAPAAPA	VQEDLWDFKK	YIGFEEPVEA	KDDGSVAVDD	AGSFEHHQNH
292	KALSAPAAPA	VQEDLWDFKK	YIGFEEPVEA	KDDGSVAVDD	AGSFEHHQNH
MK6827	KALSAPAAPA	VQEDLWDFKK	YIGFEEPVEA	KDDGSVAVDD	AGSFEHHQNH
	301	350			
Morex	DSGPLAGENV	MNVVVVAEAC	SPWCKTGGLG	DVAGALPKAL	AKRGHRVMVV
Himalaya	DSGPLAGENV	MNVVVVAEAC	SPWCKTGGLG	DVAGALPKAL	AKRGHRVMVV
292	DSGPLAGENV	MNVVVVAEAC	SPWCKTGGLG	DVAGALPKAL	AKRGHRVMVV
MK6827	DSGPLAGENV	MNVVVVAEAC	SPWCKTGGLG	DIAGALPKAL	AKRGHRVMVV
	351	400			
Morex	VPRYGDYEEA	YDVGVRKYYK	AAGQDMEVNY	FHAYIDGVDF	VFIDAPLFRH
Himalaya	VPRYGDYEEA	YDVGVRKYYK	AAGQDMEVNY	FHAYIDGVDF	VFIDAPLFRH
292	VPRYGDYEEA	YDVGVRKYYK	AAGQDMEVNY	FHAYIDGVDF	VFIDAPLFRH
MK6827	VPRYGDYEEA	YDVGVRKYYK	AAGQDMEVNY	FHAYIDGVDF	VFIDAPLFRH
	401	450			
Morex	RQQDIYGGSR	QEIMKRMILF	CKAAVEVPWH	VPCGGVPYGD	GNLVFIANDW
Himalaya	RQQDIYGGSR	QEIMKRMILF	CKAAVEVPWH	VPCGGVPYGD	GNLVFIANDW
292	RQQDIYGGSR	QEIMKRMILF	CKAAVEVPWH	VPCGGVPYGD	GNLVFIANDW
MK6827	RQQDIYGGSR	QEIMKRMILF	CKAAVEVPWH	VPCGGVPYGD	GNLVFIANDW
	451	500			
Morex	HTALLPVYLK	AYYRDHGLMQ	YSRSVMVIHN	IAHQGRGPVD	EFPFTELPEH
Himalaya	HTALLPVYLK	AYYRDHGLMQ	YSRSVMVIHN	IAHQGRGPVD	EFPFTELPEH
292	HTALLPVYLK	AYYRDHGLMQ	YSRSVMVIHN	IAHQGRGPVD	EFPFTELPEH
MK6827	HTALLPVYLK	AYYRDHGLMQ	YSRSVMVIHN	IAHQGRGPVD	EFPFTELPEH
	501	550			
Morex	YLEHFRLYDP	VGGEHANYFA	AGLKMADQVV	VVSPGYLWEL	KTVEGGWGLH
Himalaya	YLEHFRLYDP	VGGEHANYFA	AGLKMADQVV	VVSPGYLWEL	KTVEGGWGLH
292	YLEHFRLYDP	VGGEHANYFA	AGLKMADQVV	VVSPGYLWEL	KTVEGGWGLH
MK6827	YLEHFRLYDP	VGGEHANYFA	AGLKMADQVV	VVSPGYLWEL	KTVEGGWGLH

