

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 616**

51 Int. Cl.:

C12C 1/18 (2006.01)

C12C 12/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2009 E 09771493 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2373154**

54 Título: **Bebidas derivadas de cebada y malta con bajo nivel de dimetil sulfuro**

30 Prioridad:

03.12.2008 DK 200801708

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.10.2016

73 Titular/es:

**CARLSBERG BREWERIES A/S (50.0%)
Ny Carlsberg Vej 100
1760 Copenhagen V, DK y
HEINEKEN SUPPLY CHAIN B.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KNUDSEN, SØREN;
HAMBRAEUS, GUSTAV;
BECH, LENE MØLSKOV;
SØRENSEN, STEEN BECH;
SKADHAUGE, BIRGITTE;
BREDDAM, KLAUS y
OLSEN, OLE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 586 616 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

Bebidas derivadas de cebada y malta con bajo nivel de dimetil sulfuro

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a bebidas derivadas de la cebada caracterizadas por niveles notablemente reducidos tanto de sulfuro de dimetilo (DMS) y/o su precursor s-metil-L-metionina (SMM) o por carecer uno o preferentemente ambos de dichos compuestos. Además, la invención se refiere a métodos para producir las bebidas anteriormente mencionadas y también a las plantas de cebada útiles en la preparación de dichas bebidas, así como también a otros productos vegetales preparados con dichas plantas. Mientras que la invención permite la producción de bebidas caracterizadas por perfiles de sabor mejorados, también facilita un nuevo paradigma para métodos de producción con reducciones notables en la entrada de energía térmica, en particular con respecto a la ebullición del mosto.

15

Antecedentes de la invención

Las bebidas, principalmente la cerveza, pueden producirse a base de cebada, *Hordeum vulgare L.*, que es una planta de cultivo monocotiledónea cultivada en muchas partes del mundo. La cebada es económicamente importante, tanto como materia prima para productos industriales, incluyendo la cerveza, así como también como una fuente de alimento para animales.

20

En el caso de la cerveza, así como también en muchos vegetales y productos alimenticios incluyendo té, cacao, leche, vinos, bebidas alcohólicas (como el ron), maíz dulce y numerosos vegetales cocinados, el DMS agrega prominentes y en general beneficiosas notas de olor y sabor al producto. Sin embargo, un alto nivel de DMS confiere un sabor que puede ser indeseable, normalmente descrito como “maíz dulce cocido” o a veces como “similar al de la grosella negra”.

25

Dependiendo del tipo de cerveza, los niveles de DMS normalmente pueden llegar hasta 144 µg/l y a veces puede alcanzar hasta 150 ppm (150 µg/l), donde dichos compuestos frecuentemente contribuyen a los sabores indeseables de “vegetal cocido” o “similares al del repollo”. Sin embargo, un bajo nivel del compuesto es a veces deseable para cerveza lager, ya que puede contribuir a dar una sensación de plenitud al paladar y aroma total de cerveza; el umbral sensorial es ~25 a 50 ppm, por ejemplo, aproximadamente de 30-45 µg/l (Meilgaard, 1982). El sabor del DMS no se percibe generalmente cuando los niveles de DMS son <10 ppm.

30

El SMM, también denominado en el presente documento como precursor del DMS (DMSP), se sintetiza al germinar granos de cebada por la acción de los componentes funcionales del ciclo de SMM (Fig. 1A). En este caso, la enzima metionina (Met)-S-metiltransferasa (MMT) cataliza la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil-metionina (AdoMet) a Met, formando SMM. El último compuesto puede, a su vez, servir como dador de metilo para la síntesis de Met a partir de homocisteína (Hcy), una reacción catalizada por la enzima Hcy-s-metiltransferasa (HMT). A pesar de que existe un debate sobre el papel definitivo de la MMT, se propuso inicialmente para impedir que se agotasen las fuentes de Met para la síntesis de proteínas por un exceso en la síntesis de AdoMet (Mudd y Datko, 1990). También se ha sugerido que el ciclo de SMM funciona en el transporte de azufre a larga distancia en las plantas, con un mayor flujo de Met a SMM en hojas, transporte en el floema de SMM y reconversión de SMM en Met en el desarrollo de granos u otros tejidos sumidero (Bourgis et al., 1999). Aunque experimentos posteriores con radiotrazador revelaron que dicho ciclo gestiona el control de los niveles de AdoMet más que evitar el agotamiento de Met (Ranocha et al., 2001). Una explicación alternativa del papel fisiológico de SMM en las plantas se refiere a la regulación de la síntesis de etileno (Ko et al., 2004), principalmente con las ideas manifestadas mediante estudios con 1-aminociclopropan-1-carboxilato sintasa recombinante a partir de levadura del género *Pichia*.

35

McElroy y Jacobsen (1995) han especulado con que es posible regular la síntesis de SMM haciendo uso de, por ejemplo, tecnología antisentido. Sin embargo, no se proporcionó guía respecto de genes diana relevantes para el antisentido, aunque se esperaba que la probabilidad de un resultado positivo fuese cuestionable dado que las grandes reducciones en los niveles de SMM podrían resultar perjudiciales para el crecimiento y desarrollo de la cebada. McElroy y Jacobsen (anteriormente citado) no han discutido soluciones alternativas para obtener niveles más bajos de SMM. Además, tal como se discute en detalle a continuación, las tecnologías antisentido no se han aplicado con éxito en la cebada para suprimir completamente la expresión génica.

40

Desafortunadamente, no hay métodos disponibles para preparar plantas de cebada transgénica que carezcan completamente de expresión de una proteína dada. En general para la cebada, la aplicación de técnicas antisentido da lugar a plantas transgénicas que siguen expresando algo de la proteína en cuestión (véase, por ejemplo, Robbins et al., 1998; Stahl et al., 2004; Hansen et al., 2007).

45

Asimismo, no se han desarrollado métodos eficaces para preparar mutaciones específicas usando ARN/ADN quimérico o mutagénesis de sitio dirigido en plantas de cebada. En línea con esto y a pesar de los grandes esfuerzos, los inventores de la presente publicación no conocen ningún ejemplo publicado acerca de un

50

55

60

65

direccionamiento génico dirigido a oligonucleótidos exitoso en la cebada. Aunque el objetivo no era la cebada, Lida y Terada (2005) indican que se han hecho pruebas de direccionamiento génico dirigido a oligonucleótidos en maíz, tabaco y arroz; aunque en todos los casos con el gen de la acetolactato sintetasa (ALS) resistente a los herbicidas como diana. De acuerdo con la conclusión de Lida y Terada (anteriormente citado), queda por determinar si la estrategia anteriormente mencionada, con las modificaciones apropiadas, es aplicable a genes diferentes de aquellos directamente seleccionables, tales como los genes de ALS. La mutagénesis dirigida que usa nucleasas de dedo de cinc representa otra herramienta que en potencia podría permitir futuras investigaciones en la biología básica de la planta o modificaciones en plantas de cultivo (Durai et al., 2005; Tzfira y White, 2005; Kumar et al., 2006). También en este caso, no se ha perseguido o aplicado con éxito la mutagénesis en la cebada.

No obstante, pueden prepararse mutantes de cebada mediante mutagénesis aleatoria haciendo uso de irradiación o tratamiento químico, tal como el tratamiento con azida sódica (NaN_3). Un ejemplo se refiere a granos de cebada mutagenizados mediante el uso de NaN_3 y posteriormente seleccionadas respecto de niveles altos de fosfato libre en un esfuerzo por detectar mutantes con bajo contenido de fitatos (Rasmussen y Hatzack, 1998); se identificó un total de 10 mutantes entre 2000 granos seleccionados. Aunque está lejos de ser siempre posible, hallar un mutante particular después del tratamiento con NaN_3 depende de la persistencia y de un método eficaz de selección y eso dista mucho de tener siempre éxito.

Una parte difícil relacionada con la identificación de dianas moleculares prometedoras en el fitomejoramiento tradicional se refiere a determinar qué componente (o componentes) de una vía bioquímica dada deben alterarse para producir la alteración deseada de la lectura del sistema y, en consecuencia, la capacidad para establecer un método de selección que sea útil.

Las incubaciones relacionadas con la producción de la cerveza a altas temperaturas, tales como el secado al horno de la malta o el calentamiento y ebullición del mosto pueden inducir la conversión química de SMM a DMS. Debido a las propiedades inherentes del DMS, en particular su punto de ebullición de solamente 37°C - 38°C , una gran parte del DMS formado durante el horneado y la ebullición del mosto puede perderse en la atmósfera. A temperaturas por encima de $\sim 70^\circ\text{C}$, la volatilidad del DMS se reduce a niveles muy bajos (Sheuren y Sommer, 2008) mientras que manifiesta condiciones para su posterior oxidación a dimetil sulfóxido (DMSO). Cuando el tiempo de retención o el vigor de la ebullición del mosto es inadecuado para convertir la SMM residual, puede continuar formándose DMS a medida que se enfría el mosto, con su consiguiente transferencia a la cerveza.

Se han desarrollado métodos tecnológicos para reducir el nivel de DMS en la cerveza. Por lo tanto, el documento AU 38578/93 describió un método para reducir los niveles de DMS en la malta que comprende el tratamiento al vapor de dicha malta. En la solicitud de patente US 2006/0057684 de Bisgaard-Frantzen, H. et al., se describen métodos de fabricación de cerveza que comprenden el tratamiento con calor de la masa remojada a temperaturas de 70°C y superiores y en la Patente de Estados Unidos n.º 5.242.694 de Reuther, H. se describieron métodos para preparar cerveza baja en hidratos de carbono, en la que los métodos comprenden la ebullición intensiva del mosto seguido del lavado con dióxido de carbono de dicho mosto. Sin embargo, todos los tratamientos anteriormente mencionados consumen altos niveles de energía y además pueden alterar las características de la malta o el mosto.

Sumario de la invención

La presente invención describe bebidas preparadas a partir de la cebada o partes de la misma, en particular cerveza con un sabor mejorado. Las bebidas divulgadas en el presente documento muestran niveles muy bajos de DMS o incluso nada de DMS, particularmente bebidas con niveles de DMS por debajo del umbral de sabor y, en consecuencia, caracterizados por la ausencia de sabor a DMS.

Además, las bebidas de la invención tienen propiedades superiores en cuanto al sabor. Por consiguiente, las bebidas de la invención se caracterizan por ser particularmente equilibradas y bebibles, con un alto grado de frescura, con sabor aromático y floral.

Por lo tanto, la invención proporciona bebidas con notables propiedades de sabor basadas en la ausencia de DMS o en bajos niveles de DMS. Se comprueba en el presente documento que el DMS influye sorprendentemente en la percepción humana de los compuestos afrutados en la cerveza (véase la Fig. 1B), consistente con un modelo proporcionado por los inventores en el cual el DMS enmascara el sabor de dichos compuestos.

Se considera de suma importancia que la presente invención proporcione granos de cebada o malta con defectos que bloqueen específicamente la formación del precursor de DMS. De esta forma, puede evitarse el enmascaramiento anteriormente descrito del sabor afrutado por el DMS, el cual abre nuevas oportunidades en la utilización industrial de la cebada y la malta. Además, los granos de la cebada y la malta con defectos que específicamente bloquean la formación del precursor del DMS también tienen propiedades del sabor causadas por la ausencia de DMS en sí. De manera notable, dicho tipo de cebada o malta podría aprovecharse como materia prima en aplicaciones industriales eficaces para ayudar a establecer las configuraciones de producción a medida más allá que las capacidades actuales. En particular, las mejoras se refieren a cuestiones sobre la calidad de la cerveza y la sostenibilidad ambiental en la producción de la cerveza, específicamente para que:

- (i) la cerveza tenga un bajo nivel de sabor específico de DMS;
- (ii) la cerveza tenga un perfil de sabor afrutado mejorado;
- (iii) aporte de energía reducido para la producción de la cerveza; y
- (iv) consumo de energía reducido en la producción de mosto.

5

La presente invención proporciona plantas y granos de cebada que cumplen con dichas mejoras.

Por lo tanto, sin restringirse a consideraciones teóricas acerca de cómo podría entrelazarse el mecanismo de la SMM con otros procesos biológicos, la presente solicitud ofrece oportunidades aún no proporcionadas para aprovechar y explorar el fitomejoramiento y el uso industrial de plantas de cebada defectuosas para la síntesis de SMM.

10

La presente invención describe que pueden prepararse bebidas caracterizadas por bajos niveles de sabor específico a DMS y un perfil de sabor afrutado mejorado y/o bebidas que son particularmente equilibradas y bebibles, es decir, con altos grados de frescura, sabor floral y aromático, a partir de plantas de cebada o partes de las mismas, que portan una mutación en el gen codificante de la MMT, lo que causa una pérdida total de actividad de la MMT. Dichas plantas se denominan en el presente documento como cebada "con MMT nula".

15

Por lo tanto, la invención se refiere en un aspecto a bebidas preparadas a partir de una planta de cebada o de una parte de la misma, en la que dicha bebida contiene un nivel de dimetil sulfuro (DMS) inferior a 20 ppm y un nivel de S-metil-l-metionina (SMM) de menos de 20 ppm, y en el que dicha planta de cebada o parte de la misma porta una mutación en el gen que codifica la MMT, lo que causa una pérdida total de MMT funcional.

20

En otro aspecto, la invención ofrece plantas de cebada útiles para preparar dichas bebidas. Por consiguiente, también es un objeto de la invención proporcionar una planta de cebada o parte de la misma, en la que la planta de cebada porta una mutación en el gen codificante de la MMT que causa una pérdida total de la enzima MMT funcional.

25

Los productos vegetales producidos a partir de dicha planta con MMT nula incluyen, por ejemplo, composiciones de malta y mosto o jarabes o extractos con base de cebada o jarabes o extractos o complementos con base de malta. Los complementos en el presente contexto pueden ser cebada no malteada que puede usarse sola o en combinación con cebada malteada para preparar mosto. Asimismo, se proporcionan métodos para preparar dichas plantas de cebada así como métodos para preparar las bebidas y otros productos vegetales.

30

Por otro lado, en un mundo con la alteración climática en la agenda internacional, la sociedad y la industria deben contribuir a la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero y a los beneficios para el medio ambiente. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar plantas de cebada útiles para la producción de cerveza usando métodos con bajo consumo de energía. Por consiguiente, las plantas de cebada de la invención son útiles para la producción de cerveza usando métodos en los que se reduce la duración de las etapas de calentamiento o donde se reduce la temperatura de las etapas de calentamiento, en comparación con métodos estándar de elaboración de cerveza. Los beneficios en las etapas de los procedimientos de secado al horno y de ebullición del mosto son de una importancia fundamental, que pueden acortarse significativamente o realizarse a temperaturas inferiores en comparación con los regímenes de elaboración y producción de cerveza estándar, reduciendo el consumo de energía para proporcionar un método más sostenible para la producción de cerveza.

40

45

Listado de secuencias

La invención puede entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción detallada y del listado de secuencias adjunto (resumido en la tabla **10**), que forma parte de la presente solicitud. Dicha tabla enumera los ácidos nucleicos y polipéptidos que se describen en el presente documento, la denominación de los cebadores de oligonucleótidos así como los clones de ADNc y ADNg que comprenden los fragmentos de ácido nucleico que codifican polipéptidos que representan la totalidad o una parte sustancial de estos polipéptidos y el identificador correspondiente (SEQ ID NO:). Las descripciones de la secuencia y el listado de secuencias adjunto al presente documento cumplen las normas que rigen las descripciones de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos en solicitudes de patente.

50

55

Descripción de los dibujos

La FIG. **1** muestra componentes seleccionados del ciclo de la SMM y de las clasificaciones de sabor promedio. **(A)** Componentes seleccionados del ciclo de SMM en los cuales la SMM se sintetiza por transferencia del metilo de la s-adenosilmetionina (SAM) a metionina (Met), catalizada por la enzima met-s-metiltransferasa (MMT). La SMM puede, a su vez, servir como dadora de metilo para la síntesis de Met a partir de la homocisteína (Hcy), en una reacción catalizada por la enzima Hcy-s-metiltransferasa (HMT). La ilustración muestra cómo están conectadas las reacciones esencialmente irreversibles. Cada vuelta del ciclo es inútil ya que consume y luego regenera dos Met mientras que convierte ATP en adenosina, PPI y Pi (no mostrados). **(B)** Se ilustran las clasificaciones de sabor promedio, \pm desviación estándar, otorgadas por un panel de especialistas catadores de

60

65

cerveza, acerca de las propiedades enumeradas, cuerpo, afrutado y DMS de muestras de cerveza. Las muestras de control de cerveza estándar adicionada con cerveza solamente (columnas marcadas con "0") o adicionadas con una mezcla de ésteres, lo que brinda las siguientes concentraciones en la cerveza: 5 ppm [partes por millón] de acetato de etilo, 1,5 ppm de isoamilacetato, 0,05 ppm de hexanoato de etilo, 0,13 ppm de octanoato de etilo (columnas marcadas con "1") y la mezcla de éster anteriormente mencionada que incluye 100 ppm de DMS (columnas marcadas con "2").

La FIG. 2 muestra las moléculas involucradas en la formación alcalina del compuesto fluorescente SMM-OPA.

La FIG. 3 muestra resultados de experimentos de HPLC y de transferencia de Western para verificar el fenotipo de MMT nula del mutante 8063 y del mutante 14083. **(A)** Un ejemplo de separación realizada por HPLC de un extracto del brote de la vc. Prestige, que muestra elución de ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser) y SMM. La fluorescencia de los extractos derivatizados con OPA de brotes de cebada se estimularon a 340 nm y se midió la emisión a 450 nm. **(B)** Separación de extractos realizada por HPLC de los mutantes indicados y la vc. Sebastian de tipo silvestre. La separación de los componentes en un extracto de un mutante dio un cromatograma sin picos específicos de SMM. **(C)** Los resultados de la transferencia de Western de las proteínas separadas por tamaño a partir de extractos del brote de tipo silvestre de Prestige (carril 2), mutante 8063 (carril 3), silvestre de Sebastian (carril 5) y mutante 14018 (carril 6). Las proteínas de referencia con las masas indicadas en kDa se separaron en las líneas 1, 4 y 7, mientras que la MMT recombinante de las células de *E. coli* se emplearon como control y se separaron en el carril 8. Tal como se detalla en el ejemplo 12, las bandas proteínicas con tinción de 120 kDa representan a la MMT, mientras que la banda de 80 kDa en el extracto del *E. coli* no son derivados de la MMT como también aparece en los extractos de las células de control negativo transformadas con el vector pET19b (véase la FIG. 14B, C).

La FIG. 4 muestra la ausencia de actividad de MMT en brotes de 4 días de crecimiento del mutante 8063, aunque actividades pronunciadas en los brotes de tipo silvestre con similar extensión de germinación. Se determinó la actividad de la MMT empleando [³H]SAM como sustrato. La transferencia catalizada de MMT de un grupo metilo de [³H]SAM en Met, que formó SMM, se monitoreó mediante contador de centelleo después de la extracción del [³H]SAM restante con carbón activado. Esto une al sustrato, aunque no al recientemente sintetizado producto rotulado de SMM. La ilustración también muestra que SMM estaba ausente en los brotes del tipo mutante, aunque presente en aquellos de tipo silvestre. Se analizaron un total de 30 brotes tanto de las plantas de tipo mutante como de tipo silvestre, 15 de cada una de las plantas mutantes y de tipo silvestre.

La FIG. 5 muestra una comparación con contenidos libres de DMSP y libres de DMS en malta con MMT nula, mosto y cerveza. **(A)** Tanto la malta verde como la malta secada en horno del mutante 8063 habían reducido notablemente los niveles de DMSP y estaban libres de DMS. **(B)** Los mostos sometidos a ebullición y dulces del mutante 8063 casi no tuvieron DMSP y estaban libres de DMS. También la cerveza elaborada con malta del Mutante 8063 presentó resultados extremadamente bajos en DMS libre.

La FIG. 6 muestra comparaciones de perfil del sabor establecidas por un panel de 10 catadores de cerveza. Las pruebas comprendieron cervezas elaboradas con malta de tipo silvestre vc. Power y del tipo mutante 8063 (con MMT nula). Este tipo de análisis hace uso de un número de atributos del sabor predefinidos, según se muestra en los gráficos, cuantificable en una escala de 0 a 5. Un sabor se juzga como "extremadamente", correspondiente al puntaje 5, solamente si su propiedad se considera como máxima para el tipo de cerveza que se está analizando. **(A)** Se enumera el resumen de la evaluación del panel para catar cerveza con respecto a la cerveza adicionada con ésteres y alcoholes en la tabla 1. **(B)** Resumen que detalla la evaluación del panel de catadores de una cerveza no adicionada.

La FIG. 7 muestra una ilustración de una forma de propagar los granos de cebada mutagenizados con NaN₃. Los granos de la generación M0 se desarrollan en plantas que determinan granos de la generación M1. Estos pueden sembrarse y desarrollar plantas M1, las cuales producen nuevos granos de la generación M2. Luego, las plantas M2 crecen y determinan granos de la generación M3. Los granos de la generación M3 pueden dejarse germinar y las muestras de las mismas, por ejemplo, los coleóptilos, pueden utilizarse para análisis. Las semillas M3 también pueden sembrarse y pueden emplearse las flores de las correspondientes plantas para realizar cruzamientos y obtener plantas de la generación M4.