FIGURA 12

	551			\$ mutación 292	600
Morex	DIIRQNDWKT	RGIVNGIDNM	EWNPEVDVHL	KSDGYTNFSL	KTLDGKRC
Himalaya	DIIRQNDWKT	RGIVNGIDNM	EWNPEVDVHL	KSDGYTNFSL	KTLDGKRC
292	DIIRQNDWKT	RGIVNGIDNM	E*NPEVDVHL	KSDGYTNFSL	KTLDGKRC
MK6827	DIIRQNDWKT	RGIVNGIDNM	EWNPEVDVHL	KSDGYTNFSL	KTLDGKRC
	601				650
Morex	KEALQRELGL	QVRGDVPLLG	FIGRLDGQKG	VEIIDAMPW	IVSQDVQLVM
Himalaya	KEALQRELGL	QVRGDVPLLG	FIGRLDGQKG	VEIIDAMPW	IVSQDVQLVM
292	KEALQRELGL	QVRGDVPLLG	FIGRLDGQKG	VEIIDAMPW	IVSQDVQLVM
MK6827	KEALQRELGL	QVRGDVPLLG	FIGRLDGQKG	VEIIDAMPW	IVSQDVQLVM
	651				700
Morex	LGTGRHDLES	MLQHFEREHH	DKVRGWGFS	VRLAHRITAG	ADALLMPSRF
Himalaya	LGTGRHDLES	MLQHFEREHH	DKVRGWGFS	VRLAHRITAG	ADALLMPSRF
292	LGTGRHDLES	MLQHFEREHH	DKVRGWGFS	VRLAHRITAG	ADALLMPSRF
MK6827	LGTGRHDLES	MLQHFEREHH	DKVRGWGFS	VRLAHRITAG	ADALLMPSRF
	701				750
Morex	EPCGLNQLYA	MAYGTIPVVH	AVGGLRDTVP	PFDPFNHSGL	GWTFDRAEAH
Himalaya	EPCGLNQLYA	MAYGTIPVVH	AVGGLRDTVP	PFDPFNHSGL	GWTFDRAEAH
292	EPCGLNQLYA	MAYGTIPVVH	AVGGLRDTVP	PFDPFNHSGL	GWTFDRAEAH
MK6827	EPCGLNQLYA	MAYGTIPVVH	AVGGLRDTVP	PFDPFNHSGL	GWTFDRAEAH
	751				800
Morex	KLIEALGHCL	RTYRDHKESW	RGLQERGMSQ	DFSWEHAAKL	YEDVLVQAKY
Himalaya	KLIEALGHCL	RTYRDHKESW	RGLQERGMSQ	DFSWEHAAKL	YEDVLVQAKY
292	KLIEALGHCL	RTYRDHKESW	RGLQERGMSQ	DFSWEHAAKL	YEDVLVQAKY
MK6827	KLIEALGHCL	RTYRDHKESW	RGLQERGMSQ	DFSWEHAAKL	YEDVLVQAKY
	801				
Morex	QW*				
Himalaya	QW*				
292	QW*				
MK6827	QW*				

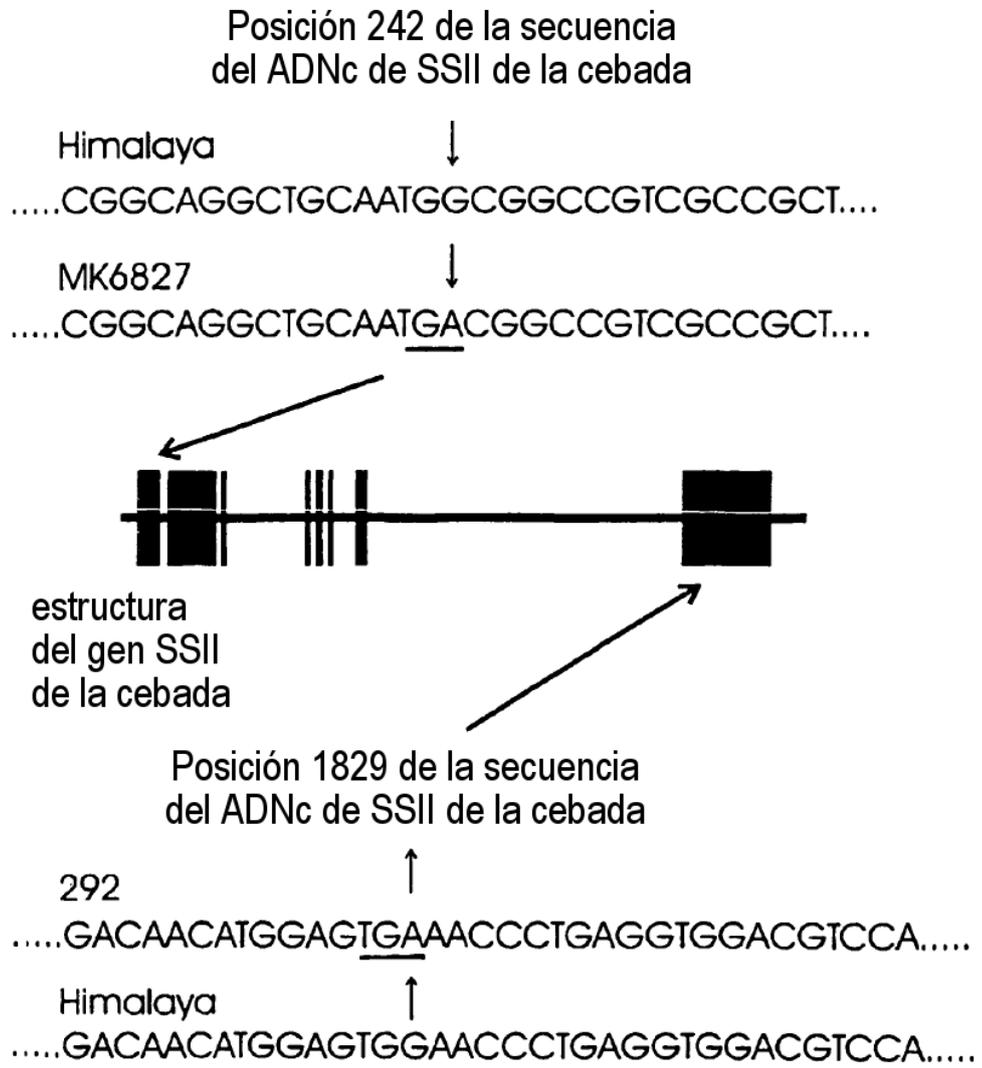


FIGURA 13

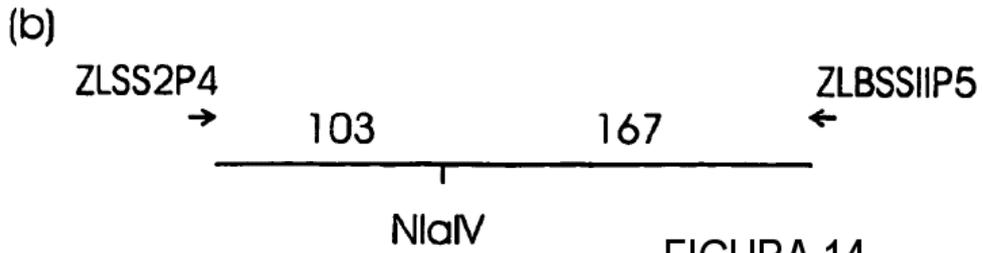