La FIG. 8 muestra un esquema general simplificado de un proceso de producción de cerveza preferido, que incluye remojo de la pepita de cebada (1), germinación (2), secado en horno (3), molienda de la malta seca (4), maceración (5), filtración (6), ebullición del mosto en presencia de lúpulo agregado (7), fermentación en presencia de levadura (8), maduración de la cerveza (9), filtración de la cerveza (10), envasado en, por ejemplo, botellas, latas o similares (11) y etiquetado (12). Los procesos individuales pueden agruparse en secciones que comprenden la producción de malta (1 a 3), la producción del mosto (4 a 7), fermentación (8 y 9) y la preparación de la cerveza terminada (10 a 12). A pesar de que se ilustra un método preferido, se pueden considerar maneras alternativas que omitan algunos de los pasos descritos (la filtración, por ejemplo, puede omitirse o puede no agregarse lúpulo) o pueden agregarse pasos adicionales (por ejemplo, adición de complementos o carbonato). La cerveza también puede producirse empleando mezclas de cebada malteada o sin maltear o sólo cebada sin

maltear, en cuyo caso con frecuencia se agregan enzimas externas durante el proceso de maceración.

La FIG. 9 muestra, en forma esquemática, la organización del gen codificante de la MMT de la cebada. Se ilustra la secuencia genómica de 6368 pb de longitud (SEC ID NO: 3), la cual abarca los codones de iniciación y terminación de traducción. Los exones e intrones se muestran como cuadrados numerados y líneas sin numerar, respectivamente. El exón 12 se ilustra con cabeza de flecha para indicar la dirección completa de la transcripción y traducción. Los números de los nucleótidos se refieren al extremo 5' y 3' de los exones indicados relativos a la primera base del codón de iniciación de traducción. También se ilustran las ubicaciones aproximadas de las extensiones de la PCR que corresponden a las amplificaciones que usan los conjuntos del cebador enumerados en la tabla 2.

La FIG. 10 muestra la secuencia de ADNc de la MMT de la cebada de vc. Prestige, que abarca los codones de iniciación y terminación de traducción, es decir, la región codificante (SEC ID NO: 4), alineada con la secuencia traducida (SEC ID NO: 6), mediante el uso del código de una letra de los aminoácidos.

La FIG. 11 muestra una alineación de secuencia de las enzimas de MMT casi idénticas de la cebada de vc. *Haruna Nijo* (SEC ID NO: 2) y vc. Prestige (SEC ID NO: 6). Las diferencias de los dos restos de aminoácido separados se destacaron con cuadrados en negro y letras en blanco.

La FIG. 12 muestra de qué manera el mutante de cebada 8063 activa los sitios de corte y empalme oculto en el gen de la MMT. (A) Pequeñas flechas horizontales debajo de la ilustración de la estructura genómica del gen de la MMT indican la posición aproximada de hibridación del conjunto del cebador 15, véase tabla 4. (B) Visualización de bandas de ADN seguidas por electroforesis en gel de agarosa del análisis por reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) de los productos que emplearon molde de ARN, ya sea de tipo silvestre vc. Prestige o del tipo mutante 8063. (C) Ilustración para mostrar la estructura intrón-exón de productos de la PCR en el panel B, que emplea los mismos elementos gráficos que en A. El exón 5 del producto 4 es más corto en comparación con el de tipo silvestre. Las cabezas de las flechas verticales señalan las posiciones aproximadas de los codones de terminación de traducción prematura. Debido a la elección de los cebadores, los productos no comprenden los exones 1 y 2. Sin embargo, se predice que el ARNm [ARN mensajero] también comprende los exones 1 y 2. (D) Ilustración detallada de las transcripciones resultantes del sitio de corte y empalme 5' del tipo mutado (mut.) y de tipo silvestre (WT) en el intrón 5, donde el sitio de mutación se indica con la base subrayada. Las flechas unidas por líneas enteras, rotuladas como 3 y 4, marcan el sitio dador y aceptor utilizados durante el corte y empalme del producto 3 y el producto 4, respectivamente (véase panel 4). La línea discontinua, marcada como 2*, señala el corte y empalme del transcrito de tipo silvestre (producto 1 del panel C) y el producto 2 no cortado y empalmado (véase el panel C). Las bases de los exones y el intrón 5 están en minúsculas y mayúsculas, respectivamente. nt: nucleótido. (E) Esquema general de la composición de los sitios de corte y empalme 5' y 3' en monocotiledóneas (Sinibaldi y Mettler, 1992), comparada con la secuencia del intrón 5 en el gen de la MMT del mutante 8063.

La FIG. 13 muestra plásmidos de expresión para la expresión heteróloga de las MMT aberrantes del mutante 8063 y la alineación de las proteínas codificadas. (A) Ilustración del fragmento NcoI-BamHI de pET19b-MMT, que incluye los sitios de restricción seleccionados, que codifica la MMT de tipo silvestre fusionado con una secuencia que especifica un *His-Tag* (*; secuencia MGHHHHHHHHHH; SEC ID NO: 69) en el mismo marco de lectura de un sitio de la enterocinasa (**; secuencia SSGHIDDDDKH; SEC ID NO: 70). Las construcciones de eliminación se ilustran en (B), (C) y (D). (E) Alineación de secuencias de la MMT codificadas (SEQ ID NO: 6, 11, 13, 15 para construcciones que aparecen en A, B, C y D, respectivamente). Se utilizó un péptido sintético correspondiente a la extensión de la secuencia marcada con asteriscos para la generación de anticuerpos policlonales contra la MMT de la cebada. La secuencia que abarca los números de residuo 333 y 1084 no aparece para la enzima de tipo silvestre (SEC ID NO: 6).

La FIG. 14 muestra los resultados de la expresión heteróloga en *E. coli* de tipo silvestre y de las formas mutantes de la MMT de la vc. Prestige y del mutante 8063, respectivamente, con detalles experimentales descritos en el ejemplo 12. Un extracto de células de *E. coli* transformadas con vector pET19b, así como también una alícuota de SMM pura, sirvieron como muestras de control experimental. Las áreas con gel entre los carriles 4 y 5 de ambas transferencias, que comprenden datos irrelevantes a la presente solicitud, se borraron electrónicamente después de su exploración. (A) Perfiles de HPLC de la SMM pura así como también de los extractos de células de *E. coli* transformados con los plásmidos indicados. Para fines de comparación, los perfiles también son una parte integral de la FIG. 18. (B) Resultados del método de transferencia de Western de las proteínas separadas por tamaño a partir de extractos celulares y solubles de células de *E. coli* transformadas con plásmidos pET-MMT (carril 2), pET19b-line8063-Prod3 (carril 3), pET19b-line8063-Prod4 (carril 4) y pET19b (carril 5). Las proteínas de referencia, con las masas indicadas en kDa, se separaron en el carril 1. (C) Resultados del método de transferencia de Western de las proteínas separadas por tamaño a partir de extractos de cuerpos de inclusión de células de *E. coli* transformadas con los plásmidos, según se mencionó anteriormente en la referencia de la parte B de la figura. Los anticuerpos primarios y policlonales utilizados en los análisis Western generados contra un péptido de 15 restos de longitud sintético de la MMT de la cebada, correspondiente a la extensión del aminoácido marcada con asteriscos en la FIG. 13.

La FIG. 15 muestra una ilustración acerca de metodologías para identificar granos que se caracterizan por la mutación G3076→A en el gen para la MMT del mutante 8063. (A) En la reacción hipotética 1 y la reacción hipotética 2, el conjunto del cebador 20, véase tabla 7, produce un fragmento de PCR de 271 pb y no produce fragmento, respectivamente, de acuerdo a como lo muestra de manera esquemática la banda con tinción de bromuro de etidio seguida por electroforesis en gel de agarosa de las reacciones correspondientes (C). En las reacciones hipotéticas 3 y 4 (B), solamente la última genera un fragmento de PCR. Las flechas horizontales indican la coincidencia de apareamiento de la secuencia total con el ADN de molde, mientras que las flechas con una curvatura pronunciada indican un error de apareamiento. (D) Los análisis realizados con el método de transferencia de Western con un anticuerpo anti-MMT reconocen una enzima de MMT de 120 kDA en un grano de tipo natural de vc. Prestige (carril 2), aunque no en la de tipo mutante 8063. Las proteínas estándar se separaron en el carril 1 con las correspondientes masas indicadas en kDA.

La FIG. 16 muestra cómo el mutante 14018 de cebada activa sitios de corte y empalme ocultos en el gen de la MMT. (A) Las pequeñas flechas horizontales debajo de la ilustración de la estructura genómica del gen de la MMT indican la posición de hibridación aproximada del conjunto del cebador 16, véase tabla 4. (B) Visualización de bandas de ADN seguidas por electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR con empleo del molde de ARN ya sea de tipo silvestre (vc. Sebastian) o mutante 14018. (C) Representación para ilustrar la estructura intrón-exón de los productos de PCR en el panel B, usando los mismos elementos gráficos que en A. El exón 2 del producto 8 está truncado en comparación con el de tipo silvestre. Las cabezas de las flechas verticales apuntan a las posiciones aproximadas de los codones de terminación prematura de traducción. Debido a la elección de los cebadores, los productos no comprenden el exón 1. Sin embargo, se puede predecir que el ARNm también comprende el exón 1. (D) Ilustración detallada de las transcripciones resultantes del sitio de corte y empalme 5' del tipo mutado (mut.) y de tipo silvestre (WT) del intrón 2, con el sitio de mutación indicado por una base subrayada. Las flechas unidas por líneas enteras rotuladas como 7 y 8 marcan el sitio dador y el aceptor utilizados durante el corte y empalme del producto 7 y el producto 8, respectivamente (véase panel C). La línea discontinua marcada como 6* apunta al corte y empalme de la transcripción de tipo silvestre (producto 5 en el panel C) y al producto 6 no ensamblado (véase panel C). Las bases de los exones y el intrón 2 están en minúsculas y mayúsculas, respectivamente. nt: nucleótido. (E) Esquema general de la composición de los sitios de corte y empalme 5' y 3' en monocots (Sinibaldi y Mettler, anteriormente citado), comparadas con la secuencia del intrón 2 para el gen de la MMT, mutante 14018.

La FIG. 17 muestra los plásmidos de expresión para la expresión heteróloga de las MMT aberrantes del mutante 14018 y la alineación de las proteínas codificadas. (A) Ilustración del fragmento NcoI-BamHI de pET19b-MMT — que incluye los sitios de restricción seleccionados— que codifica la MMT de tipo natural fusionada a una secuencia que especifica una *His-Tag* (*; secuencia MGHHHHHHHHHH; SEC ID NO: 69) en el mismo marco de lectura de un sitio de la enteroquinasa (**; secuencia SSGHIDDDDKH; SEC ID NO: 70). Las construcciones de eliminación se ilustran en (B), (C) y (D). (E) Alineación de secuencias de la MMT codificadas (SEC ID NO: 18, 22, 24, 26 para construcciones que aparecen en A, B, C y D, respectivamente). La secuencia que abarca el número de resto 213 a 1084 no se muestra para la enzima de tipo silvestre (SEC ID NO: 18).

La FIG. 18 muestra los resultados experimentales de la HPLC de la expresión heteróloga en *E. coli* de las formas de tipo silvestre y mutante de la MMT a partir de la vc. Prestige y la mutante 14018, respectivamente, con detalles experimentales descritos en el ejemplo 15. La SMM pura y extracto de las células de *E. coli* transformadas con el vector pET19b sirvieron como muestras de control experimental. Para fines de comparación, los cromatogramas marcados con asteriscos también son parte integral de la FIG. 14A.

La FIG. 19 muestra una ilustración de una estrategia genética para identificar granos caracterizados por la mutación G1462→A en el gen para la MMT del mutante 14018. (A) En la reacción hipotética 1 y la reacción hipotética 2, el conjunto del cebador 29, véase tabla 9, produce un fragmento de PCR de 121 pb y no produce fragmento, respectivamente, tal como se muestra de manera esquemática por una banda con tinción de bromuro de etidio seguida por electroforesis en gel de agarosa de las reacciones correspondientes (C). En las reacciones hipotéticas 3 y 4 (B), solamente la última genera un fragmento de PCR (123 pb). Las flechas horizontales indican la coincidencia de apareamiento de la secuencia total con el ADN de molde, mientras que las flechas con una curvatura pronunciada indican un error de apareamiento. (D) Los análisis realizados con el método de transferencia de Western con un anticuerpo anti-MMT reconocen una enzima de MMT de 120 kDA en un grano de tipo silvestre de vc. Sebastian (línea 2), aunque no en la de tipo mutante 14018. Las proteínas estándar se separaron en la línea 1 con las correspondientes masas indicadas en kDA.

Definiciones

En la descripción, en las figuras y tablas que siguen, se utilizan una cantidad de expresiones y términos. Para suministrar la memoria descriptiva y las reivindicaciones, que incluyen el alcance que se dará a dichas expresiones y términos, se brindan las siguientes definiciones.

Tal como se usa en el presente documento, “un/una” puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el cual se utilice.

La expresión “rasgo agronómico” describe un rasgo fenotípico o genético de una planta que contribuye al rendimiento o valor económico de dicha planta. Dichos atributos incluyen resistencia a la enfermedad, resistencia a los insectos, resistencia a los virus, resistencia a los nematodos, tolerancia a la sequía, tolerancia a la alta salinidad, rendimiento, altura de la planta, días para madurar, clasificación del grano (es decir, fraccionamiento del tamaño del grano), contenido de nitrógeno del grano y similares.

El término “cebada” en referencia al proceso de elaboración de la cerveza, en particular cuando se utiliza para describir el proceso de malteado significa granos de cebada. En todos los demás casos, a menos que se especifique de otro modo, “cebada” significa la planta de la cebada (*Hordeum vulgare*, L.), que incluye cualquier variedad, mientras que parte de una planta de cebada puede ser cualquier parte de una planta de cebada, por ejemplo, cualquier tejido o células.

Una planta de “cereal”, tal como se define en el presente documento, es un miembro de la familia de plantas *Graminae*, cultivada principalmente por sus semillas con contenido de almidón. Las plantas de cereal incluyen, pero sin limitación, cebada (*Hordeum*), trigo (*Triticum*), arroz (*Oryza*), maíz (*Zea*), centeno (*Secale*), avena (*Oat*), sorgo (*Sorghum*) y tritical, un híbrido de centeno y trigo.

La sigla “DMSP” tal como se usa en el presente documento, es una abreviación del precursor de DMS o potencial de DMS, es decir, las moléculas que pueden convertirse en DMS durante la producción de bebidas. SMM representa la mayor parte de, si no todo, el DMSP. El nivel de DMSP se define en el presente documento como la cantidad de DMS que puede generarse a partir de DMSP en el material vegetal o producto del mismo al hacer hervir en condiciones alcalinas durante 1 h. Tal como se define en el presente documento, 1 ppm de DMSP puede convertirse en 1 ppm de DMS.

Las palabras “codificante” “codificada” o “se codifica” en el contexto de un ácido nucleico se refieren a que comprende la información para la traducción en la proteína especificada. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones) dentro de regiones traducidas del ácido nucleico o puede carecer de dichas secuencias intermedias no traducidas (por ejemplo, en ADNc). La información mediante la cual se codifica una proteína está especificada por el uso de los codones.

Tal como se usa en el presente documento, “expresión” en el contexto de los ácidos nucleicos se entenderá como la transcripción y acumulación de ARNm sentido o ARN antisentido que procede de un fragmento del ácido nucleico. La palabra “expresión” empleada en el contexto de las proteínas se refiere a la traducción del ARNm en un polipéptido.

El término “gen” significa el segmento de ADN involucrado en la producción de una cadena de polipéptido; que incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante (promotor y terminador). Asimismo, los genes vegetales son discontinuos con las proteínas codificadas por ellos, al consistir en exones interrumpidos por intrones. Después de la transcripción en ARN, se extraen los intrones mediante corte y empalme para generar un ARN mensajero maduro (ARNm). Los “sitios de corte y empalme” entre exones normalmente están determinados por secuencias consenso que actúan como señales de corte y empalme para el proceso de corte y empalme, que consiste en una eliminación del intrón a partir de la transcripción primaria de ARN y una unión o fusión de los extremos del ARN restante en cada uno de los lados del intrón cortado.

El término “germinación”, tal como se usa en el presente documento, significa el comienzo o reanudación del crecimiento de un grano de cebada en diversas composiciones, tales como el suelo normal como el que se encuentra en la naturaleza. La germinación también puede tener lugar en el suelo de macetas en cámaras de crecimiento y similares lugares o, por ejemplo, ocurrir sobre papel de filtro mojado colocado en placas de Petri comunes para laboratorio o durante el malteado (por ejemplo, en tanques cisterna o cajas de germinación de la fábrica de malteado). En general se comprende que la germinación incluye la hidratación de los granos, el hinchado de los granos y la inducción del crecimiento del embrión. Los factores medioambientales que afectan la germinación incluyen el nivel de humedad, la temperatura y el oxígeno. Se observa el desarrollo de la raíz y el brote.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado/a” significa que se extrae el material de su ambiente original. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un organismo vivo no está aislado, aunque el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición y seguir estando aislados porque dicho vector o composición no es parte de su ambiente natural.

Se define que el término “grano” comprende la cariósida del cereal, también designada como semilla interna, la lemma y la pálea. En la mayoría de las variedades de la cebada, la lemma y la pálea están adheridas a la cariósida y son parte del grano después del trillado. Sin embargo, también existen las variedades de cebada desnuda. En éstas, la cariósida está libre de la lemma y la pálea y se trilla libremente como el trigo. Los términos “pepita” y “grano” se utilizan de manera indistinta en el presente documento.

“Desarrollo del grano” se refiere al período en el ciclo de vida de la cebada que comienza con la fertilización, en la que se depositan las reservas metabólicas, por ejemplo azúcares, oligosacáridos, almidón, fenólicos, aminoácidos y proteínas, con y sin transporte vacuolar, hacia diversos tejidos del grano, por ejemplo endospermo, testa, aleurona y escudete, que llevan al agrandamiento de la pepita, llenado del grano y que culmina con la maduración y deshidratación del grano.

Las expresiones “pérdida total de MMT funcional” y “pérdida total de actividad de la MMT” hace referencia a la falta de actividad enzimática de la MMT, es decir, una planta de cebada sin actividad detectable de MMT cuando se utiliza el ensayo descrito en el ejemplo 2 a continuación, en el presente documento. Como alternativa, la actividad de la MMT de una planta de cebada se determina mediante el aislamiento del ADNc de la MMT de dicha cebada y la determinación acerca de que la proteína codificante mediante dicho ADNc sea capaz de catalizar la transferencia de un grupo metilo de SAM en Met, formando, por consiguiente, SMM.

La expresión “bebida de malta” hace referencia a las bebidas preparadas usando malta, opcionalmente en mezcla con otros ingredientes, tales como mezclas de cebada malteada y sin maltear, preferentemente bebidas preparadas con un método que incluya una etapa de incubación de la malta con agua caliente. La bebida de malta puede ser, por ejemplo, cerveza o maltina.

La expresión “bebida de malta fermentada” se refiere a una bebida de malta que ha sido fermentada, por ejemplo, incubada con levadura.

La expresión “actividad de la MMT” se refiere a la actividad enzimática de la enzima metionina S-Metiltransferasa de la cebada. En el contexto de la presente invención, “actividad de la MMT” es la metilación de la MMT catalizada en el átomo de azufre de Met para obtener SMM. A pesar de que la enzima de la MMT puede ser capaz de catalizar otras reacciones, con el fin de determinar la actividad de la MMT, de acuerdo con la presente invención, se deberá considerar solamente la actividad formadora de la SMM. La FIG. 1B señala las reacciones bioquímicas en las cuales Met se convierte en SMM mediante metilación.

El “malteado” es una forma especial de germinación de los granos de cebada que tiene lugar en condiciones ambientales controladas en, pero sin limitación, tanques cisterna y cajas de germinación de la fábrica de malteado. De acuerdo con el proceso de la presente invención, el malteado comienza su proceso durante y/o después de que haberse remojado los granos de cebada. El proceso del malteado puede detenerse al secar las pepitas de cebada, por ejemplo, en un proceso de secado al horno. En caso de que la malta no se haya secado al horno, se la denomina “malta verde”. Se entiende como que una composición de malta preparada a partir de cebada con MMT nula comprende malta con MMT nula, tal como malta pura con MMT nula o cualquier mezcla de malta que comprenda malta con MMT nula. La malta puede procesarse, por ejemplo, mediante molienda, en cuyo caso también puede denominarse “malta molida” o “harina”.

La “maceración” es la incubación de la malta molida en agua. La maceración se lleva a cabo, preferentemente, a una temperatura específica y en un volumen de agua específico para permitir la despolimerización enzimática deseada de los sustratos. La temperatura y el volumen de agua es importante, ya que esto afecta el índice de disminución de la actividad enzimática derivada de la malta y, por lo tanto, la cantidad de hidrólisis, especialmente de almidón, que puede tener lugar. La acción de la proteasa también puede ser importante. Puede tener lugar la maceración en presencia de complementos, entendiéndose que comprenden cualquier fuente de carbohidrato que no sea malta, tales como, pero sin limitación, cebada (incluso la cebada con MMT nula) o maíz o arroz ya sea como grano integral o productos procesados como salvado o almidón, todos ellos empleados principalmente como fuente adicional de extractos (normalmente los jarabes se dosifican durante la ebullición del mosto). Los requisitos para el procesamiento del complemento en las fábricas de cerveza dependen del estado y del tipo de complemento utilizado y en particular de las temperaturas de gelatinización y licuefacción del almidón. Si la temperatura de gelatinización es superior a la temperatura normal de la sacarificación de la malta, entonces el almidón se gelatiniza y licua antes de agregarse a la mezcla de granos molidos.

Cuando una mutación dada se fija como una característica genética homocigota, por ejemplo en la generación $\geq M3$, la planta de cebada correspondiente se denomina, en el presente documento y de manera indistinta, “mutante” o “línea mutada” o “línea”.

Las “mutaciones” incluyen eliminaciones, inserciones, sustituciones, transversiones y mutaciones puntuales en las regiones codificantes y no codificantes de un gen, en las cuales la región no codificante preferentemente es una región promotora o son intrones. Las eliminaciones pueden ser de todo el gen o solamente de una porción del gen. Las mutaciones puntuales conciernen a cambios de una base o de un par de bases y pueden dar como resultado codones de terminación, mutaciones por cambio del marco de lectura o sustituciones de aminoácidos. Las mutaciones somáticas son aquellas que suceden solamente en ciertas células o tejidos de la planta y no se heredan a la siguiente generación. Las mutaciones de línea germinal pueden encontrarse en cualquier célula de la planta y se heredan. Con referencia a la FIG. 7, que presenta una indicación de cómo pueden propagarse granos de cebada mutada en un programa de fitomejoramiento, los granos de M3, y los granos directamente propagados de los mismos o de cualquier generación posterior, incluyendo las plantas de los mismos, pueden denominarse “mutantes”.

en bruto". Además, aún en referencia a la FIG. 7 en el presente documento, "línea de fitomejoramiento" se refiere a granos de la generación M4 y cualquier generación posterior, incluyendo las plantas de la misma, que pueden ser el resultado del cruce con una planta de cultivo o el resultado del cruce con otra línea de fitomejoramiento con un rasgo específico separado.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "con MMT nula" se refiere a una pérdida total de enzima funcional metionina S-metil transferasa. Por lo tanto, una "planta de cebada con MMT nula" es una planta de cebada que comprende una mutación en el gen codificante de la MMT que da como resultado una pérdida total de la MMT funcional. De manera similar, los "granos con MMT nula" son granos que comprenden una mutación en el gen
10 codificante de la MMT, que da como resultado una pérdida total de la MMT funcional y así sucesivamente.

15 La expresión "partes de la planta de cebada", por ejemplo, comprendida dentro del significado de la frase "planta de cebada o una parte de la misma", incluye las células de la planta de cebada, los protoplastos de la planta de cebada, cultivo de tejido celular vegetal a partir del cual se pueden regenerar plantas de cebada, callos de la planta de cebada y células de la planta de cebada que están intactas en las plantas o partes más grandes de las plantas de cebada, tales como embrión, polen, óvulos, flores, granos, hojas, raíces, puntas de la raíz, anteras o cualquier parte de una planta.

20 La "PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es muy conocida por aquellos expertos en la técnica como una técnica empleada para la amplificación de segmentos específicos de ADN (Patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.800.159 de Mullis, K.B. et al.). También la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT)-PCR es muy conocida para aquellos entendidos en la técnica. El llevar a cabo una RT-PCR en una muestra biológica tiene por objeto detectar los ARNm expresados para un gen particular. En relación a la MMT, la
25 RT-PCR en general incluye obtener una muestra que se sospecha que contiene ARNm para MMT, mediante la realización de una RT-PCR en la muestra con una transcriptasa inversa, una polimerasa y un par de cebadores específicos, para amplificar el ARN, si está presente y detectar el producto de la amplificación como una indicación de la presencia del ARN codificante de la MMT en la muestra. Los cebadores trabajan por parejas: "cebador directo" (o "cebador de hebra superior") y "cebador inverso" (o "cebador de hebra inferior"). En el presente documento, las secuencias del cebador se proporcionan en dirección 5' a 3'.

30 Por la expresión "producto vegetal" se entiende un producto resultante del procesamiento de una planta o porción de una planta. Por ejemplo, dicho producto vegetal puede ser malta, mosto, una bebida fermentada o no fermentada, un alimento o un producto alimenticio.

35 Un "panel de especialistas catadores de cerveza" dentro del significado de la presente solicitud es un panel de especialistas extensamente entrenados en la cata y descripción de sabores de la cerveza, con especial atención en ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos, componentes de azufre y el cuerpo. A pesar de que existe una serie de herramientas analíticas para evaluar los componentes del sabor, es difícil de evaluar analíticamente el significado relativo de los componentes activos del sabor. Sin embargo, dichas propiedades del complejo pueden evaluarse por
40 los especialistas catadores. Su continuo entrenamiento incluye la cata y evaluación de muestras de cerveza estándar a las que se le adicionaron concentraciones específicas de componentes de la cerveza, por ejemplo, acetato de isoamilo, acetato de etilo, hexanoato de etilo e alcohol isoamílico.

45 Con la expresión "sitio de corte y empalme" se hace referencia a los límites entre exones e intrones de un gen. Por lo tanto, un sitio de corte y empalme puede ser el borde que va de exón a intrón, también denominado "sitio dador", o el borde que separa intrón de exón, también llamado "sitio aceptor". Normalmente, un sitio de corte y empalme en las plantas comprende secuencias consenso. El extremo 5' de un intrón, en general, consiste en un dinucleótido GT conservado (GU en el ARNm) y el extremo 3' de un intrón, usualmente consiste en un dinucleótido AG conservado. El sitio de corte y empalme 5' de un intrón comprende, de ese modo, el extremo 5' de un intrón y el sitio de corte y
50 empalme 3' comprende el extremo 3' de un intrón. Preferentemente, dentro del contexto de la presente invención, el sitio de corte y empalme de un intrón es cualquiera de estos dos:

- (i) el sitio de corte y empalme 5' que consiste en el dinucleótido más próximo al 5' del intrón, el cual en general es GT; o
- 55 (ii) el sitio de corte y empalme 3' que consiste en el dinucleótido más próximo al 3' del intrón, el cual —en general— es AG.

60 Los "sitios de corte y empalme ocultos" no se reconocen en condiciones normales y en consecuencia normalmente no causan corte y empalme. Sin embargo, en las transcripciones que portan mutaciones puntuales dentro de elementos naturales, dichos sitios pueden activarse para eventos de corte y empalme.

65 El "cultivo de tejido" indica una composición que comprende células aisladas del mismo o diferente tipo o una colección de dichas células organizadas en partes de una planta, por ejemplo, protoplastos, callos, embrión, polen, anteras y similares.

La “cebada de tipo silvestre”, *Hordeum vulgare ssp. spontaneum*, es considerada la madre de las formas cultivadas de cebada de la actualidad. Se piensa que la transición de la cebada de un estado de tipo silvestre a un estado cultivado ha coincidido con la domesticación de la planta en “variedades locales de la cebada”. Estas están genéticamente más estrechamente relacionadas con las modernas variedades cultivadas que la cebada de tipo silvestre.

La expresión cebada de “tipo de tipo silvestre” se refiere a una planta de cebada generada convencionalmente; preferentemente, la expresión se refiere a la planta de cebada a partir de la cual han derivado las plantas de cebada de la presente invención, es decir, las plantas madres. Los granos de cebada de tipo de tipo silvestre en general están disponibles a través de, por ejemplo, empresas de semillas en forma de “variedades de cultivo” (frecuentemente abreviado “vc.”), es decir, aquellos granos genéticamente similares que aparecen en las listas de las organizaciones nacionales de fitomejoramiento. Los términos “variedad cultivada” y “variedad” se emplean de manera indistinta en el presente documento.

Con el término “mosto” se denomina a un extracto líquido de malta, por ejemplo, malta molida o malta verde o malta verde molida. Además de dicha malta, el extracto líquido puede prepararse a partir de malta y componentes adicionales, tal como material que contiene almidón adicional convertido en parte en azúcares fermentables. El mosto, en general, se obtiene por maceración, opcionalmente seguida de “lavado de bagazo”, es decir, el proceso de extracción de azúcares residuales y otros compuestos del grano de desecho después de mezclar los granos molidos con agua caliente. El lavado de bagazo, normalmente, se lleva a cabo en un tanque de filtrado, un filtro para mezcla de granos molidos u otro aparato que permita la separación del líquido extraído del grano de desecho. El mosto obtenido después de la maceración, en general, se denomina “primer mosto”, mientras que el mosto obtenido después del lavado de bagazo, en general, se denomina “segundo mosto”. En caso de no especificarse, el término mosto puede referirse al primer mosto, al segundo mosto o a una combinación de ambos. Durante la producción de cerveza, el mosto en general se somete a ebullición junto con el lúpulo. El mosto que no se somete a ebullición con lúpulo también puede denominarse “mosto dulce”, mientras que el mosto que se somete a ebullición con o sin lúpulo, puede denominarse “mosto hervido”.

Planta de cebada

La cebada es una familia de plantas. La cebada de tipo silvestre, *Hordeum vulgare ssp. spontaneum*, se considera la madre de las formas cultivadas de la cebada en la actualidad. La transición de la cebada de un estado de tipo silvestre a un estado cultivada se cree que ha coincidido con un cambio radical de frecuencia de alelo en numerosos locus. Los granjeros seleccionaron positivamente alelos raros y nuevos eventos mutacionales, quienes rápidamente establecieron los nuevos atributos de las poblaciones de la planta domesticada, denominada “variedades locales de la cebada”. Estas están genéticamente más estrechamente relacionadas con las modernas variedades cultivadas que la cebada de tipo silvestre. Hasta fines del siglo XIX, las variedades locales de la cebada existieron como mezclas altamente heterogéneas de líneas endogámicas y segregados híbridos, inclusive pocas plantas derivadas de cruzamiento aleatorio en generaciones anteriores. La mayoría de las variedades locales han sido desplazadas en agriculturas avanzadas por variedades cultivadas de línea pura. Niveles intermedios o altos de diversidad genética caracterizan las variedades locales restantes. Inicialmente, las variedades cultivadas de “cebada moderna” representaron selecciones de variedades locales. Estas luego se derivaron de sucesivos ciclos de cruces entre líneas puras establecidas, tales como aquellas de orígenes geográficos diversos. Eventualmente, el resultado fue un marcado estrechamiento de la base genética en muchas, probablemente todas, las agriculturas avanzadas. Comparadas con las variedades locales, las variedades cultivadas de cebada moderna tienen numerosas propiedades mejoradas (Nevo, 1992; von Bothmer, 1992), por ejemplo, pero sin limitación:

- (i) granos cubiertos y desnudos;
- (ii) latencia de la semilla;
- (iii) resistencia a enfermedades;
- (iv) tolerancia medioambiental (por ejemplo, a las sequías o al pH del suelo);
- (v) proporciones de lisina y otros aminoácidos;
- (vi) contenido de proteína;
- (vii) contenido de nitrógeno;
- (viii) composición de carbohidratos;
- (ix) composición de hordeínas.

Dentro de la presente invención, el término “cebada” comprende cualquier planta de cebada. Por lo tanto, la invención se refiere a cualquier planta de cebada que porta una mutación en el gen codificante de la MMT, que da como resultado una pérdida total de la MMT funcional.

Sin embargo, las plantas de cebada preferidas para su uso con la presente invención son las modernas variedades cultivadas de cebada o las líneas puras. La variedad cultivada de cebada que se utilizará con la presente invención puede seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que consiste en *Sebastian, Celeste, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan*

Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata Núm. 2, Kirin-choku Núm. 1, Kanto variedad tardía Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo Núm. 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett, Quench, NFC Tipple y Jersey preferentemente del grupo que consiste en *Haruna Nijo, Sebastian, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Power, Quench y NFC Tipple*.

5 Por consiguiente, en una realización, dicha planta es una variedad cultivada de cebada moderna que porta una mutación en el gen codificante de la MMT, que da como resultado una pérdida total de la MMT funcional, preferentemente una variedad cultivada seleccionada del grupo de variedades cultivadas de cebada descrito anteriormente en el presente documento. En esta realización, por lo tanto, se prefiere que la planta de cebada no sea una variedad local de cebada.

10 La planta de cebada puede estar en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la planta de cebada, de acuerdo con la invención puede ser una planta de cebada viable, una planta seca, una planta homogeneizada o un grano de cebada molido. La planta puede ser una planta madura, un embrión, un grano germinado, un grano malteado, un grano malteado molido o similar.

15 Las partes de las plantas de cebada pueden ser cualquier parte adecuada de la planta, tal como granos, embriones, hojas, tallos, raíces, flores o fracciones de los mismos. Una fracción puede ser, por ejemplo, una sección de un grano, embrión, hoja, tallo, raíz o flor. Una parte de una planta de cebada puede también ser una fracción de un homogenato, una fracción de un extracto o una fracción de una planta o grano de cebada molido.

20 En una realización, las partes de plantas de cebada pueden ser células de dicha planta de cebada, preferentemente células viables que pueden propagarse *in vitro*, por ejemplo, en cultivos de célula o tejido. En particular, en una realización, dichas células pueden ser células que no son capaces de madurar en una planta de cebada completa, es decir, células que no son un material reproductivo.

Pérdida de la enzima MMT funcional

30 La presente memoria descriptiva se refiere a productos vegetales, tales como bebidas preparadas a partir de plantas de cebada o partes de las mismas, donde dichas plantas de cebada portan una mutación en el gen de la MMT, lo que da como resultado la pérdida de la enzima MMT funcional, por ejemplo pérdida de al menos 90 % de actividad de la MMT, preferentemente al menos 97 %, más preferentemente al menos 99 %, aún más preferentemente al menos 99,5 % de actividad de la MMT comparada con el correspondiente nivel en la cebada de tipo de tipo silvestre, preferentemente comparada con cualquiera de las variedades cultivadas de cebada del tipo de tipo silvestre descritas en el presente documento con anterioridad, más preferentemente comparada con cebada de tipo de tipo silvestre vc. Prestige. Lo más preferentemente, dicha planta de cebada porta una mutación en el gen codificante de la MMT, lo que da como resultado una pérdida total de la función de la MMT.

40 La pérdida total de una enzima MMT funcional puede basarse en diferentes mecanismos. Por ejemplo, la pérdida total de la enzima MMT funcional puede ser el resultado de una proteína con función anormal en dicha planta, es decir, una enzima MMT con función anormal, tal como una proteína de MMT mutante sin actividad detectable. Por ejemplo, la proteína de MMT del mutante puede ser una proteína truncada. La pérdida de actividad de la MMT puede basarse, de manera similar, en diferentes mecanismos, por ejemplo, en la proteína de MMT con función anormal.

45 Preferentemente, la actividad de una proteína de MMT mutada se determina por su capacidad de catalizar la transferencia de un grupo metilo de SAM en Met, formando, en consecuencia, SMM. Esto, por ejemplo, puede abordarse de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 4 que se encuentra a continuación. Preferentemente, la secuencia de aminoácido de una MMT mutada se obtiene al determinar la secuencia traducida del correspondiente ADNc de la cebada aislada. Esto puede llevarse a cabo, en esencia, de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 8 que se encuentra a continuación. Como alternativa, la MMT mutada de una planta de cebada de la invención se obtiene por expresión heteróloga en un cultivo de células bacterianas, de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 11 y en el ejemplo 12 que se encuentran a continuación, para luego verificar que la proteína recombinante es inactiva como enzima MMT.

55 La pérdida total de la MMT funcional puede materializarse por la falta de proteína de MMT. La falta de proteína de MMT conducirá a la pérdida de la función de MMT. Por lo tanto, la planta de cebada puede comprender nada o solamente muy poco de la proteína de MMT, preferentemente una cantidad no detectable de proteína de MMT. La presencia o ausencia de proteína de MMT puede detectarse por cualquier medio adecuado conocido para una persona experta en la técnica. Sin embargo, la/s proteína/s preferentemente se analiza/n mediante técnicas en las cuales se detecta la proteína de MMT con anticuerpos específicos que reconocen la MMT. Dichas técnicas pueden ser, por ejemplo, método de transferencia de Western o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y dichos anticuerpos específicos pueden ser monoclonales o policlonales. Preferentemente, sin embargo, dichos anticuerpos son policlonales que reconocen diferentes epítopes dentro de la proteína de MMT. Esto también puede detectarse de manera indirecta, por ejemplo, con métodos para la determinación de actividad de MMT. De este modo, en una realización preferida de la invención, se dice que una planta de cebada porta una mutación en el gen codificante de la MMT lo que en consecuencia causa una pérdida total de actividad de la MMT, cuando en dicha planta no es

detectable la proteína de MMT. En particular, este es el caso cuando en dicha planta de cebada no es detectable proteína de MMT con una masa aproximada de 120 kD, $\pm 10\%$, preferentemente en pepitas de dicha planta de cebada, de acuerdo con lo analizado por el método de transferencia de Western.

5 La pérdida total de MMT funcional también puede ser un resultado de nada o muy poca transcripción de un ARNm de la MMT, preferentemente nada de transcripción de un ARNm de la MMT. El experto reconocerá que la ausencia de un transcrito de la MMT también dará como resultado la ausencia de la proteína MMT.

10 Preferentemente, sin embargo, la pérdida total de MMT funcional es un resultado de expresión de un transcrito de MMT aberrante. Dicho transcrito puede estar causado, preferentemente, por un evento de corte y empalme aberrante del transcrito primario, por ejemplo, debido a una mutación en un sitio de corte y empalme. La expresión de transcritos codificantes de MMT pueden detectarse, por ejemplo, con el método de transferencia de Northern o con métodos de RT-PCR.

15 La pérdida total de MMT funcional en las plantas de cebada de la presente invención está causada por una o más mutaciones. De este modo, las plantas de cebada de la presente invención, en general, portan al menos una mutación en el gen de la MMT. Dicha/s mutación/es puede/n estar en regiones regulatorias, por ejemplo, dentro del promotor o intrones o dicha/s mutación/es puede/n estar en la región codificante de la proteína. De este modo, la pérdida de MMT funcional también puede detectarse al analizar las mutaciones en el gen codificante de la MMT. Las mutaciones en el gen codificante de la MMT pueden detectarse, por ejemplo, mediante secuenciación de dicho gen, para luego compararlo con la secuencia de tipo de tipo silvestre, preferentemente la secuencia de tipo de tipo silvestre de vc. Prestige proporcionada en el presente documento como SEC ID NO: 3 o la de la vc. Sebastian (SEC ID NO: 16). Preferentemente, después de identificar una mutación, la pérdida de función se confirma mediante pruebas para conocer la actividad de la MMT, por ejemplo, de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 2 o el ejemplo 4.

25 La expresión proteína de MMT, tiene la intención de cubrir la proteína de MMT de extensión completa de la cebada de acuerdo con lo expresado en la SEC ID NO: 6 o un homólogo funcional de la misma. En este contexto, un homólogo funcional es una proteína de MMT con el mismo nivel de actividad de la MMT, $\pm 25\%$, que la proteína de MMT de la cebada, de acuerdo con lo expresado en la SEC ID NO: 6, en la que la actividad de la MMT se determina de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 2 o el ejemplo 4 mencionado a continuación.

30 La planta de cebada con pérdida de al menos 90 %, tal como 95 %, por ejemplo 99 %, tal como 99,5 % de actividad de la MMT o con pérdida total de actividad de la MMT puede comprender una forma en parte funcional o preferentemente una forma no funcional, una forma truncada de MMT, tal como una forma truncada N-terminal o una forma truncada C-terminal. Una planta de cebada puede comprender más de una forma truncada de MMT, tal como 2 o por ejemplo 3 o tal como más de 3 formas truncadas diferentes de MMT, las cuales pueden resultar de las transcripciones ensambladas de manera aberrante. Dichas formas truncadas comprenden solamente un fragmento N-terminal de la MMT. Además del fragmento N-terminal de la MMT de tipo de tipo silvestre, dichas formas truncadas de la MMT pueden comprender secuencias C-terminal adicionales que no se encuentran en la MMT del tipo de tipo silvestre. Dichas secuencias C-terminales adicionales pueden traducirse, por ejemplo, en secuencias, tales como aquellas comprendidas en el ARNm mutante debido a corte y empalme aberrante. Preferentemente, dichas formas truncadas de MMT comprenden a lo sumo los 500, más preferentemente a lo sumo los 450, incluso más preferentemente a lo sumo los 400, todavía más preferentemente a lo sumo los 350, incluso más preferentemente a lo sumo los 320, todavía más preferentemente a lo sumo 311 o como máximo, 288 restos de aminoácido N-terminal de la SEC ID NO: 6. Esto se da en particular en el caso cuando dicha planta de cebada tiene una pérdida total de actividad de la MMT. Sin embargo, la MMT también puede comprender menos, tal como no más de 300, por ejemplo no más de 250, tal como no más de 200, por ejemplo a lo sumo los 150, por ejemplo no más de 147 o no más de 133 aminoácidos N-terminal de SEC ID NO: 6.

40 En una realización muy preferida, la forma truncada de la MMT puede consistir en 1 a 311 aminoácidos o 1 a 288 aminoácidos de SEC ID NO: 6 y opcionalmente secuencias adicionales C-terminal no presentes en la MMT de tipo de tipo silvestre. Preferentemente, dichas secuencias adicionales C-terminales consisten en a lo sumo 50, más preferentemente a lo sumo en 30, incluso más preferentemente a lo sumo en 10, todavía más preferentemente a lo sumo en 4 o como máximo, en 1 aminoácido. En una realización muy preferida, la forma truncada de la MMT puede ser la proteína de acuerdo con la SEC ID NO: 11 o la SEC ID NO: 13 o la SEC ID NO: 15. Ninguna de las proteínas de la SEC ID NO: 11 o de la SEC ID NO: 13 o de la SEC ID NO: 15 son enzimas de la MMT funcional.