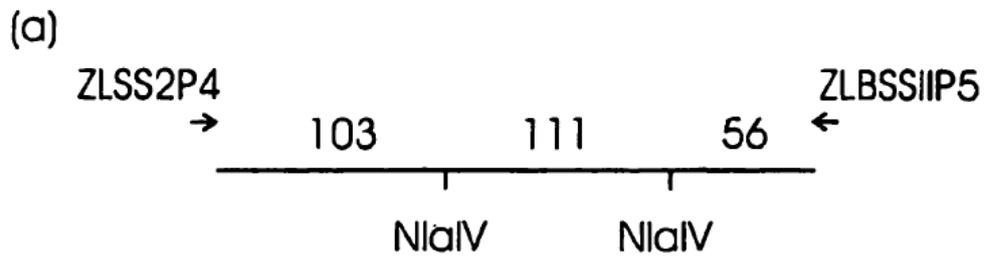
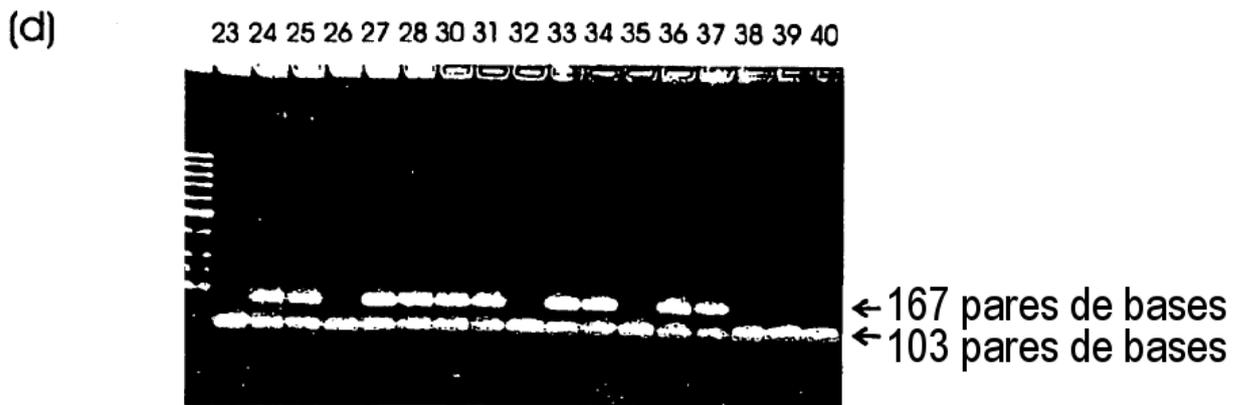