50 En otra realización muy preferida, la forma truncada de la MMT puede consistir en 1 a 147 aminoácidos o en 1 a 133 aminoácidos, de la SEC ID NO: 18 y opcionalmente de secuencias adicionales C-terminal que no están presentes en la MMT del tipo de tipo silvestre. Preferentemente, dichas secuencias adicionales C-terminal consisten en a lo sumo 50, más preferentemente a lo sumo 40, incluso más preferentemente a lo sumo 39 o a lo sumo 33 o como máximo, 30 aminoácidos. En una realización muy preferida, la forma truncada de la MMT puede ser la proteína de acuerdo con la SEC ID NO: 22 o la SEC ID NO: 24 o la SEC ID NO: 26. Ninguna de las proteínas de la SEC ID NO: 22 o de la SEC ID NO: 24 o de la SEC ID NO: 26 son enzimas de MMT funcionales.

65

Las formas truncadas anteriormente mencionadas de la MMT pueden estar presentes, por ejemplo, en una planta de cebada portadora de una mutación en el gen codificante de la MMT, en la cual dicha mutación introduce un codón de terminación prematura, lo que da como resultado un gen codificante de las formas truncadas anteriormente mencionadas de la MMT.

5 En una realización preferida de la invención, la planta de cebada comprende un gen que está transcrito en el ARNm, el cual comprende algunos, aunque no todos, los genes de la MMT del tipo de tipo silvestre ensamblados entre sí sin intervención (la estructura intrón-exón del gen de la MMT del tipo de tipo silvestre de la cebada aparece en la FIG.

10 **9**). En una realización, en consecuencia, se prefiere que el ARNm de la MMT de la planta de cebada, de acuerdo con la invención comprenda, a lo sumo los exones 1, 2, 3, 4 y 5 ensamblados juntos sin intervención o, por ejemplo, a lo sumo los exones 1 y 2 ensamblados entre sí sin intervención. Además de dichos exones ensamblados entre sí, el ARNm de la MMT de la planta de cebada de acuerdo con la invención, comprende secuencias adicionales terminal 3' derivadas a partir de intrones y/o exones de tipo de tipo silvestre, en los cuales los intrones separen secuencias de exones. En la FIG. **12** y la FIG. **16** se ilustran ejemplos preferidos de ARNm de la MMT aberrante de plantas de cebada de acuerdo con la invención y según queda determinado por la RT-PCR y de conformidad con las longitudes del fragmento en pb. Más preferentemente, los ARNm aberrantes de las plantas de cebada, de acuerdo con la invención, son aquellos ilustrados en la FIG. **12**, que comprenden, además los exones 1 y 2 en el extremo 5' o los ARNm ilustrados en la FIG. **16**, que comprenden, además al exón 1 en el extremo 5'.

20 En una realización muy preferida de la presente invención, la planta de cebada portadora de una mutación en el gen para la MMT comprende una mutación en un sitio de corte y empalme dentro del gen de la MMT, el cual da como resultado ARNm cortado y empalmado de manera aberrante. Más preferentemente, dicha mutación se posiciona en un intrón del gen de la MMT, incluso más preferentemente en el sitio de corte y empalme 5' de un intrón, tal como en el sitio de corte y empalme 5' en el intrón 1 (el intrón que separa los exones 1 y 2), tal como en el sitio de corte y empalme 5' en el intrón 2 (el intrón que separa los exones 2 y 3), tal como en el sitio de corte y empalme 5' en el intrón 3 (el intrón que separa los exones 3 y 4), tal como en el sitio de corte y empalme 5' en el intrón 4 (el intrón que separa los exones 4 y 5), tal como en el sitio de corte y empalme 5' en el intrón 5 (el intrón que separa los exones 5 y 6), tal como en el sitio de corte y empalme 5' en el intrón 6 (el intrón que separa los exones 6 y 7), lo más preferentemente en el sitio de corte y empalme 5' en el intrón 2 o en el intrón 5.

30 Se prefiere que dicha mutación sea una mutación G→A de la base terminal 5' de los intrones anteriormente mencionados. De este modo, una mutación muy preferida es una mutación G→A de la base terminal 5' del intrón 2 o una mutación G→A de la base más próxima al 5' del intrón 5.

35 La planta de cebada, de acuerdo con la invención, puede prepararse con cualquier método adecuado conocido para la persona entendida en la técnica, preferentemente con el método señalado en el presente documento a continuación en la sección "Preparación de las plantas de cebada con una pérdida total de MMT funcional".

40 En una realización, se prefiere que las plantas de cebada con pérdida total de actividad de la MMT, de acuerdo con la presente invención, tengan características fisiológicas y de desarrollo del grano y de la planta comparables a la cebada del tipo de tipo silvestre. Entonces, por lo tanto se prefiere que la planta de cebada con MMT nula sea similar a la cebada de tipo de tipo silvestre con respecto a las características importantes a nivel agrícola, tales como la altura de la planta, el número de macollos por planta, comienzo de la floración y/o número de granos por espiga.

45 En una realización muy preferida, el gen codificante de la MMT de la planta de cebada de acuerdo con la invención tiene la secuencia tal como se expone en la SEC ID NO: 8. De este modo, se prefiere que la planta de cebada de acuerdo con la invención porte una mutación G→A de la base núm. 3076 de la SEC ID NO: 3 (en la que la SEC ID NO: 3 es la secuencia genómica del tipo de tipo silvestre para la MMT de la cebada, vc. Prestige).

50 Un ejemplo preferido de una planta de cebada que tiene una pérdida total de actividad de la MMT, es la planta de cebada depositada el 13 de octubre de 2008 en la Colección norteamericana de cultivos tipo (ATCC, *American Type Culture Collection*), Depositario de patentes, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, Estados Unidos y denominadas "Cebada, *Hordeum vulgare*; Línea 8063". De este modo, la planta de cebada de la invención puede ser línea 8063 de cebada depositada en la ATCC el 13 de octubre de 2008 (Designación de depósito de patente de la ATCC: PTA-9543) o cualquier otra planta de cebada de la progenie de la misma, en la que el gen codificante de la MMT de la planta de cebada de acuerdo con la invención, tiene la secuencia tal como se expone en la SEC ID NO: 8.

60 En una realización muy preferida, el gen codificante de la MMT de la planta de cebada de acuerdo con la invención tiene la secuencia tal como se expone en la SEC ID NO: 19. De este modo, se prefiere que la planta de cebada de acuerdo con la invención porte un mutación G→A en la base núm. 1462 de la SEC ID NO: 16 (en la que la SEC ID NO: 16 es la secuencia genómica del tipo de tipo silvestre para la MMT de la cebada, vc. Sebastian).

Preparación de las plantas de cebada con una pérdida total de MMT funcional

La planta de cebada con pérdida total de MMT funcional puede prepararse mediante cualquier método adecuado conocido para el experto en la técnica. Preferentemente, la planta de cebada de la invención se prepara mediante un método que comprende las etapas de mutagenizar plantas de cebada, partes de las mismas, por ejemplo, granos de cebada, para luego detectar y seleccionar plantas de cebada de individuos con pérdida total de actividad de la MMT. De manera interesante, la presente invención se refiere, en un aspecto, a un nuevo y muy eficiente método de detección que permite la identificación de dichas plantas de cebada.

Por consiguiente, la presente memoria descriptiva proporciona métodos de preparación de una planta de cebada que porte una mutación en el gen de la MMT, el cual causa una pérdida total de actividad de la MMT. Dichos métodos comprenden las etapas de:

- (i) mutagenizar plantas de cebada y/o células de cebada y/o tejido de cebada y/o granos de cebada y/o embriones de cebada, para obtener de este modo, la cebada de generación M0; y
- (ii) propagar (por ejemplo, por fitomejoramiento) dichas plantas de cebada, granos y/o embriones mutagenizados durante ≥ 2 generaciones, para obtener de este modo plantas de cebada de la generación Mx, en la que x es un número entero ≥ 2 ; y
- (iii) obtener una muestra de dichas plantas de cebada de Mx; y
- (iv) determinar el nivel de SMM en dicha muestra; y
- (v) seleccionar plantas en las cuales la muestra comprende menos de 10 ppm de SMM, preferentemente menos de 5 ppm de SMM, más preferentemente SMM no detectable; y
- (vi) secuenciar al menos parte del gen de la MMT; y
- (vii) seleccionar plantas que porten una mutación en el gen de la MMT;

obteniendo de este modo una planta de cebada que porte una mutación en el gen de la MMT que cause una pérdida total de la MMT funcional.

El paso (i) enumerado anteriormente puede implicar mutagenizar el material vivo de la cebada seleccionado del grupo que consisten en plantas de cebada, células de cebada, tejido de cebada, pepitas de cebada y embriones de cebada, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en plantas de cebada, pepitas de cebada y embriones de cebada, más preferentemente pepitas de cebada. La mutagénesis puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado. En una realización, la mutagénesis se lleva a cabo al incubar una planta de cebada o una parte de ella, por ejemplo, granos de cebada o células individuales de cebada, con un agente mutagenizante. Dichos agentes son conocidos para la persona entendida en la técnica y puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en azida sódica (NaN_3), etil-metano-sulfonato (EMS), azidaglicerol (AG), metilnitrosourea (MNU) y hidrazida maleica (MH).

En otra realización, la mutagénesis se lleva a cabo mediante irradiación, por ejemplo, con luz ultravioleta, una planta de cebada o una parte de ella, tal como el grano. En realizaciones preferidas de la invención, la mutagénesis se lleva a cabo de acuerdo con cualquiera de los métodos señalados en el presente documento a continuación en la sección "Mutagénesis química". Un ejemplo no limitante de un protocolo adecuado de mutagénesis se proporciona en el ejemplo 1 de la patente de Estados Unidos n.º 7.420.105 de Breddam, K. et al., así como también en el ejemplo 2 a continuación en el presente documento.

Se prefiere que la mutagénesis se lleve a cabo de una manera tal que la frecuencia esperada de los mutantes deseados sea al menos de 0,5, tal como en el intervalo comprendido entre 0,5 y 5, por ejemplo en el intervalo que varía entre 0,9 y 2,3 por 10.000 granos, cuando se detecta cebada de generación M3.

En una realización preferida, los granos de cebada están mutagenizados. Estos se denominan la generación M0 (véase también la FIG. 7).

Después de la mutagénesis, se seleccionan plantas de cebada o partes de ellas, sin actividad detectable de la MMT. Preferentemente, la selección comprende obtener una muestra de una planta de cebada, preferentemente de una planta de cebada germinada, incluso más preferentemente de una planta de cebada, la cual ha germinado durante 4 días. Se prefiere que la muestra sea de un coleóptilo y/o de una hoja primaria, preferentemente de una hoja. De este modo, la muestra puede, por ejemplo, estar comprendida en el intervalo que varía entre 1 cm y 3 cm de tejido foliar.

La muestra puede extraerse y analizarse siguiendo un protocolo de múltiples pasos recientemente desarrollado, de acuerdo con su descripción en el presente documento, que involucra el sucesivo uso de diferentes disolventes y materiales aglutinantes. En general, la muestra puede extraerse, por ejemplo con un disolvente o una mezcla de disolventes, preferentemente agua y/o disolventes orgánicos. El disolvente orgánico puede ser, por ejemplo, un alcohol, preferentemente metanol o el disolvente orgánico puede ser, por ejemplo, un haluro de alquilo, preferentemente cloroformo. En una realización preferida, el disolvente es una mezcla de agua, metanol y cloroformo. Dicha extracción puede llevarse a cabo de manera favorable mientras se mezcla, por ejemplo, usando una agitadora o una mezcladora. Puede agregarse un soporte sólido al disolvente/mezcla de muestra, por ejemplo,

una perla, tal como una perla de vidrio.

En una realización preferida, la hoja de muestra anteriormente mencionada se obtiene de los granos de la generación M_x, en la que x es un número entero ≥ 2 , preferentemente en el intervalo que varía entre 2 y 10, más preferentemente en el intervalo que oscila entre 3 y 8. En una realización muy preferida, el nivel de SMM se determina en las plantas germinadas del grupo M3 o en muestras de las mismas (tales como hojas). En dicha realización, se prefiere que los granos de cebada mutagenizados de la generación M0 crezcan para obtener plantas de cebada, las cuales posteriormente se cruzan para obtener granos de la generación M1. Se repite el procedimiento hasta que estén disponibles los granos de la generación M3 (véase la FIG. 7).

La determinación del nivel de SMM está preferentemente basada en el procedimiento novedoso descrito a continuación. De manera interesante este método permite detecciones de alto rendimiento, lo que hace posible la identificación de las plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de la MMT funcional.

En términos generales, el método preferentemente abarca que hacer reaccionar la muestra o preferentemente un extracto de dicha muestra, preparada de acuerdo con lo descrito anteriormente, con un compuesto capaz de ligar SMM. Se descubrió que el reactivo OPA (Sigma, número de catálogo P7914; véase la FIG. 2), que se encuentra a continuación denominado OPA, es particularmente útil para determinar los niveles de SMM. OPA reacciona, entre otros, con SMM para formar la molécula denominada SMM-OPA (véase la FIG. 2). La reacción (preferentemente) incluye incubar OPA con un extracto de la muestra preparada de acuerdo con lo descrito anteriormente. Además, se prefiere que el ácido 3-mercapto-propiónico se agregue a la mezcla de la reacción. Preferentemente, la mezcla se mantiene a un pH alcalino, preferentemente en el intervalo de pH 8 a pH 11, más preferentemente en el intervalo de pH 9 a pH 11, incluso más preferentemente en el intervalo de pH 9,5 a pH 10,5, tal como a pH 10. La incubación (preferentemente) se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 0 °C a 10 °C, preferentemente en el intervalo comprendido entre 1 °C y 8 °C, incluso más preferentemente en el intervalo entre 2 °C y 6 °C, aún más preferentemente en el intervalo entre 3 °C y 5 °C, tal como a 4 °C. El tiempo de incubación es preferentemente ≥ 10 min.

Basándose en la observación de que SMM-OPA absorbe y emite luz de 340 nm y 450 nm, respectivamente, su detección fue posible gracias al uso de espectroscopía de fluorescencia. El proceso inicial de detección involucra preferentemente la separación del extracto en una columna, preferentemente en una columna de 3 μ C18 Gemini, de 30 x 2 mm (Phenomenex, número de catálogo 00A-4439-80; Phenomenex, 2006), seguida de detección de fluorescencia con uso de un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento, preferentemente una cromatografía líquida de muy alto rendimiento (sistema de UPLC, Waters), diseñada para identificar y medir el nivel de fluorescencia de las moléculas que tienen excitación a 340 nm y emisión a 450 nm. Cuando se utiliza este método, "SMM no detectable" significa la ausencia de compuestos detectables que se eluyen conjuntamente con SMM. En este contexto, un pequeño "margen" en un pico del cromatograma se considera un pico artificial. Un pequeño margen sobre el lado derecho del pico Asn/Ser, véase FIG. 3, no se considera, por lo tanto, que represente un pico de SMM. De esta manera y a modo de ejemplo, los dos cromatogramas superiores, de acuerdo con lo que aparece en la FIG. 3B se considera que representan "SMM no detectable", mientras que el cromatograma inferior en dicha figura representa la separación de una muestra que comprende SMM.

La detección de SMM puede realizarse preferentemente tal como se describe en el ejemplo 2. Un método preferido para seleccionar plantas de cebada de acuerdo con la invención se describe a continuación en el ejemplo 2 entre una planta de cebada en germinación, incluso más preferentemente entre una planta de cebada, la cual ha germinado durante 4 d. Es destacable que el método de detección anteriormente mencionado es particularmente útil. Ante todo, el método analítico es novedoso. Asimismo, es una ventaja significativa del método anteriormente mencionado que se establece para la determinación de niveles de SMM en plantas de cebada en germinación, tales como hojas de plantas de cebada en germinación. El momento de la recogida de muestras de cebada en germinación hace de la preparación una operación inesperadamente limpia para la detección de SMM basándose en la UPLC. Otras muestras, por ejemplo, las muestras de mosto de granos similares, de acuerdo con lo descrito anteriormente, son muy complejas en su composición y pueden, en general, no ser utilizadas en el método de cromatografía mencionado para la determinación de niveles de SMM.

Después de la identificación de una planta de cebada que tiene menos de 10 ppm de SMM, preferentemente SMM no detectable, el gen correspondiente de la MMT o parte del mismo, normalmente se somete a secuenciación para determinar si la planta de cebada en cuestión puede clasificarse como poseedora de una mutación en el gen de la MMT. Luego se seleccionan las plantas de cebada caracterizadas por tener SMM no detectable y en las cuales una o más bases del gen codificante de la MMT son diferentes en comparación con la secuencia del tipo de tipo silvestre. En este contexto, la secuencia del tipo de tipo silvestre es preferentemente la secuencia encontrada en la correspondiente variedad cultivada de cebada del tipo de tipo silvestre, preferentemente la secuencia proporcionada en el presente documento como la SEC ID NO: 3. Las mutaciones preferidas se han descrito anteriormente en el presente documento.

También pueden propagarse los mutantes de cebada seleccionados y puede volver a detectarse el contenido de SMM en las plantas de las generaciones posteriores. Después de la selección de plantas de cebada útiles, éstas

pueden incluirse en los programas de fitomejoramiento con el uso de aquellos métodos convencionales que se describen a continuación, en la sección “mejoramiento génico vegetal”.

Productos vegetales

5 En un aspecto, la presente memoria descriptiva se refiere a bebidas u otros productos vegetales con bajos niveles de DMS, preparados a partir de plantas de cebada o partes de las mismas, que portan una mutación en el gen para la MMT, lo que origina una pérdida total de la función de la MMT. De manera interesante, dichos productos vegetales en general comprenden niveles muy bajos de DMS y también preferentemente niveles muy bajos de DMSO. Sin supeditarse a ninguna teoría, los solicitantes reconocen que la ausencia de SMM derivada de malta y cebada da como resultado niveles muy bajos de DMS en bebidas y también en otros productos vegetales preparados a partir de dicha cebada, caracterizados por la pérdida de una enzima MMT funcional. Los ejemplos de los productos vegetales útiles, tales como bebidas, preparados a partir de plantas de cebada, que tienen una pérdida total de actividad de la MMT, se describen a continuación en el presente documento.

15 Se prefiere que dichas bebidas o dichos productos vegetales, contengan:

- (i) menos del 30 %, preferentemente menos del 20 %, más preferentemente menos del 15 %, incluso más preferentemente menos del 10 % de DMS; y/o
- 20 (ii) menos del 30 %, preferentemente menos del 20%, más preferentemente menos del 15 %, incluso más preferentemente menos del 10 %; tal como menos del 5 %; por ejemplo, menos del 2 % de SMM;

del contenido de DMS y SMM, respectivamente, de una bebida o producto vegetal similar, preparado a partir de plantas de cebada de tipo silvestre.

25 Es incluso más preferible que dichas bebidas o dichos productos vegetales, contengan:

- (i) menos de 30 ppm, preferentemente menos de 25 ppm, más preferentemente menos de 20 ppm, incluso más preferentemente menos de 15 ppm, aún más preferentemente menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm de DMS; aún más preferentemente DMS no detectable; y/o
- 30 (ii) menos de 50 ppm, preferentemente menos de 40 ppm, más preferentemente menos de 30 ppm, incluso más preferentemente menos de 20 ppm, aún más preferentemente menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm de DMS; incluso más preferentemente SMM no detectable.

35 Además, se prefiere que el producto vegetal comprenda menos del 30 %, preferentemente menos del 20 %, más preferentemente menos del 15 %, aún más preferentemente menos del 10 % del contenido de DMSO de una bebida o producto vegetal similar preparado a partir de plantas de cebada de tipo silvestre.

40 En un aspecto, el producto vegetal puede ser granos de cebada que portan una mutación que da como resultado una pérdida total de MMT funcional. El producto vegetal también puede ser composiciones que comprenden dichos granos y composiciones preparadas a partir de dichos granos, así como otros productos vegetales preparados a partir de dichos granos.

45 En un aspecto, el producto vegetal de acuerdo con la invención es una composición de malta preparada por malteado de los granos de las plantas de cebada que portan una mutación en el gen codificante de la MMT, lo que causa una pérdida total de actividad de la MMT. Por el término “malteado” hace referencia a la germinación de granos de cebada remojados, que tiene lugar en condiciones ambientales controladas (por ejemplo, tal como se ilustra en la FIG. 8).

50 El malteado es un proceso de remojo y germinación controlado, seguido de secado (preferentemente secado al horno) del grano de cebada. Antes del secado, los granos de cebada remojados y germinados se denominan “malta verde”, que también pueden ser un producto vegetal de acuerdo con la presente invención. Esta secuencia de eventos es importante para la síntesis de numerosas enzimas que causan la modificación del grano en procesos que sirven, principalmente, para despolimerizar las paredes celulares muertas del endospermo y movilizar los nutrientes del grano. En el proceso de secado, se producen el sabor y el color (por ejemplo, color marrón) como consecuencia de reacciones químicas. Si bien el uso principal de la malta es para la producción de bebidas, también se puede utilizar en otros procesos industriales, por ejemplo, como una fuente enzimática en la industria de panificación o como agentes saborizantes y colorantes en la industria alimentaria, tales como malta o como harina de malta o indirectamente como jarabe de malta, etc.

60 En un aspecto, la presente invención se refiere a métodos para producir dicha composición de malta. Los métodos preferentemente comprenden las siguientes etapas:

- (i) proporcionar granos de cebada de una planta de cebada que porta una mutación en el gen codificante de la MMT, lo que causa la pérdida total de la actividad de la MMT;
- 65 (ii) remojar dichos granos;
- (iii) germinar los granos remojados en condiciones predeterminadas;

(iv) secar dichos granos germinados;

produciendo de esta manera una composición de malta con un nivel bajo de SMM y/o DMS. Por ejemplo, la malta se puede producir mediante cualquiera de los métodos descritos por Briggs et al., (1981) y Hough et al., (1982).

5 Sin embargo, también se puede usar cualquier otro método adecuado para producir malta con la presente invención, tales como métodos para producir maltas de especialidad, que incluyen, pero sin limitación, métodos para tostar la malta.

10 De manera interesante, el DMS es un compuesto un tanto volátil con un punto de ebullición de 37°C a 38°C (Imashuku, anteriormente citado) y durante la producción de la malta, por ejemplo, durante el secado en horno, la composición por lo general se somete al calor, de tal forma que se evaporan cantidades sustanciales de DMS. No obstante, durante el enfriamiento de una composición de malta normal, se puede generar más DMS a partir de los precursores de DMS (DMSP). Una ventaja importante de la presente invención es que se genera muy poco o nada, de DMS en la composición de malta (véase el ejemplo 6; FIG. 5A).

15 Se han descrito métodos para reducir la concentración de DMS en la malta. Muchos de estos métodos se basan en el tratamiento térmico de la malta. Dicho tratamiento térmico puede ser simplemente el calentamiento de la malta, por ejemplo, durante el secado al horno, para volatilizar el DMS libre mediante la aplicación de vapor. Por lo tanto, el tratamiento al vapor de la malta puede reducir los niveles de DMS libre en la malta. Sin embargo, estos métodos reducen principalmente el nivel de DMS libre en la malta, pero solo afecta al nivel de SMM en un menor grado. Tal como se ha indicado anteriormente, se prefiere que los productos vegetales de la invención, tales como composiciones de malta comprendan bajos niveles tanto de DMS como de SMM. En una realización de la invención, las composiciones de malta de la invención solo se han sometido a un tratamiento limitado que implica volatilizar y eliminar el DMS libre mediante vapor o como alternativa no se han sometido a un tratamiento que implique volatilizar y eliminar el DMS libre usando vapor durante el secado al horno.

20 En una realización, se prefiere que la malta de acuerdo con la invención no se haya tratado con una sal de bromato, tal como bromato de potasio o bromato de calcio.

25 La malta también se puede procesar, por ejemplo, por molienda y así obtener la malta molida. Por lo tanto, el producto vegetal de acuerdo con la invención puede ser cualquier clase de malta, tal como malta no procesada o malta molida o harina de la misma. La malta molida y harina de la misma comprenden componentes químicos de la malta, incluyendo las células muertas que carecen de la capacidad de volver a germinar.

30 Las composiciones de malta de la invención preferentemente comprenden como máximo 3, preferentemente como máximo 2, más preferentemente como máximo 1, incluso más preferentemente como máximo 0,5; tal como un máximo 0,2 µg/g de DMS libre. Además, se prefiere que las composiciones de malta de la invención comprendan preferentemente como máximo 2, preferentemente como máximo 1, más preferentemente como máximo 0,5 µg/g de SMM.

35 En un aspecto preferido, la invención proporciona composiciones de malta que comprenden como máximo 200, preferentemente como máximo 150, más preferentemente como máximo 100, incluso más preferentemente como máximo 50, por ejemplo, como máximo 25 ppm de DMS libre. Además, se prefiere que las composiciones de malta de la invención comprendan preferentemente como máximo 1000, preferentemente como máximo 500, más preferentemente como máximo 250, incluso más preferentemente como máximo 100 ppm, aún más preferentemente como máximo 50 ppm de SMM. También se prefiere que las composiciones de malta de la invención comprendan como máximo 1000, preferentemente como máximo 500, más preferentemente como máximo 100 ppm, aún más preferentemente como máximo 50 ppm de DMSP.

40 En otro aspecto, la memoria descriptiva se refiere a composiciones de malta verde que comprenden como máximo 5000, más preferentemente como máximo 2500, aún más preferentemente como máximo 1000, incluso más preferentemente como máximo 500, aún más preferentemente como máximo 250; por ejemplo, como máximo 150 ppm de DMSP. También se prefiere que dichas composiciones de malta verde comprendan como máximo 200, preferentemente como máximo 150, más preferentemente como máximo 100, incluso más preferentemente como máximo 50; por ejemplo, como máximo 25 ppm de DMS libre.

45 En otro aspecto, los productos vegetales son jarabes, tales como un jarabe de cebada o un jarabe de malta de cebada. El producto vegetal también puede ser un extracto de cebada o de malta.

50 En otro aspecto, los productos vegetales son composiciones de mosto preparadas a partir de composiciones de malta derivadas de granos de cebada que portan una mutación en el gen para la MMT, lo que causa la pérdida total de la actividad de la MMT (véase el ejemplo 6; FIG. 5B). Dichos mostos se pueden preparar a partir de únicamente granos con MMT nula o mezclas que comprenden también otros granos. La invención también se refiere a composiciones de mosto preparadas usando cebada con MMT nula o partes de la misma, solas o mezcladas con otros componentes. Dichas composiciones de mosto pueden ser del primer mosto y/o segundo mosto y/u otros

mostos. Las composiciones de mosto pueden ser mosto dulce, mosto hervido o una mezcla de los mismos. En general, una composición de mosto contiene un nivel alto de nitrógeno de amino y carbohidratos fermentables; estos últimos son principalmente maltosa. En la FIG. 8, se ilustra el método común para la preparación del mosto de la malta. En general, se prepara el mosto incubando la malta con agua en un proceso de maceración. Durante la maceración, la composición de malta/agua se puede complementar con composiciones ricas en carbohidratos adicionales, por ejemplo, complementos de cebada, maíz o arroz. Por lo general, se conoce que los complementos de cereal no malteados contienen niveles muy bajos de enzimas, haciendo que sea necesaria la complementación con malta o enzimas exógenas para la conversión del azúcar y/o la generación del extracto, incluyendo la generación del nitrógeno de amino libre.

En una realización, el producto vegetal puede ser cebada sin maltear que, por ejemplo, puede ser útil como complemento durante la maceración.

En general, el primer paso en el proceso de producción del mosto es la molienda de la malta, de manera tal que el agua pueda acceder a las partículas de los granos en la fase de maceración, lo que se puede considerar una extensión del proceso de malteado con despolimerización enzimática de los sustratos. Durante la maceración, la malta molida se incuba con un líquido, tal como agua. La temperatura de incubación se mantiene constante (maceración isotérmica) o se aumenta gradualmente. En una realización preferida, la temperatura de maceración inicial no sobrepasa los 70°C, preferentemente, no supera los 69°C, por lo tanto, por ejemplo, la temperatura inicial de maceración puede encontrarse en el intervalo de 50°C a 69°C, tal como en el intervalo de 55°C a 69°C, por ejemplo, en el intervalo de 55°C a 65°C. Si la temperatura inicial de maceración es demasiado elevada, afectará a la actividad enzimática de la pasta y puede reducir o incluso suprimir las actividades enzimáticas deseables, que darán como resultado una calidad alterada del mosto. En cualquier caso, las sustancias solubles producidas en el malteado y la maceración se liberan en dicha fracción líquida. Una posterior filtración posibilita la separación del líquido del mosto y las partículas sólidas residuales; estas últimas son los granos ya procesados. Dicho mosto también podría ser denominado "primer mosto". Después de la filtración, se puede obtener un "segundo mosto" al lavarlo con agua caliente. Los ejemplos no limitantes de los procedimientos adecuados para la preparación del mosto son descritos por Briggs et al., (1981) y Hough et al., (1982).

Los primeros, segundos y otros mostos se pueden combinar y posteriormente, someterse a cocción. El mosto no cocido, ya sea un primer mosto puro o un mosto combinado, también se puede denominar "mosto dulce", mientras que después de la ebullición se puede denominar "mosto hervido". Si el mosto se va a usar para la producción de cerveza, con frecuencia se agregan lúpulos antes de la ebullición.

La composición del mosto también se puede preparar al incubar plantas de cebada con MMT nula o partes de la misma, tales como plantas con MMT nula sin maltear o partes de las mismas, con una o más enzimas adecuadas, tales como composiciones enzimáticas o composiciones de mezcla enzimática, por ejemplo Ultraflo o Cereflo (Novozymes). La composición de mosto también se puede preparar usando una mezcla de malta y plantas de cebada sin maltear o partes de las mismas o solamente cebada sin maltear, añadiendo opcionalmente una o más enzimas adecuadas durante dicha preparación, en particular amilasas, glucanasas (preferentemente (1-4)- y/o (1-3,1-4)-β-glucanasa) y/o xilanasas (tal como arabinoxilanasas) y/o proteasas o mezclas enzimáticas que comprenden una o más de las enzimas anteriormente mencionadas; por ejemplo, al agregar la mezcla enzimática Ondea Pro (Novozymes).

La cebada de la presente invención se puede agregar a una mezcla de granos molidos de malta y se puede usar como complemento. Más específicamente, la cebada de la invención se puede usar junto con la malta en cualquier combinación para la maceración, con o sin enzimas externas para elaboración de cerveza, tales como, pero sin limitación, las proporciones de cebada:malta = 100:0 o 75:25 o 50:50 o 25:75.

En los métodos tradicionales de elaboración de la cerveza, el mosto se somete a ebullición durante largo tiempo, en general en el intervalo comprendido entre 60 minutos y 120 minutos; entre otras razones, porque la ebullición extendida reduce la cantidad de DMS, que es volátil. No obstante, la ebullición prolongada es indeseable por varias otras razones; por ejemplo, porque la ebullición prolongada requiere de un pronunciado suministro de energía. Además, dicha ebullición puede provocar la generación de olores indeseables por aldehídos de Strecker. De acuerdo con la presente invención, el mosto con niveles bajos de DMS se puede producir a partir de la cebada con MMT nula incluso sin ebullición prolongada. Por lo tanto, el mosto de acuerdo con una realización preferible de la invención es cocido durante como máximo 45 minutos; incluso más preferentemente durante como máximo 30 minutos; por ejemplo, durante como máximo 15 minutos. Es notable que, incluso si el mosto se somete a ebullición de manera prolongada, todavía se puede generar DMS a partir del DMSP con el paso del tiempo. De manera interesante, el mosto de acuerdo con la presente invención mantiene un nivel bajo de DMS, que es sustancialmente inferior al obtenido después de someter a ebullición un mosto normal.

En una realización adicional, se prefiere que el mosto no se someta a lavado con dióxido de carbono después de la ebullición del mosto y antes de la fermentación.

Preferentemente, las composiciones de mosto de la invención comprenden menos de 30 ppm, preferentemente menos de 25 ppm, más preferentemente menos de 20 ppm, incluso más preferentemente menos de 15 ppm,

aún más preferentemente menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm de DMS, aún más preferentemente DMS no detectable; y/o menos de 50 ppm, preferentemente menos de 40 ppm, más preferentemente menos de 30 ppm, incluso más preferentemente menos de 20 ppm, hasta más preferentemente menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm de SMM, incluso más preferentemente, SMM no detectable.

Los productos vegetales, o partes de los mismos, también pueden ser composiciones de alimentos, composiciones alimenticias y composiciones de materias primas de fragancias que comprenden plantas de cebada que portan una mutación en el gen codificante de la MMT, lo que causa la pérdida total de la actividad de la MMT. Las composiciones de alimentos pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, granos de cebada malteados y sin maltear, harinas de cebada, pan, gachas, mezclas de cereales que comprenden cebada, productos para la salud, tales como bebidas que comprenden cebada, jarabes de cebada y composiciones de cebada en copos, cebada molida o cebada extrudida. Las composiciones alimenticias incluyen, por ejemplo, composiciones que comprenden granos de cebada y/o harinas. Las composiciones de materias primas de fragancias se describen en el presente documento, a continuación.

La memoria descriptiva también se refiere a mezclas de los productos vegetales descritos en el presente documento. Por ejemplo, en un aspecto, la invención se refiere a una composición preparada mediante una mezcla de:

- (i) una composición que comprende una planta de cebada o una parte de la misma, que porta una mutación en el gen codificante de la MMT, lo que causa la pérdida total de la actividad de la MMT y
- (ii) una composición de malta preparada a partir de granos con MMT nula.

La presente invención se refiere a bebidas, más preferentemente a bebidas derivadas de malta, aún más preferentemente a bebidas alcohólicas, tales como cerveza que contiene bajos niveles de DMS y SMM, en las que dichas bebidas se preparan usando cebada con MMT nula o partes de la misma.

Por lo tanto, la invención se refiere a bebidas, más preferentemente a bebidas derivadas de malta, aún más preferentemente a bebidas alcohólicas, tales como cerveza, conteniendo dichas bebidas:

- (i) menos de 20 ppm, más preferentemente menos de 15 ppm, aún más preferentemente menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm, aún más preferentemente DSM no detectable; y
- (ii) menos de 20 ppm, aún más preferentemente menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm, incluso más preferentemente SMM no detectable.

Se prefiere que la bebida se prepare mediante fermentación de la cebada con MMT nula o partes de la misma o extractos de la misma, por ejemplo, por fermentación del mosto obtenido al usar malta producida de la cebada con MMT nula, en forma individual o en combinación con otros ingredientes.

Sin embargo, en otras realizaciones, la bebida es una bebida no fermentada, por ejemplo mosto, preferentemente mosto preparado a partir de malta con MMT nula. También queda comprendido dentro del alcance de la presente invención que dicha bebida pueda prepararse a partir de plantas de cebada sin maltear o partes de las mismas, preferentemente de plantas de cebada con MMT nula sin maltear o partes de las mismas.

La bebida puede ser una bebida sin alcohol, tal como cerveza sin alcohol u otras bebidas, tales como de bebidas de malta sin alcohol, tales como maltina.

Preferentemente, no obstante, dicha bebida se prepara a partir de una composición de malta que comprende granos de cebada con MMT nula. Más preferentemente, dicha bebida es cerveza. Esta puede ser cualquier clase de cerveza conocida para la persona entendida en la técnica. En una realización, la cerveza es, por ejemplo, una cerveza tipo lager. La cerveza se elabora preferentemente usando una composición de malta que comprende cebada germinada con MMT nula. No obstante, la composición de malta también puede comprender otros componentes, por ejemplo, otros cereales germinados o no germinados, tales como cebada, trigo y/o centeno de tipo silvestre o materias primas no germinadas que comprenden azúcares o composiciones derivadas de las materias primas malteadas o sin maltear, incluyendo composiciones de jarabe.

Por lo general, se cree que el DMS se puede obtener con el tiempo a partir del DMSP que incluye SMM. Por lo tanto, incluso si inicialmente hay poco o nada de DMS en una bebida, entonces el DMS se puede acumular con el tiempo. Sin embargo, es un objeto de la presente invención proporcionar bebidas que contengan poco o nada, de DMS, incluso después del almacenamiento.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar bebidas derivadas de plantas de cebada, tales como cerveza, que contienen menos de 30 ppm, preferentemente menos de 25 ppm, más preferentemente menos de 20 ppm, incluso más preferentemente menos de 15 ppm, aún más preferentemente menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm de DSM, aún más preferentemente DSM no detectable, después del almacenamiento durante al menos 1 semana, preferentemente al menos 2 semanas, más

preferentemente al menos 3 semanas, incluso más preferentemente durante al menos 4 semanas, tal como en el intervalo de 1 mes a 3 meses, por ejemplo en el intervalo de 3 meses a 6 meses, tal como en el intervalo de 6 meses a 12 meses, por ejemplo, durante más de un año. El almacenamiento se realiza a una temperatura en el intervalo de 5 °C a 40 °C, tal como en el intervalo de 15 °C a 40 °C.

5 Además, se prefiere que las bebidas de acuerdo con la invención se caractericen por tener propiedades de sabor superiores. En particular, se prefiere que las bebidas de acuerdo con la invención se caractericen por ser más aromáticas y fragantes que una correspondiente cerveza "normal" (véase el ejemplo 7; FIG. 6). Sin supeditarse a ninguna teoría, la presente invención proporciona la teoría de que los niveles bajos o incluso la ausencia de DMS y SMM causan la percepción mejorada de los sabores aromáticos y fragantes.

15 Preferentemente, los sabores aromáticos y fragantes son determinados por un panel de catadores profesionales. En las realizaciones donde la bebida es cerveza, el panel de evaluación consiste preferentemente en catadores profesionales de cerveza. En la presente, también se hace referencia al "panel de catadores profesionales de cerveza" como a un "panel de catadores capacitados" o un "panel de especialistas catadores de cerveza". Si bien existe el conocimiento de que el DMS, *per se*, tiene un profundo efecto sobre las propiedades del sabor de la cerveza, algunos paneles de catadores pueden mostrar una tendencia a generar evaluaciones imprecisas en cuanto a los sabores azufrados de múltiples aspectos. La razón es simplemente que los panelistas no están apropiadamente "calibrados" como consecuencia de las diferencias en la percepción del sabor. Este obstáculo complejo se resolvió, tal como se describe en el presente documento, al establecer un panel de especialistas plenamente capacitados de al menos 9 catadores de cerveza, entrenados para evaluar con criterio las propiedades del sabor de los ésteres, alcoholes superiores y componentes de azufre y el cuerpo de la cerveza.

25 El panel catador debería estar compuesto por al menos 9 personas, preferentemente en el intervalo de 9 a 20 personas, tal como de 9 a 12 personas, por ejemplo, de 10 personas. Cada miembro del panel catador debería tener preferentemente una capacitación exhaustiva, en particular, cada miembro debería estar capacitado para evaluar las propiedades del sabor de los ésteres, alcoholes superiores y componentes de azufre y el cuerpo de la cerveza. Cada miembro del panel catador puede entonces evaluar las diferentes notas de sabor en una escala de 0 a 5. Las características del sabor se seleccionan preferentemente del grupo que consiste de intensidad amarga, calidad amarga, cuerpo, equilibrio, frescura, capacidad para ser bebible, de carácter aromático, sabor afrutado, de carácter alcohólico/solvente, de carácter floral, de carácter lupuloso, de carácter resinoso, de carácter maltoso, de carácter basado en el grano, de carácter acaramelado, de carácter quemado, de carácter fenólico, de carácter azufrado, acidez y dulzor.

35 Usando la metodología mencionada con anterioridad, se prefiere que las bebidas de la invención brinden una clasificación superior para al menos una, preferentemente al menos dos, incluso más preferentemente para al menos 3, hasta más preferentemente para al menos 4, incluso más preferentemente para todas las propiedades aromáticas/fragantes seleccionadas del grupo que consiste en aromáticas, afrutado, alcohólicas/disolventes, florales y lupuloso, en comparación con una bebida con contenido similar de etanol y preparada a partir de una cebada de tipo silvestre, preferentemente de la vc. Power, cuando los perfiles del éster/alcohol de ambas bebidas se ajustan para ser similares y las bebidas se preparan de la misma manera.

45 Además, usando la metodología mencionada con anterioridad, se prefiere que las bebidas de la invención tengan una clasificación superior para al menos una, preferentemente al menos dos, incluso más preferentemente para las tres propiedades generales seleccionadas del grupo que consisten en equilibrio, frescura y capacidad para ser bebible, en comparación con una bebida con un contenido similar de etanol y preparada a partir de una cebada de tipo silvestre, preferentemente de la vc. Power, cuando los perfiles éster/alcohol de ambas bebidas se ajustan para ser similares.

50 Usando la metodología mencionada con anterioridad, se prefiere que las bebidas de la invención tengan un valor de clasificación de al menos 0,1, más preferentemente al menos 0,2 superior para la frescura y/o sabor afrutado en comparación con una bebida con un contenido similar de etanol y preparada a partir de una cebada de tipo silvestre, preferentemente de la vc. Power, cuando los perfiles éster/alcohol de ambas bebidas se ajustan para ser similares.

55 En el contexto de la presente solicitud, el perfil éster/alcohol se considera similar cuando los 12 compuestos mencionados en la Tabla 1 se ajustan a niveles similares (véase también el ejemplo 7); es decir, las bebidas contienen la misma cantidad $\pm 20\%$ de los 12 compuestos mencionados en la Tabla 1. El contenido de etanol se considera similar si es el mismo $\pm 20\%$, preferentemente el mismo $\pm 10\%$.

60 Por lo tanto, se prefiere que las bebidas de la invención, si se ajustan a un contenido de los siguientes 12 compuestos de (véase listado de la Tabla 1 y ejemplo 7):

- (i) Acetaldehído 1,20 ppm $\pm 20\%$;
- (ii) Etilformiato 0,24 ppm $\pm 20\%$;
- 65 (iii) Etilacetato 23,40 ppm $\pm 20\%$;
- (iv) Isobutilacetato 0,05 ppm $\pm 20\%$;

- (v) 1-Propanol 13,80 ppm \pm 20%;
- (vi) Isobutanol 9,60 ppm \pm 20%;
- (vii) Isoamilacetato 3,43 ppm \pm 20%;
- (viii) 1-Butanol 0,23 ppm \pm 20%;
- 5 (ix) Isoamilalcohol 52,00 ppm \pm 20%;
- (x) Etilhexanoato 0,13 ppm \pm 20%;
- (xi) n-Hexilacetato 0,01 ppm \pm 20%;
- (xii) Etiloctanoato 0,33 ppm \pm 20%.

10 se caractericen por tener un valor de clasificación de al menos 1, preferentemente de al menos 2, más preferentemente de al menos 3, incluso más preferentemente de al menos 4, hasta más preferentemente de al menos 5, incluso más preferentemente todas de las siguientes propiedades (cuando se determinan tal como se describe en el ejemplo 7):

- 15 (i) "equilibrada" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, al menos 2,7);
- (ii) "fresca" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, de al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9; aún más preferentemente de al menos 3,1);
- (iii) "bebible" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, de al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9; aún más preferentemente, de al menos 3,0);
- 20 (iv) "aromática" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, de al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9);
- (v) "afrutado" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, de al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9; aún más preferentemente, de al menos 3,0);
- (vi) "alcohólica/solvente" (clasificación de al menos 1,5);
- 25 (vii) "floral" (clasificación de al menos 1,7; preferentemente, de al menos 1,9);
- (viii) "lupuloso" (clasificación de al menos 1,8);

más preferentemente, las siguientes propiedades (cuando se determinan tal como se describió en el ejemplo 7):

- 30 (i) "fresca" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, de al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9; aún más preferentemente, de al menos 3,1);
- (ii) "bebible" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, de al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9; aún más preferentemente, de al menos 3,0);
- 35 (iii) "aromática" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, de al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9);
- (iv) "afrutado" (clasificación de al menos 2,5; preferentemente, al menos 2,7; más preferentemente, de al menos 2,9; aún más preferentemente, de al menos 3,0).