FIGURA 14



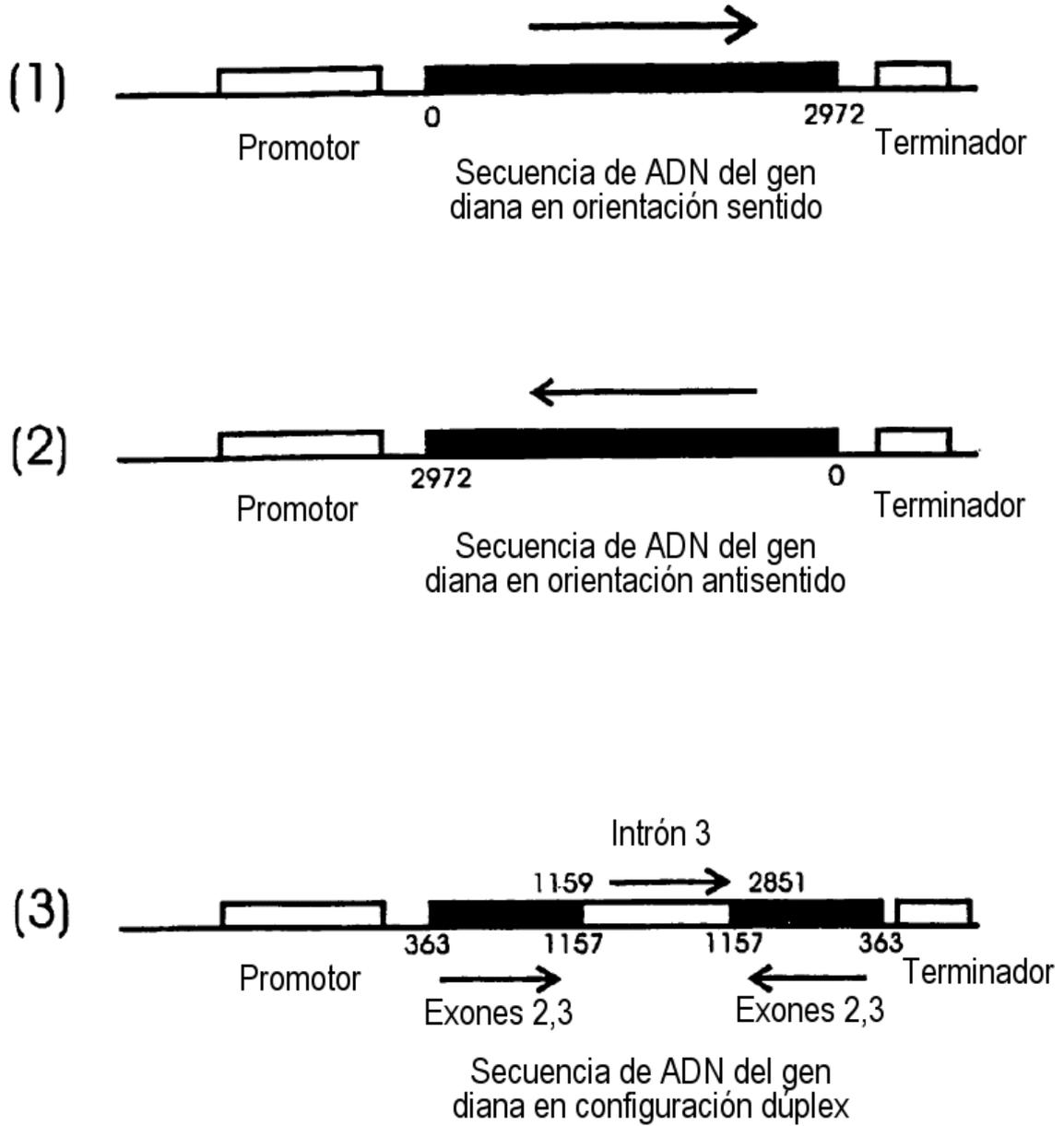


FIGURA 15

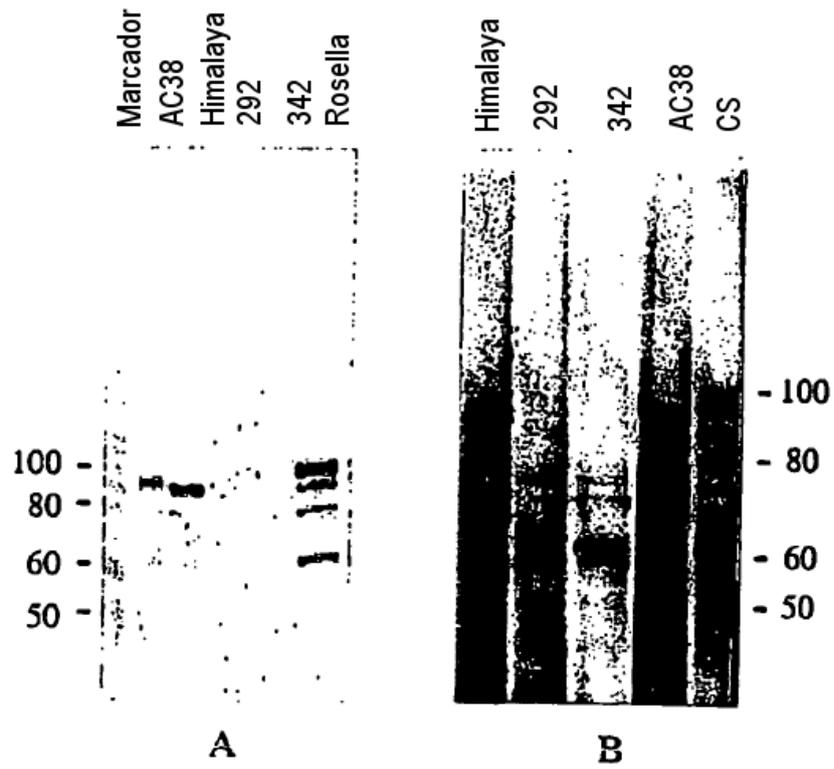


FIGURA 16