Por lo tanto, se prefiere que la bebida de acuerdo con la invención tenga:

- 40 (i) una clasificación para "fresca" de al menos 2,5 en una escala de 0 a 5 cuando la evalúa un panel de catadores profesionales y/o
- (ii) una clasificación para "bebible" de al menos 2,5 en una escala de 0 a 5 cuando la evalúa un panel de catadores profesionales y/o
- 45 (iii) una clasificación para "aromática" de al menos 2,5 en una escala de 0 a 5 cuando la evalúa un panel de catadores profesionales y/o
- (iv) una clasificación para su "sabor afrutado" clasificación de al menos 2,5 en una escala de 0 a 5 cuando la evalúa un panel de catadores profesionales;

50 siempre que el perfil éster/alcohol de la bebida sea como se indica en el ejemplo 7, Tabla 1 en la columna "con MMT nula" a la cual se agrega la Mezcla 1 y la Mezcla 2.

En particular, la presente memoria descriptiva divulga que la presencia de DMS en una bebida puede enmascarar un sabor afrutado. Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar bebidas que tienen una
 55 clasificación superior para sabor afrutado, en donde dicho sabor es evaluado por un panel de catadores capacitados, preferentemente, un panel de catadores capacitados de al menos 9 miembros, en comparación con una bebida preparada de la misma manera, pero que comprende al menos 100 ppm de DMS, tal como en el intervalo de 100 a 200 ppm de DMS o en comparación con una bebida preparada de la misma manera, pero que comprende al menos 50 ppm de DMS, tal como en el intervalo de 50 a 100 ppm. Dicha clasificación superior para el sabor
 60 afrutado es preferentemente de al menos 0,5 puntos, preferentemente de al menos 0,7 puntos, por ejemplo, de al menos 0,9 puntos más, cuando el sabor afrutado se determina en una escala de 0 a 5, como se describió con anterioridad.

La memoria descriptiva también se refiere a la producción de las bebidas mencionadas con anterioridad y
 65 preferentemente comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una composición de malta que comprende granos germinados con MMT nula;
- (ii) procesar dicha composición de malta en una bebida;

obteniendo de esta manera una bebida que contiene menos de 30 ppm, preferentemente menos de 25 ppm, más
5 preferentemente menos de 20 ppm, incluso más preferentemente menos de 15 ppm, aún más preferentemente
menos de 10 ppm, incluso más preferentemente menos de 5 ppm, aún más preferentemente DMS no detectable.

En una realización preferida, la bebida es cerveza. En este caso, la etapa de procesamiento comprende
10 preferentemente preparar mosto a partir de dicha composición de malta, por ejemplo, mediante cualquiera de los
métodos descritos con anterioridad en el presente documento y fermentar dicho mosto.

En términos generales, las bebidas alcohólicas, tales como cerveza, se pueden elaborar a partir de granos de
cebada malteada y/o sin maltear. La malta, además de los lúpulos y de la levadura, contribuye al sabor y al color de
15 la cerveza. Asimismo, la malta funciona como fuente de azúcar fermentable y también como fuente de enzimas. Una
representación esquemática de un proceso general de producción de cerveza se ilustra en la FIG. 8, si bien se
pueden encontrar descripciones detalladas sobre los métodos para malteado y elaboración de la cerveza, por
ejemplo, en las publicaciones realizadas por Briggs et al., (1981) y Hough et al., (1982). Existen numerosos métodos
20 disponibles, que son actualizados con regularidad, para los análisis de los productos de cebada, malta y cerveza.
Los mismos incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, los de la *American Association of Cereal Chemists* (1995), la
American Society of Brewing Chemists (1992), la *European Brewery Convention* (1998) y el *Institute of Brewing*
(1997). Se reconoce que se emplean muchos procedimientos específicos para la elaboración de cerveza; las
variaciones más significativas se relacionan con las preferencias de los consumidores locales. Se puede utilizar
cualquiera de dichos métodos de producción de cerveza con la presente invención.

25 La composición de malta de las bebidas mencionadas con anterioridad, que incluyen, por ejemplo, cerveza, bebidas
de malta o mosto no fermentado, puede obtenerse, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos descritos con
anterioridad en el presente documento. El mosto se puede preparar a partir de dicha composición de malta.

La primera etapa de la producción de cerveza a partir del mosto implica preferentemente la ebullición de dicho
30 mosto. Durante la cocción, se pueden agregar otros ingredientes, tales como jarabes de cereales y lúpulos, en
donde estos últimos componentes pueden brindar las típicas características amargas y aromáticas de la cerveza. La
ebullición del mosto también causa la acumulación entre los polifenoles y proteínas desnaturalizadas, que se pueden
precipitar durante las fases posteriores de la producción de cerveza. Además, la ebullición del mosto puede causar
35 la evaporación de los compuestos volátiles, incluyendo el DMS. No obstante y tal como se indicó con anterioridad, el
mosto preparado de la cebada con MMT nula contiene poco o nada de DMS, lo que hace posible reducir
sustancialmente el tiempo de ebullición de dichos mostos. Después de enfriarse, el mosto se transfiere a los tanques
de fermentación que contienen levadura, preferentemente levadura para elaboración de cerveza de la especie
Saccharomyces carlsbergensis. El mosto se fermenta durante cualquier período, generalmente en el rango que varía
40 entre 1 y 100 días. Durante el proceso de fermentación, que tarda varios días, el azúcar se convierte en alcohol y
CO₂, de manera concomitante con el desarrollo de algunas sustancias aromáticas.

Posteriormente, la cerveza puede procesarse de manera adicional; por ejemplo, enfriándose. También se puede
45 filtrar y/o fermentar en fondo (*lagering*): un proceso que brinda un aroma placentero y un sabor menos característico
de la levadura. También se pueden incorporar aditivos. Además, se puede agregar CO₂. Por último, la cerveza se
puede pasteurizar y filtrar, antes de ser envasada en botellas o en latas.

Se dispone de diversos métodos para determinar si se prepara una planta de cebada o un producto vegetal a partir
de una planta de cebada que porta una mutación en el gen para la MMT, lo que causa una pérdida total de la función
50 de la MMT. Los productos vegetales comprenden, en general, al menos parte del ADN genómico de la planta
utilizada para su producción. Por lo tanto, la malta contiene grandes cantidades de ADN genómico, aunque incluso
los extractos de cebada o malta, tales como mosto, pueden comprender ADN genómico de dicha cebada o malta.
También las bebidas basadas en cebada, tales como cerveza, pueden comprender ADN genómico de dicha planta.
Mediante el análisis de ADN de un producto vegetal, se puede establecer si la planta de la cual se prepara el
55 producto vegetal porta una mutación en el gen para la MMT, lo que causa una pérdida total de la función de la MMT.
Dicha mutación podría ser, por ejemplo, cualquiera de las mutaciones en el gen para la MMT descritas en el
presente documento con anterioridad en la sección "Pérdida de la enzima MMT funcional". El ADN genómico se
puede analizar mediante cualquier método útil, tal como secuenciación o por métodos basados en amplificación, con
inclusión de métodos basados en la PCR. Si se espera una mutación particular en el gen para la MMT, entonces se
60 puede emplear análisis de polimorfismo, por ejemplo, análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNP, *Single
Nucleotide Polymorphism*). Dicho análisis se puede realizar como se describe con posterioridad en el presente
documento en los Ejemplos 13 y 17. La persona entendida en la técnica puede adaptar el análisis SNP específico
descrito en estos ejemplos para uso con otras mutaciones u otro material de partida.

Si los productos vegetales mencionados con anterioridad se preparan solamente a partir de plantas de cebada que
65 portan una mutación en el gen para la MMT, lo que causa una pérdida total de la función de la MMT, entonces la
presencia versus la ausencia del ARNm de la MMT y/o de la proteína de la MMT de la cebada también puede indicar

si dicho producto vegetal se prepara a partir de cebada con MMT nula. Por consiguiente, se puede realizar el examen del producto vegetal por análisis de transferencia de Western o por otro análisis de proteínas o por RT-PCR o por análisis de transferencia *Northern Blot* o por otros análisis de ARNm. Dichos análisis son útiles, en particular, cuando el producto vegetal es malta.

5

SMM y DMS

La cantidad de SMM y DMS en un producto vegetal se puede determinar mediante cualquier método adecuado. La SMM se puede determinar esencialmente tal como se describió con anterioridad en el presente documento en la sección “Preparación de las plantas de cebada con una pérdida total de MMT funcional”, en donde se describe la determinación de los niveles de SMM en una muestra de cebada. Por lo tanto, la SMM se puede determinar al acoplar la misma a un compuesto, tal como OPA y determinar la fluorescencia, por ejemplo, usando un sistema UPLC. Para una medición cuantitativa, se puede determinar el área del cromatograma correspondiente a un pico de SMM.

10

15

Para una medición más precisa, las cantidades tanto de DMS como de DMSP (tal como SMM) —este último compuesto medido como DMS después de la activación— se determinan preferentemente usando cromatografía de gases en columna capilar de alta resolución. El DMS total en las muestras de mosto y cerveza se definen en el presente documento como la suma cuantitativa de DMS libre y sus formas precursoras, denominadas “DMSP”. Usando esta definición, la cantidad de DMSP en una muestra de mosto o cerveza, se puede determinar como la diferencia entre el DMS total (medido en la muestra sometida a ebullición, preferentemente en una muestra sometida a ebullición en condiciones alcalinas durante 1 hora) y el DMS libre (medido en la muestra no sometida a ebullición). El ejemplo 6 detalla las formas preferibles para medir los niveles del DMS total y del DMS libre.

20

25 Mutagénesis química

A fin de generar plantas de cebada que portan una mutación en el gen codificante de la MMT, lo que causa la pérdida total de la actividad de la MMT de acuerdo con la presente invención, se puede preparar un número muy grande de mutantes de cebada mediante cualquier método adecuado de mutagénesis; por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis química de las pepitas de cebada: un método que es conocido por inducir mutaciones aleatorias. La mutagénesis de la cebada se puede realizar usando cualquier mutagenización química. No obstante, se realiza preferentemente al tratar pepitas con NaN_3 (véase la FIG. 7), lo que permite la germinación de las pepitas sobrevivientes, seguido del análisis de las plantas descendientes. La generación de la planta que crece de las pepitas mutagenizadas, denominadas “M0”, contiene quimeras heterocigotas para cualquier mutación. Las plantas de la progenie recolectadas después de la auto-polinización son denominadas “generación M1”, en la que una determinada mutación se segrega en los correspondientes heterocigotos y homocigotos.

30

35

Tratar las pepitas de cebada con NaN_3 no es equivalente a tratar una única célula de cebada porque las pepitas, después del tratamiento, contienen parte de las células no mutantes y una variedad de células que tienen mutaciones de ADN. Las mutaciones se pierden en los linajes celulares que no generan la línea germinal, lo que significa que el propósito es dirigir el mutagen a las pocas células que se desarrollan en tejidos reproductivos, lo que contribuye al desarrollo de la generación M1.

40

Para evaluar la eficiencia general de la mutación, se pueden contar las quimeras albinas y las plantas albinas en la generación M0 y en la M1, respectivamente. Clasificar el número de mutante como una función de las plantas sobrevivientes brinda un estimado de la eficiencia de la mutación, mientras que clasificar el número de mutante como una función de las semillas tratadas brinda la medida combinada tanto de la eficiencia de la mutación como del exterminio de la pepita.

45

Es notable que las células tengan un mecanismo de control de la calidad en casi cada paso de la expresión génica, posiblemente para moderar los efectos del daño a las mutaciones. Un ejemplo bien estudiado en las eucariotas es la degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras o NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*) que evita la síntesis de proteínas truncadas en forma prematura, potencialmente deletéreas (Maquat y Carmichael, 2001; Wu et al., 2007). En la NMD, un codón de terminación es identificado como “premature” por su posición con relación a los elementos desestabilizadores cadena abajo. Las mutaciones que generan codones de terminación prematura (antisentido) o PTC (*Premature Termination Codons*), a veces incrementan los niveles de transcritos alternativamente ensamblados que saltean las mutaciones perjudiciales y así potencialmente salvan la función proteica (Mendell y Dietz, 2001).

50

60 Fitomejoramiento

El desarrollo del cultivo se puede ver como un proceso prolongado que comienza con la introducción de un nuevo atributo. Desde la perspectiva de un fitomejorador de plantas, este paso, a menudo, puede generar una planta que tiene un perfil general menos deseable de atributos agronómicos que las variedades comerciales actuales. Por consiguiente, en una realización preferible de la presente invención, el objeto es proporcionar plantas de cebada útiles a nivel agronómico, que portan una mutación en el gen para la MMT, lo que causa la pérdida total de MMT

65

funcional.

Además del atributo de MMT nula, existen otros factores que también se pueden considerar en la técnica de generar una variedad de cebada malteada comercial que incluye —pero sin limitación— producción de pepitas, tamaño de pepitas y parámetros que se relacionan con el funcionamiento del malteado o el funcionamiento de la elaboración de la cerveza. Como muchos de dichos atributos —si no todos— se encuentran bajo control genético, la presente invención también proporciona variedades cultivadas de cebada modernos, homocigóticos y de alto rendimiento, que se pueden preparar a partir de las cruces con las plantas de cebada con MMT nula. Las pepitas de dichas plantas de cebada proporcionan una nueva materia prima sin enzima MMT funcional. El fitomejorador de cebada experto en la técnica puede cruzar la planta de cebada con MMT nula de la invención con otras plantas de cebada y, posteriormente, seleccionar y desarrollar descendientes que tienen atributos que generan variedades cultivadas superiores. Dichos descendientes también se consideran parte de la presente invención. Como alternativa, el fitomejorador de cebada también puede utilizar las plantas de la presente invención para la mutagénesis adicional, a fin de generar nuevas variedades cultivadas derivadas de cebada con MMT nula.

Las plantas de cebada de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en los intentos de mejoramiento génico de acuerdo con cualquier esquema adecuado.

Otro objeto de la presente memoria descriptiva consiste en proporcionar plantas de cebada elitistas a nivel agronómico que comprenden el atributo de MMT nula. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también se refiere a los métodos para producir una nueva planta de cebada con MMT nula al cruzar una primera planta de cebada madre con una segunda planta de cebada madre, en donde la primera planta o la segunda planta es cebada con MMT nula. Asimismo, tanto la primera como la segunda planta de cebada madre representan una variedad de cebada con MMT nula. Por lo tanto, cualquiera de los siguientes métodos que usan la variedad de cebada con MMT nula son parte de esta memoria descriptiva: autofecundación, cruzamiento retrógrado, cruzamiento con otras poblaciones y similares. Todas las plantas producidas mediante el uso de una variedad de cebada con MMT nula como una generación madre se encuentran dentro del alcance de esta invención, con inclusión de aquellas plantas desarrolladas a partir de las variedades que derivan de una variedad de cebada con MMT nula. La cebada con MMT nula también se puede usar para la transformación genética en los casos donde el ADN exógeno se introduce y se expresa en la planta con MMT nula o tejido vegetal.

Los métodos de cruzamiento retrógrado se pueden usar con la presente memoria descriptiva para introducir el atributo de MMT nula de una planta de cebada mutada en otra variedad, por ejemplo, en otra variedad cultivada, tal como la vc. Scarlett o la vc. Jersey, que son, ambas, variedades cultivadas de cebada malteada contemporáneas y de alto rendimiento. En un protocolo de cruzamiento retrógrado estándar, la variedad original de interés, es decir, la planta madre recurrente de interés, se cruza con una segunda variedad (es decir, planta madre no recurrente), que porta el único gen de interés a ser transferido. Las plantas de la progenie con MMT nula generadas a partir de esta cruce se cruzan en forma posterior con la planta madre recurrente; este proceso se repite hasta que se obtiene una planta de cebada donde esencialmente todas las características especificadas por la planta madre recurrente se recuperan en la planta generada, además de la conformación genética transferida para el atributo de MMT nula de la planta madre no recurrente. Eventualmente, la planta cruzada en forma retrógrada generada en última instancia se autofecunda para generar plantas puras de la progenie de mejoramiento génico con MMT nula.

Se prefiere tener una planta madre recurrente adecuada en un procedimiento de cruzamiento retrógrado exitoso, cuyo propósito incluye la introducción del atributo de MMT nula en la variedad original. Para lograr esto, la conformación genética de la variedad recurrente se modifica con el del atributo de MMT nula de la planta madre no recurrente, mientras que se retienen esencialmente todas las propiedades genéticas de la variedad original. Si bien los métodos de cruzamiento retrógrado se simplifican cuando la propiedad genética que se está transfiriendo es especificada por un alelo dominante, es posible cruzar en forma retrógrada la del atributo recesivo de la MMT nula.

Una forma de acelerar el proceso de mejoramiento génico vegetal comprende la multiplicación inicial de los mutantes generados por aplicación de cultivo tisular y técnicas de regeneración. Por esta razón, otro aspecto de la presente memoria descriptiva es proporcionar células que, tras el cultivo y la diferenciación, produzcan plantas de cebada que tengan el atributo de MMT nula. Por ejemplo, el fitomejoramiento puede implicar cruzamientos tradicionales, preparar plantas derivadas de anteras fértiles o usar métodos de cultivo de microesporas.

También es una realización de la presente memoria descriptiva proporcionar plantas de cebada que no solamente portan una mutación en el gen codificante de la MMT —lo que causa una pérdida total de actividad de la MMT— sino también una o más mutación/es adicional/es útil/es. Dichas mutaciones adicionales pueden, por ejemplo, incluir mutaciones en el gen codificante de lipoxigenasa-1 (LOX-1) de la cebada, tal como una mutación que causa un nivel inferior de la actividad de la LOX-1 (por ejemplo, el mutante descrito en el documento de patente de los Estados Unidos con el número 6.660.915 de Douma, A.C. et al.,) o una mutación que causa una pérdida completa de la función de la LOX-1, tal como cualquiera de los mutantes descritos en la patente de Estados Unidos n.º 7.420.105 o la solicitud de patente PCT n.º WO 2005/087934 propiedad de Breddam, K. et al.; en particular, mutantes que comprenden una secuencia genómica del gen codificante de LOX-1, de acuerdo con la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 6 del documento de patente de los Estados Unidos con el número 7.420.105 de Breddam, K. et al.,. La malta

con LOX-1 nula, tal como se describió en las patentes y solicitudes de patentes mencionadas con anterioridad podría proporcionar, por sí misma, una materia prima para el secado en horno a baja temperatura en el proceso de malteado de la cebada. No obstante, un mutante doble combinado con LOX-1 nula y MMT nula sería superior y altamente útil en la industria cervecera porque se inactivarían las actividades tanto de la LOX-1 como de la MMT.

5 Dichas plantas de cebada se pueden obtener al cruzar las plantas de cebada de acuerdo con la presente invención con las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 7.420.105 o la solicitud de patente PCT n.º WO 2005/087934, de propiedad de Breddam, K. et al.

Ejemplos

10 En el presente documento, los ejemplos ilustran las realizaciones preferidas de la invención y no deberán considerarse de manera taxativa respecto de la misma.

15 A menos que se indique lo contrario, se realizaron técnicas biológicas y moleculares básicas para manipular ácidos nucleicos, proteínas y bacterias, tal como se describe en Sambrook y Russel (2001).

Ejemplo 1

El DMS enmascara el sabor afrutado de la cerveza

20 La caracterización de las notas de sabor azufrado por lo general se considera difícil, incluso entre paneles generales de catadores de cerveza. A menudo, el panelista catador de cerveza usa el término genérico "azufrado" en vez de las notas de azufre más especializadas, por ejemplo "mercaptano", "sulfuro de hidrógeno" y "DMS", para caracterizar una nota azufrada.

25 Luego de constituir un panel de 9 catadores, se entrenó a los miembros de forma exhaustiva para que rastrearan el aroma de los componentes que contenían azufre, lo que reveló, de manera sorprendente, que la adición de componentes de azufre afecta en gran medida la percepción de otros componentes del aroma, una propiedad que genera clasificaciones inferiores para, por ejemplo, el sabor afrutado y el cuerpo de la cerveza.

30 En otro conjunto de experimentos, se eligió el DMS para capacitar al panel. Se entregó al panel muestras de cerveza a las que se adicionaron altas concentraciones de dichos componentes que contenían azufre y se le pidió a sus miembros que cataran y clasificaran las características de "cuerpo", "afrutado" y "DMS", en una escala de 0 (ausente) a 5 (extremo). Cada serie de evaluaciones incluyó una cerveza estándar disponible a nivel comercial y dos muestras desconocidas por los panelistas.

35 En la **FIG. 1B** se ilustran los resultados de las clasificaciones promedio de una serie de evaluaciones que comprendían muestras de cerveza con agregados de éster y éster/DMS, respectivamente. El resultado inesperado fue que la adición del DMS, cuando se combinó con éster, afectó de manera negativa la clasificación del afrutado percibido, en comparación del obtenido al agregar solamente éster. De manera similar, la nota de cuerpo de la cerveza se redujo. No fue sorprendente que el agregado de DMS mejorara la clasificación de esta propiedad.

40 Los resultados mencionados con anterioridad demuestran que la habilidad del panel catador especializado en degustar un único componente del sabor parece estar altamente ligado al "contexto del sabor", tal como lo determinan otros componentes del aroma.

45 El sorprendente hallazgo de las evaluaciones del sabor, resumidas en la **FIG. 1B**, también sentó las bases para la presente invención al proporcionar bebidas con bajos niveles de DMS y mutantes de cebada útiles para preparar dichas bebidas, es decir, mutantes de cebada que carecen de la capacidad de sintetizar SMM, de manera tal que la utilización de la correspondiente materia prima en la producción de la bebida no sólo pueda permitir la generación de productos con menos o nada de DMS, sino que también aliente las mejoras en la nota de afrutado.

Ejemplo 2

Conformación del examen de detección, metodología 1

55 Las pepitas recolectadas de las plantas de cebada de la vc. Prestige y de la vc. Sebastian se incubaron por separado con el mutagen NaN_3 , siguiendo los detalles experimentales provistos por Kleinhofs et al., (1978). Este procedimiento se eligió por su potencial conocido para inducir mutaciones puntuales en el ADN genómico de la cebada.

60 En los experimentos, los granos mutados de la generación M1 se propagaron en parcelas de campo a lo largo de dos generaciones posteriores, lo que eventualmente produjo una alta proporción de plantas homocigóticas de generación M3 con el fin de la detección. Se esperaba que los granos mutados de la generación M3 contuvieran mutaciones génicas en una frecuencia comprendida entre 0,9 y 2,3 por 10.000 granos (Kleinhofs et al., anteriormente citado). Es notable que no se hayan detectado granos M2.

De manera interesante la presente memoria descriptiva describe un procedimiento de detección rápida de alto rendimiento para la detección de los granos de cebada mutantes M3 que carecen de la actividad de la MMT, lo que origina la falta de síntesis de SMM detectable durante el malteado. Por esta razón, los solicitantes encontraron que la SMM se acumuló principalmente en el coleóptilo y las hojas primarias de la cebada germinante y que la detección de la SMM se puede realizar al extraer aminoácidos del tejido foliar triturado de los granos germinados, de 4 días de crecimiento y seguido por hacer reaccionar los aminoácidos extraídos con OPA para formar productos altamente fluorescentes (véase FIG. 2).

En términos prácticos, se realizó cada ensayo al germinar, en una caja de plástico cerrada, con un pedazo de papel de filtro Whatman número 1 (296 x 20,9 mm), dos granos de cada uno de los 94 mutantes potenciales y dos plantas de tipo silvestre. El ensayo se repitió para los granos mutantes potenciales múltiples (ver a continuación). Al inicio de la germinación, se agregaron 25 ml de agua corriente a cada caja de plástico y después 15 ml adicionales de agua corriente en el día 2 de la germinación. Después de 4 días de germinación, se transfirió 1 a 3 cm de tejidos foliares a las placas de almacenamiento (ABgene), en las cuales cada una de las 96 pocillos de 1,2 ml contenían una perla de vidrio de 5 mm de diámetro y 500 μ l de una mezcla de 12:5:6 (v/v/v) de agua:metanol:cloroformo. La placa se agitó luego durante 45 segundos a una frecuencia de 30 Hz en un molino de laboratorio MM 300 (*Retsch*). A continuación, la placa se transfirió a una centrífuga (Rotanta 460R, Hettich) y se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para precipitar el material insoluble. Se transfirió 10 μ l del sobrenadante a una placa de almacenamiento de 96 pocillos (Waters, número de catálogo 186002481) y se mezcló 200 μ l de H₂O y 60 μ l de una solución de reacción que contiene una mezcla de 15.000:45 (v/v) del reactivo OPA (Sigma, número de catálogo 7914):ácido 3-mercaptopropiónico (Aldrich, número de catálogo M5801). La mezcla se incubó a 4 °C durante al menos 10 minutos para obtener una derivación cuantitativa de aminoácidos de muestra con OPA. Usando un sistema UPLC basado en Waters equipado con un detector de fluorescencia, se separó 2 μ l de la mezcla derivada sobre una columna Gemini C18 de 2,1 x 30 mm de partículas de 3 μ m (Phenomenex, número de catálogo 00A-4439-80), usando una elusión de gradiente al mezclar la fase móvil A (un tampón de NaH₂PO₄ a 40 mM, ajustado a un pH de 7,8) y fase móvil B [solución de 45:45:10 (v:v:v) de acetonitrilo:metanol:agua como fue descrita en (Phenomenex, 2006)]. La excitación de los derivados de OPA eluidos se realizó a 340 nm, mientras que la emisión de luz se midió a 450 nm. Un ejemplo de un cromatograma se ilustra en la FIG. 3A para mostrar el perfil de elusión del ácido aspártico (Asp), del ácido glutámico (Glu), de la asparagina (Asn), de la serina (Ser) y del SMM. Este último compuesto fue incluido ya que el propósito del proyecto en general era identificar una planta de cebada que careciera de la capacidad de sintetizar SMM; es decir, una planta para la cual el correspondiente pico del cromatograma era muy pequeño o preferentemente estaba ausente.

Conformación del método de detección, metodología 2

En paralelo con los experimentos descritos con anterioridad, en el presente ejemplo se llevaron a cabo intentos por establecer un método de detección muy rápido para la identificación de plántulas que carecen de enzima MMT activa. Sobre la base de que dichas plántulas pueden cultivarse en presencia de 250 μ M de selenito de sodio, siempre que las plantas contengan MMT activa para convertir selenito de sodio, se diseñó un examen de detección para clasificar visualmente las plántulas con crecimiento reducido en presencia de dicha concentración de selenito de sodio. En términos prácticos se colocaron 22.704 espigas, cada una consistía de 20 a 30 granos, de cebada vc. Prestige mutagenizada con NaN₃ de generación M3 en bandejas plásticas rellenas con medio de cultivo de vermiculita complementado con 250 μ M de selenito de sodio. Los granos de las espigas se dejaron germinar y se desarrollaron en plántulas de 15 cm de largo. Un total de 812 plantas caracterizadas por presentar crecimiento reducido, es decir, plántulas de <15 cm de longitud, se transfirieron a tierra fresca y se dejó que continuaran desarrollándose. No obstante, se descubrió que ninguna de dichas plantas tenía actividad de MMT reducida, como se determinó en comparación con los niveles de SMM de tipo silvestre. Por consiguiente, la metodología de detección descrita con anterioridad no reveló ningún mutante y, por lo tanto, se dio por terminada.

Ejemplo 3

Mutantes potenciales

Un total de 10.248 y 3.858 granos de cebada vc. Prestige y vc. Sebastian mutados con NaN₃, respectivamente, se examinaron para detectar el contenido de SMM (véase la metodología 1 en el ejemplo 2), con el propósito de identificar aquellas altamente reducidas en dicho contenido en comparación con los granos de tipo silvestre. Solamente se identificaron 2 mutantes potenciales de la generación M3, a saber: granos de la muestra con el número 8063 (derivados de la vc. Prestige y en lo sucesivo denominado Mutante 8063, una denominación usada también para los granos de generaciones posteriores; FIG. 3B) y los granos de la muestra con el número 14.018 (derivados de la vc. Sebastian y en lo sucesivo denominado Mutante 14018, una denominación usada también para los granos de generaciones posteriores; ilustrados en la FIG. 3B). Los granos de cada mutante se propagaron a la generación M4, luego se cosecharon y eventualmente se volvieron a analizar. El resultado verificó que los granos del Mutante 8063 y del Mutante 14018 tenían contenidos de SMM extremadamente bajos, posiblemente con una carencia total de SMM.

En un experimento separado, se empleó un análisis de transferencia de Western para verificar que el Mutante 8063 y el Mutante 14018 carecieran de la enzima MMT. Los granos de los mutantes y las correspondientes plantas de tipo silvestre se germinaron en la oscuridad durante 4 días sobre papeles de filtro impregnados en agua. Un grano de cada muestra se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 250 µl de H₂O y se homogenizó usando un pistilo.

5 Después de la centrifugación de una duración de 10 minutos a 13.000 rpm, se mezcló 15 µl del extracto líquido con 5 µl de un tampón de muestra de SDS estándar concentrado 4 veces. Usando la misma inmuno-metodología que la descrita en el ejemplo 12, y una alícuota del mismo anticuerpo anti-MMT detallado en dicho ejemplo, las proteínas de los extractos de muestra de las pepitas germinadas mencionadas con anterioridad se separaron por electroforesis de acuerdo con el tamaño y se sometieron a análisis de transferencia de Western. Se advirtió la ausencia de una
10 banda proteínica con tinción de 120 kDa, correspondiente a la MMT, para los extractos separados por tamaño del Mutante 8063 y del Mutante 14018. No obstante, fue claramente visible una banda proteínica de 120 kDa en los extractos de pepitas de tipo silvestre germinadas (FIG. 3C). La combinación de los resultados del análisis *Western* con la ausencia de SMM en extractos del Mutante 8063 y Mutante 14018, pero la presencia de SMM en extractos de pepitas de tipo silvestre (véase FIG. 3B), sustancia que el Mutante 8063 y el Mutante 14018 representan mutantes
15 nulos respecto del atributo de MMT.

Ejemplo 4

Mediciones de la actividad de la MMT del Mutante 8063

20 La enzima MMT cataliza la transferencia de un grupo metilo de SAM a Met, formando SMM (véase FIG. 1B). Al usar [³H]SAM como un sustrato, en el cual el grupo metilo se marca con tritio, la transferencia de dicho grupo metilo se puede monitorear por conteo por centelleo después de la extracción del [³H]SAM remanente por carbón activado. Este último compuesto enlaza el sustrato, pero no el producto SMM marcado, sintetizado recientemente (Pimenta et al., 1995). Esto posibilitó la determinación de las actividades de la MMT y los contenidos de SMM, estos últimos
25 determinados tal como se describió en el ejemplo 2, en extractos de 15 tallos de cada Mutante 8063 y de la vc. Prestige (FIG. 4). El examen de los datos verificó que la MMT catalizó la formación de la SMM en pepitas de tipo silvestre, una propiedad que estaba ausente en los granos del Mutante 8063.

30 Ejemplo 5

Malteado y elaboración de la cerveza de pepitas con MMT nula del Mutante 8063 en escala piloto

Los análisis de malteado y elaboración de la cerveza con malta del Mutante 8063 y malta de referencia de la vc. Power comprendieron los siguientes pasos:

- (i) germinación, incluyendo remojo, para generar malta verde, a veces seguida de secado al horno para obtener malta secada al horno;
- (ii) preparación del mosto;
- 40 (iii) separación del mosto;
- (iv) ebullición del mosto;
- (v) fermentación del mosto con la levadura *Saccharomyces carlsbergensis*;
- (vi) fermentación de fondo de la cerveza;
- (vii) filtración de la cerveza clara; y
- 45 (viii) envasado de la cerveza en botellas.

Se utilizó, tanto para el Mutante 8063 como para la vc. Power (muestra de referencia), 30 kg de malta para la elaboración de la cerveza. Las muestras de malta se molieron y luego se agregó agua corriente a 150 l por cada muestra. Se llevó a cabo una maceración a 60 °C durante 20 minutos, seguida de una elevación de 5 minutos a 65
50 °C, a cuya temperatura continuó la incubación durante 55 minutos. El producto macerado se sometió luego a una elevación a 78 °C durante 15 minutos, concluyendo la maceración después de una incubación durante 5 minutos.

Las operaciones posteriores de elaboración de la cerveza incluyeron la filtración del mosto, un paso de ebullición de 1 hora de duración y una separación en un vórtice. La fermentación de 7 días de duración, fermentación de fondo y llenado de la cerveza terminada en botellas de vidrio verde se realizó de acuerdo con las especificaciones para la práctica estándar de elaboración de la cerveza, por ejemplo, tal como fue descrito por Briggs et al., (1981) y Hough et al., (1982). En total, se llenaron 100 botellas de 33 cl con cerveza derivada de malta de tipo silvestre y malta
55 mutante.

60 Ejemplo 6

Niveles de DMS y DMSP en cerveza elaborada a partir de malta con MMT nula

La cerveza fue elaborada a partir de maltas con MMT nula y de la vc. Power, tal como se describió en el ejemplo 5. Durante los procesos de malteado y elaboración de la cerveza, se determinaron los niveles de DMS libre y DMSP en la malta verde y en la malta secada en horno (FIG. 5A), así como también en los correspondientes mostos dulces y

los mostos sometidos a ebullición y también en las cervezas terminadas (FIG. 5B).

Los niveles de DMS y DMSP se determinaron esencialmente tal como lo describen Hysert et al., (1980), con detección específica del azufre mediante el uso de cromatografía de gases por inyección en espacio de cabeza estático sobre un detector de quimioluminiscencia de azufre 350B (*Sievers*). La toma de muestras se realizó usando un automuestreador automatizado (*HS-40 Automated Headspace Sampler*, Perkin Elmer). Los niveles totales del DMS, es decir, la suma del DMS libre y del DMSP en el mosto y los extractos de malta verde y malta secada en horno, se obtuvieron al someter a ebullición las respectivas muestras bajo condiciones alcalinas durante 1 hora. Las muestras luego se sometieron a un análisis de espacio de cabeza para la determinación de los niveles de DMS. Tal como se describió con anterioridad, la diferencia entre los niveles totales de DMS en las muestras sometidas a ebullición y el DMS libre en las correspondientes muestras no sometidas a ebullición se definió para igualar la cantidad de DMSP de muestra. La cantidad de DMS libre en la cerveza se determinó esencialmente como la cantidad en mosto (Hysert et al., anteriormente citado).

15 Ejemplo 7

Cata de cerveza elaborada con malta con MMT nula

Con el propósito de establecer cómo un panel de catadores profesionales de cerveza evalúa la cerveza producida en escala piloto, elaborada con malta con MMT nula, se elaboró un perfil de cata respecto de las cervezas con un contenido medido de 4 ppm de DMS. Como referencia, se utilizó una cerveza normal de 76 ppm de DMS, que fue producida usando malta de la vc. Power.

Antes del análisis de la cata, se obtuvieron los perfiles de ésteres y alcoholes superiores de la cerveza por análisis de cromatografía de gases. La cerveza con MMT nula tenía niveles inferiores en 3 de los 12 compuestos analizados (Tabla 1). En la primera evaluación, la Mezcla 1, que consistía de etilacetato, isoamilacetato y etiloctanoato, se mezcló en la cerveza elaborada con malta con MMT nula, para asegurar que las dos cervezas tipo *lager* tuvieran niveles similares de aquellos compuestos activos en sabor que contribuyen a un perfil de éster estándar (véase la Tabla 1). El objeto de la segunda evaluación fue hacer una cerveza con éster alto con notas de sabor mejoradas. En consecuencia, la Mezcla 2 que consistía de isoamilacetato, etilhexanoato y etiloctanoato se mezcló en cerveza de malta de la vc. Power (Tabla 1), mientras que la cerveza de malta con MMT nula se mezcló tanto con la Mezcla 1 como con la Mezcla 2.

Las cervezas descritas con anterioridad fueron evaluadas luego por un panel de catadores de cerveza capacitados de 10 miembros, que evaluaron 20 atributos específicos del sabor, cada uno en una escala o clasificación, de 0 a 5 (FIG. 6).

Tal como se detalla en la FIG. 6A, para las cervezas con éster alto, existió un efecto notable sobre la percepción de los sabores aromático-fragantes en la "cerveza con DMS muy bajo" elaborada de malta con MMT nula, en comparación con una cerveza estándar adicionada al mismo nivel. Se advirtieron clasificaciones superiores para todos los sabores aromático-fragantes evaluados. Incluso en la cerveza de malta con MMT nula, que se adicionó a un perfil de éster normal (FIG. 6B), se notó una percepción mejorada de los sabores aromático-fragantes, mostrando nuevamente que un nivel bajo de DMS otorga un efecto positivo respecto de la percepción de los compuestos aromáticos de la cerveza. Una explicación de ese fenómeno es simplemente que el DMS en la cerveza enmascara el gusto de los sabores aromático-fragantes placenteros, que representan factores importantes cuando se evalúa la frescura de la bebida.

Tabla 1. Análisis del éster y del alcohol de la cerveza

Compuesto del sabor	Concentración del compuesto de sabor			
	Tipo de malta		Sabores agregados	
	vc. Power	MMT nula	Mezcla 1	Mezcla 2
		<i>Ppm</i>		
Acetaldehído	1,00	1,20		
Etilformiato	0,26	*0,24		
Etilacetato	23,40	19,40	4,00	
Isobutilacetato	0,06	0,05		
1-Propanol	13,80	13,80		
Isobutanol	9,00	9,60		
Isoamilacetato*	2,05	1,43	0,50	1,50
1-Butanol	0,21	0,23		
Isoamilalcohol**	59,00	52,00		
Etilhexanoato	0,09	0,08		0,05
n-Hexilacetato	0,01	0,01		
Etiloctanoato	0,20	0,13	0,07	0,13

Compuesto del sabor	Concentración del compuesto de sabor			
	Tipo de malta		Sabores agregados	
	vc. Power	MMT nula	Mezcla 1	Mezcla 2
* Suma de las concentraciones de 2-metil-butil acetato e isoamilacetato.				
** Suma de las concentraciones de 2-metil-1-butanol e isoamilalcohol.				

Ejemplo 8

Determinación de la secuencia del gen codificante de la MMT en cebada, vc. Prestige

5

A fin de establecer la diversidad genómica que destaca la diferencia en la actividad de la MMT entre las plantas de cebada de tipo silvestre y las mutantes, se intentó principalmente determinar la secuencia de ADN que abarca los codones de iniciación y terminación del correspondiente gen de la cebada. Para establecer la secuencia genómica previamente desconocida del gen de la MMT de la cebada, un primer paso fue purificar el ADN genómico o ADN_g de las hojas de las plántulas de cebada con 6 días de crecimiento, vc. Prestige, siguiendo las instrucciones provistas por el proveedor del kit de aislamiento del ADN en plantas (Roche, número de catálogo 1667319).

10

15

20

25

30

A continuación, se diseñaron cebadores de oligonucleótidos para enlazar la secuencia de ADN_c codificante de la MMT (n.º de referencia de GenBank AB028870; SEC ID NO: 1). Usando ADN_g de la cebada como molde, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR estándares con 6 conjuntos diferentes de cebadores, cuyas secuencias de ADN se enumeran en la Tabla 2. Se descubrió que los cebadores en pares se hibridaban en los exones 1 (incluido y cadena abajo del codón de iniciación de traducción) y 2, los exones 2 y 4, los exones 4 y 5, los exones 5 y 9, los exones 9 y 11 y los exones 11 y 12 (incluido y cadena arriba, del codón de terminación de traducción). Cinco de las seis reacciones mencionadas con anterioridad generaron fragmentos de ADN que abarcaban los exones 2 a 4, los exones 4 a 5, los exones 5 a 9, los exones 9 a 11 y los exones 11 a 12 (véase la FIG. 9). Se supuso también que una reacción genera un fragmento de ADN que abarca el codón de terminación de traducción y el exón 2 (es decir, la reacción con el conjunto de cebadores núm. 1 de acuerdo con la lista de la Tabla 2 y la FIG. 9), pero solamente se observó una reacción artificial. Si bien la razón de esta dificultad todavía no se comprende, un contenido significativamente alto de bases de G y C en el segmento génico de interés podría ser la causa del fallo en la correcta amplificación de la secuencia. Por consiguiente, se emplearon numerosos complementos de reacción por la PCR disponibles a nivel comercial, conocidos por facilitar la amplificación de las regiones génicas ricas en G-C, para intentar amplificar un fragmento de ADN cadena abajo del codón de iniciación (pero todavía incluyendo dicho codón) del gen de cebada codificante de MMT. A pesar de los numerosos intentos, todo esfuerzo por utilizar el molde de ADN_g fracasó en relación a la amplificación del fragmento especificado por los cebadores en la reacción 1, tal como se observa en la lista de la Tabla 2.

35

40

45

De manera conjunta con los experimentos con amplificación del ADN_g, también se estudió si el ADN_c derivado del ARN de las hojas de las plántulas de cebada podría constituir un molde funcional para amplificación de la secuencia del exón 1 problemática del gen para la MMT. Por consiguiente, se extrajo el ARN total y se purificó a partir de los brotes de hojas con 4 días de crecimiento de las plántulas de cebada, vc. Prestige, que emplean los componentes e instrucciones del kit FastRNA ProGreen (Q-BIOgene, número de catálogo 6045-050). Las alícuotas de las mismas se usaron en reacciones estándares de RT-PCR 8 x 2 [es decir, 8 combinaciones de los pares de cebadores (Tabla 3), cada uno con 2 tampones de reacción], tal como se detallan en las instrucciones para el kit OneStep RT-PCR (Qiagen, número de catálogo 210212). Se separaron los fragmentos en geles de agarosa al 1%; los análisis posteriores revelaron que los productos de reacción solamente se pudieron obtener mediante uso del Tampón 1 de dicho kit. Las bandas de ADN de interés se purificaron luego usando el kit de extracción de gel QiaexII (Qiagen, número de catálogo 20051). Se separaron las amplificaciones por RT-PCR con los conjuntos de cebadores núm. 7, 10 y 11 (véase la Tabla 3), en presencia de solución Q del kit de RT-PCR mencionado con anterioridad. En este caso, los fragmentos de ADN de interés también se purificaron. Después de la inserción de los fragmentos de ADN individuales en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, número de catálogo K4500-01) y transfección de células de *E. coli* con la construcción, se determinaron las correspondientes secuencias de ADN de los insertos plasmídicos.

50

55

En conjunto, los esfuerzos combinados descritos con anterioridad se cristalizaron en el ensamblaje de una secuencia genómica que abarca los codones de iniciación y terminación de traducción del gen para la MMT de cebada de la vc. Prestige (SEC ID NO: 3). A través de la alineación de ADN_c y secuencias genómicas; es decir, la alineación de la SEC ID NO: 3 con la SEC ID NO: 1, se determinó que el gen de la cebada para la MMT —tal como se ilustra en la FIG. 9— incluye 12 exones (en total, 3267 pb) separados por 11 intrones (en total, 3192 pb). La secuencia de aminoácidos derivada para la MMT de la vc. Prestige se ilustra en la FIG. 10 y se lista como la SEC ID NO: 6. Salvo para Pro157→Ala y Met985→Tyr en la secuencia de aminoácidos derivada, mencionada con anterioridad, para la MMT de la vc. Prestige, len comparación con la de la vc. *Haruna Nijo* (n.º de referencia de GenBank AB028870; SEC ID NO: 2) reveló la identidad completa (FIG. 11).

Tabla 2. Cebadores para amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de cebada.

Núm. del conjunto del cebador	Extremos del producto de la PCR*	Cebador directo (secuencia de ADN 5'→3')**	Cebador inverso (secuencia de ADN 5'→3')***
1	1-1462	ATGGCTGCGGCGGGCGGGG GACGTGG (SEC ID NO: 37)	CCTTCGAAGGGCACCACTTTTC TGC (SEC ID NO: 43)
2	1268-2214	AGGATTCCAGCAAAGAAAG AAGC (SEC ID NO: 38)	CTGGAGAGCACAGTAGTTGCT CAAG (SEC ID NO: 44)
3	2118-3075	GATTCTTAACCCCAATCCAG AGGC (SEC ID NO: 39)	CTGCATAATTTTGTGGCCAG AGC (SEC ID NO: 45)
4	2886-4409	GGGTTTTGTTGAGGACCAA TTTGGC (SEC ID NO: 40)	TACACCATTTGAGCTTGGCAGA CT (SEC ID NO: 46)
5	4301-5188	TGCTGCTTTTCGTGAACCTAT T (SEC ID NO: 41)	AAAATGGAGGCGTTTACTGCA GAA (SEC ID NO: 47)
6	5130-6459	CATATGGATCTGGACCGCA GCTTCTT (SEC ID NO: 42)	CTAGTTGCTACCATTACCTTA GCACC (SEC ID NO: 48)

*) Numeración de pares de bases como la de la secuencia genómica para la MMT (SEC ID NO: 3; véase también la FIG. 9).
 **) Secuencia en el extremo 5' del fragmento listado en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR".
 ***) Secuencia complementaria en el extremo 3' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR".

Tabla 3. Cebadores para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada.

Núm. del conjunto del cebador	Extremos del producto de RT-PCR*	Cebador directo (secuencia de ADN 5'→3')**	Cebador inverso (secuencia de ADN 5'→3')***
7	1-69	ATGGCTGCGGCGGGCGGGG GACGTGG (SEC ID NO: 49)	GTACGCCGCGTCGCCCGACG (SEC ID NO: 57)
8	1-170	ATGGCTGCGGCGGGCGGGG GACGTGG (SEC ID NO: 50)	CCGCCGGCGGCGAAGCGCCG (SEC ID NO: 58)
9	1-200	ATGGCTGCGGCGGGCGGGG GACGTGG (SEC ID NO: 51)	GTGCGGAAGCACTCGAGCCC (SEC ID NO: 59)
10	1-221	ATGGCTGCGGCGGGCGGGG GACGTGG (SEC ID NO: 52)	CGTGGATGCGGAAGTGAAG (SEC ID NO: 60)
11	1-247	ATGGCTGCGGCGGGCGGGG GACGTGG (SEC ID NO: 53)	CTTGGAGGTGGGGTTCGAGGA CGACG (SEC ID NO: 61)
12	131-200	GGCTCCTCGGCGCCGTGC GACGGCG (SEC ID NO: 54)	GTGCGGAAGCACTCGAGCCC (SEC ID NO: 62)
13	131-221	GGCTCCTCGGCGCCGTGC GACGGCG (SEC ID NO: 55)	CGTGGATGCGGAAGTGAAG (SEC ID NO: 63)
14	131-247	GGCTCCTCGGCGCCGTGC GACGGCG (SEC ID NO: 56)	CTTGGAGGTGGGGTTCGAGGA CGACG (SEC ID NO: 64)

*) Numeración de pares de bases como la de la secuencia genómica para la MMT (SEC ID NO: 3).
 **) Secuencia en el extremo 5' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR".
 ***) Secuencia complementaria en el extremo 3' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la RT-PCR".

5 Ejemplo 9

El gen codificante de la MMT del Mutante 8063 de cebada muta en el sitio de corte y empalme 5' del intrón 5

- 10 El contenido de SMM en las plántulas de cebada del Mutante 8063 es extremadamente bajo o está ausente (ejemplo 3), en línea con la ausencia de la actividad de la MMT (ejemplo 4). Sobre la base de este hallazgo, se investigó si las sustituciones de base en el gen codificante de la MMT fueron causadas por el tratamiento con mutagen de NaN₃ original de las pepitas de cebada. En consecuencia, se intentó amplificar, clonar y secuenciar dicho gen del Mutante 8063 a fin de establecer la base molecular para su fenotipo con MMT nula.
- 15 Una vez que se amplificó con 6 conjuntos de cebadores la secuencia de nucleótidos del gen de tipo silvestre para la MMT de la vc. Prestige (Tabla 2; detallada en el ejemplo 8), se condujo una metodología similar para el Mutante 8063 de cebada. En resumen, se extrajo el ADN genómico del mutante y se insertaron fragmentos amplificados y específicos del gen de la MMT del mismo en el vector pCR2.1-TOPO (*Invitrogen*, número de catálogo K4500-01), se clonaron, se secuenciaron, se unieron (SEC ID NO: 8) y finalmente se compararon con el de la cebada de tipo
- 20 silvestre. No se identificó mutación en la parte codificante de la proteína del gen para la MMT. No obstante, len comparación con las secuencias de intrones de los genes mutantes y de tipo silvestre reveló una transición de base G→A en la primera base del intrón 5 (nucleótido núm. 3076 de la SEC ID NO: 8). Dicha base es parte del sitio de corte y empalme 5' del intrón 5 y afecta el procesamiento del ARN primario del gen, es decir, el corte y empalme del ARN (Sinibaldi y Mettler, 1992; véase también la FIG. 12).

Para evaluar las posibles funciones de la mutación de base respecto de la perturbación del corte y empalme normal de genes en el gen codificante de MMT del Mutante 8063, se llevó a cabo un análisis detallado del ARN derivado del mutante a fin de detectar los intermediarios de corte y empalme. Se eligió esta metodología porque las alteraciones en el dinucleótido GT 5' de los intrones pueden generar la acumulación de los intermediarios de corte y empalme (Lai et al., 1999).

Para amplificar los fragmentos de interés, los análisis siguieron las recomendaciones provistas para uso de un kit para RT-PCR (RT-PCR OneStep de Qiagen, número de catálogo 210212). Como molde se usó 1 µg de ARN total de los brotes de hojas de las plántulas de 4 días de crecimiento de la vc. Prestige y Mutante 8063, purificadas, tal como se describió en el ejemplo 8. Usando el conjunto de cebadores 15 (Tabla 4), se diseñó la reacción de RT-PCR para amplificar la región génica que abarca el exón 3 y el exón 7 de los transcritos para la MMT de tipo silvestre de la vc. Prestige y Mutante 8063 (FIG. 12A). Después de la amplificación, se resolvieron los productos de reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (FIG. 12B).

El examen de los productos amplificados reveló solamente una única banda de la reacción con el ARN de tipo silvestre (FIG. 12B). Se separó del gel, se purificó usando los componentes del kit *QiaexII* (Qiagen, número de catálogo 20051), se insertó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, número de catálogo K4500-01), se clonó y se secuenció. Los análisis demostraron la presencia de un fragmento de 882 pb (Producto 1 en la FIG. 12B, C; SEC ID NO: 9), caracterizada por una secuencia idéntica a la que abarca las bases 442 a 1323 del ADNc de longitud completa para la MMT de la cebada de tipo silvestre (SEC ID NO: 4). Sobre la base de este hallazgo, el corte y empalme alternativo se considera irrelevante para la expresión de genes de tipo silvestre.

Una reacción de RT-PCR como la descrita en el párrafo anterior, salvo por la aplicación de ARN de molde purificado del Mutante 8063, generó tres fragmentos de ADN específicos denominados: Producto 2, Producto 3, Producto 4 en la FIG. 12B, cada uno de ellos diferente en longitud del Producto 1 amplificado usando ARN de tipo silvestre (FIG. 12B). Por consiguiente, el procesamiento previo de ARNm se obstruye por la mutación de base única en el sitio de corte y empalme 5' del intrón 5 en el gen para la MMT del Mutante 8063. Este episodio impide por completo el uso de dicho sitio de corte y empalme 5', pero activa el uso de sitios de corte y empalme ocultos adicionales.

A fin de tratar la causa molecular subyacente para lograr el objeto mencionado con anterioridad, se prepararon tres fragmentos de PCR en el Mutante 8063, cada uno para la secuenciación de ADN, usando un procedimiento como el descrito con anterioridad en el ejemplo 8 para las bandas de ADN derivadas de la PCR de la vc. Prestige. El fragmento más grande fue de 1089 pb de longitud (Producto 2 en la FIG. 12C; SEC ID NO: 10) y se encontró que incluía todo el intrón 5, mientras que el Producto 3 (FIG. 12C; SEC ID NO: 12) y el Producto 4 (FIG. 12C; SEC ID NO: 14) eran de 955 pb y 810 pb de longitud, respectivamente; por ende, más cortos que el fragmento de 882 pb del ARN de tipo silvestre (véase descripción anterior). El análisis de secuencia de ADN del Producto 3 reveló un sitio de corte y empalme oculto en el medio del intrón 5, mientras que el del Producto 4 estaba en el exón 5 (FIG. 12D).

También fue un hallazgo importante de los análisis de secuencia de ADN para descubrir los codones de terminación prematura de la traducción en el Producto 2 [TGA en posición 3088-3090 de acuerdo con la numeración de base del ADN genómico de la cebada, vc. Prestige (SEC ID NO: 3)], Producto 3 [TGA en posición 3088-3090 de acuerdo con la numeración de base del ADN genómico de la cebada, vc. Prestige (SEC ID NO: 3)] y Producto 4 [TGA en posición 3289-3291 de acuerdo con la numeración de base del ADN genómico de la cebada, vc. Prestige (SEC ID NO: 3)], que produjeron 315, 315 y 289 proteínas traducidas de longitud de aminoácidos, respectivamente. La FIG. 12C proporciona unen comparación gráfica y un resumen de los resultados de la secuenciación del Producto 1, Producto 2, Producto 3 y Producto 4, mientras que las ilustraciones en las FIG. 12D y FIG. 12E proporcionan datos específicos sobre las bases específicas implicadas en los eventos de corte y empalme alternativo.

Tabla 4. Cebadores para detectar corte y empalme alternativo del gen codificante de MMT de la cebada.

Núm. del conjunto del cebador	Extremos del producto de la RT-PCR*	Cebador directo (secuencia de ADN 5'→3')**	Cebador inverso (secuencia de ADN 5'→3')***
15†	442-1323	GTTTATGGTCTGGATATAA ACCCMG (SEC ID NO: 65)	AAATCCAGCAACAAGATT CCGAAA (SEC ID NO: 67)
16‡	246-933	AGGATTCCAGCAAAGAAA GAAGC (SEC ID NO: 66)	CTGCATAATTTTGTTC CAGAGC (SEC ID NO: 68)

† Para RT-PCR con uso del molde de ARN del Mutante 8063.
 ‡ Para RT-PCR con uso del molde de ARN del Mutante 14018.
 *) Numeración de pares de bases como la de ADNc para la MMT (SEC ID NO: 14).
 **) Secuencia en el extremo 5' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR".
 ***) Secuencia complementaria en el extremo 3' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR".

Ejemplo 10**Plásmido de expresión codificante de la MMT de tipo silvestre**

5 A raíz de las siguientes dos observaciones:

- (i) las células de *E. coli* carecen de MMT y de la habilidad para sintetizar la SMM (Thanbicher et al., 1998);
- (ii) la MMT de la planta se puede sintetizar en *E. coli* (Tagamount et al., 2002);

10 la expresión heteróloga de la MMT de la cebada mutada o truncada en la bacteria mencionada con anterioridad posibilita una forma novedosa para simular —o confirmar— su falta de actividad enzimática. Como la MMT recombinante la de la cebada de tipo silvestre de *E. coli* servía como control positivo en dichos experimentos, una tarea fue diseñar y construir un plásmido de expresión de *E. coli* para la expresión heteróloga de la MMT de la cebada.

15 Para amplificar las secuencias relevantes, primero se extrajo el ARN total de los brotes de hojas de las plántulas de 4 días de crecimiento de la vc. Prestige (tal como se detalló en el ejemplo 9) y se usó 1 µg del mismo como molde en una reacción estándar de RT-PCR, salvo que se agregó el conjunto de cebadores 17 a la mezcla de reacción (Tabla 5). El producto amplificado se insertó en el vector pCR2.1-TOPO (*Invitrogen*), lo que originó el plásmido pCR2.1-TOPO-MMT. Después de la clonación del plásmido, se secuenció el inserto entero (SEC ID NO: 5) y se comparó con el de la vc. Prestige (SEC ID NO: 4). Se identificaron tres diferencias del nucleótido inducidas por PCR en el producto clonado (T1310→A, T2954→C y G3031→A), posibilitando las sustituciones de aminoácidos de la MMT Leu437→His, Tyr985→Met y Gly1011→Ser (tal como se determinó al comparar la SEC ID NO: 6 y la SEC ID NO: 7). No se esperaba que ninguno de los cambios de aminoácidos comprometiera la acción de la MMT recombinante de alguna forma relevante para la presente solicitud. Esta conclusión se basó en el hallazgo de que la proteína expresada era activa y podía ser reconocida por los anticuerpos anti-MMT (véase el ejemplo 12).

20 A continuación, se cortó el pCR2.1-TOPO-MMT con NdeI-EcoRI, lo que produjo un fragmento 5' de NdeI-EcoRI de 569 pb y un fragmento 3' de EcoRI de 2699 pb. El fragmento 5' se insertó en el vector de expresión NdeI-EcoRI-alineado pET19b (*Novagen*, número de catálogo 69677-3) y en el sitio EcoRI del plásmido resultante se insertó en el fragmento 3' de 2699 pb, lo que generó así el plásmido de generación pET19b-MMT (FIG. 13A). Este plásmido de expresión codifica la MMT enlazada a una His-tag N-terminal (MGHHHHHHHHHH; SEC ID NO: 9) y un sitio de enterocinas (SSGHIDDDDKH; SEC ID NO: 70).

Tabla 5. Cebadores para amplificar la secuencia codificante de proteínas del gen para la MMT de la cebada.

Núm. del conjunto del cebador	Extremos del producto de la RT-PCR*	Cebador directo (secuencia de ADN 5'→3')**	Cebador inverso (secuencia de ADN 5'→3')***
17	1-3267	CATATGATGGCTGCCGGCGGGGACGTGG (SEC ID NO: 71)	GAATTC7AGTTGCTACCATTCACCTTAGCACC (SEC ID NO: 72)

*) Numeración de pares de bases como la de ADNc para la MMT (SEC ID NO: 5), es decir, con exclusión de las extensiones de secuencia CAT y AATTC cadena arriba y descendente del codón de iniciación y terminación, respectivamente.

**) Secuencia en el extremo 5' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la RT-PCR", tal como lo define el conjunto de cebadores. Sitio NdeI subrayado; codón de terminación de traducción en subrayado doble.

***) Secuencia complementaria en el extremo 3' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la RT-PCR". Sitio EcoRI subrayado; codón de terminación de traducción, incluyendo el sitio EcoRI, ilustrado en cursiva.

Ejemplo 11**Plásmidos de expresión que codifican MMT truncadas del Mutante 8063**

- 5 El gen codificante de la MMT del Mutante 8063 del ejemplo 9 mostró que contenía una transición de base G→A en el sitio de corte y empalme 5' del intrón 5, lo que activó así dos sitios de corte y empalme ocultos que generaron la expresión de tres transcritos anormales (véase la FIG. 12B, C), cada uno de los cuales contenía un codón de terminación prematura.
- 10 Para confirmar que los transcritos mutantes codifican MMT no funcionales, cada marco de lectura abierto correspondiente se amplificó y se insertó en un vector de expresión de *E. coli*, tal como se describe a continuación. Es notable que dos de los transcritos ensamblados en forma alternativa —específicamente aquellos que brindan el Producto 2 y el Producto 3 (FIG. 12B)— codifiquen proteínas idénticas. Por consiguiente, solamente dos plásmidos de expresión fueron suficientes para determinar si los genes anormalmente ensamblados del Mutante 8063 de cebada codifican las enzimas MMT funcionales.

15 Conocer la secuencia de los productos empalmados ocultos en el Mutante 8063 (véase la FIG. 12D), hizo posible amplificar las partes del gen relevantes a partir del plásmido de expresión pET19b-MMT, cuya construcción se detalla en el ejemplo 10. El conjunto de cebadores 18 —tal como se enumera en la Tabla 6— se usó para amplificar las partes 3' de los genes como fragmentos SacII-BamHI del Producto 2 (SEC ID NO: 27) y el Producto 3 (SEC ID NO: 28). Posteriormente, se intercambiaron con el correspondiente fragmento de pET19b-MMT (véase FIG. 13A), lo que generó los plásmidos de expresión pET19b-line8063-Prod2 (FIG. 13B) y pET19b-line8063-Prod3 (FIG. 13C). Las reacciones que se llevaron a cabo en paralelo utilizaron el conjunto de cebadores 19 (Tabla 6), para generar el plásmido de expresión pET19b-line8063-Prod4 (FIG. 13D; la SEC ID NO: 29 listó la secuencia del Producto 4 para la clonación), diseñado para la síntesis de una MMT truncada correspondiente a la relacionada con el Producto 4 (véase la FIG. 12B).

20 La FIG. 13E brinda unen comparación detallada de las secuencias de aminoácidos de la MMT de tipo silvestre con los productos truncados codificados por el Mutante 8063.

30

Tabla 6. Cebadores para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 8063 (para las construcciones de plásmidos)

Núm. del conjunto del cebador	Extremos del producto de la PCR*	Producto final (SEC ID NO:)	Secuencia del cebador** (secuencia de ADN 5'→3')
18	1-27 736-781	27 y 28	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEC ID NO: 73) Inverso: GGATCC <u>TC</u> AAAGAATTGCTATCTGCATAATTTTTGTTT GCCAGAGC (SEC ID NO: 74)
19	1-27 667-703	29	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEC ID NO: 75) Inverso: GGATCC <u>TT</u> AGCAGCCTTGTCCTGGCCGGCCTCCCATG (SEC ID NO: 76)
*) Los números se refieren a los números de nucleótidos en el correspondiente SEC ID NO.; tal como se enumera en la columna de al lado.			
**) El subrayado simple se usa para marcar los sitios de SacII y BamHI del cebador directo y α, respectivamente. El subrayado doble indica los codones de terminación.			

Ejemplo 12

35

Las formas de MMT recombinantes del Mutante 8063 son inactivas

Para verificar que las formas de extracción de MMT del Mutante 8063 sean inactivas a nivel enzimático, las células *E. coli* de la cepa BL21 se transformaron por separado con los plásmidos pET19b, pET19b-MMT, pET19b-line8063-Prod3 y pET19b-line8063-Prod4 (véase la FIG. 13) y posteriormente se propagaron durante la noche en un caldo de cultivo Luria estándar (LB), que contenía ampicilina. Se agregó una alícuota de 1,25 ml de cada cultivo a 100 ml de LB fresco y se incubó a 37 °C hasta que la densidad celular alcanzó DO₆₀₀ = 0,6. A este punto, se agregó 40 µl de IPTG 1 M a fin de inducir la expresión de la proteína heteróloga. Después de la incubación durante toda la noche a 20 °C, las células de los cultivos individuales se precipitaron por centrifugación durante 20 minutos a 4000 rpm, a 4 °C. Cada sedimento celular se resuspendió en 5 ml de H₂O, luego se aplicó a varios ciclos de congelación y descongelación y eventualmente se incubó durante 30 minutos a 37 °C en presencia de ~750 unidades/L de

45

- nucleasa (*Sigma*, número de catálogo E8263-25KU), para reducir la viscosidad de la muestra. Después de una centrifugación de 30 minutos de duración a 4000 rpm, a 4 °C, para separar las proteínas solubles en células (definidas como las proteínas en fase líquida) de las proteínas insolubles (definidas como las proteínas en el sedimento), se lavó el sedimento adicionalmente al resuspenderlo en 2 ml de H₂O con un contenido de 1 mg de isozima. Después de la incubación de 5 minutos de duración a temperatura ambiente, la muestra se diluyó por adición de 15 ml de H₂O. Tres ciclos similares de lavado y precipitación se llevaron a cabo antes de que se extrajeran las proteínas de los cuerpos de inclusión en el sedimento con 1 ml de un tampón Tris-Cl de 50 mM —pH 8,0— con un contenido de urea de 7 M, 2 mM de β-mercaptoetanol.
- Para evaluar la actividad de la MMT, se transfirió 50 µl de las muestras que contenían proteínas solubles en células (tal como se definieron en el párrafo anterior) a 250 µl de un tampón K-fosfato de 25 mM —pH 6,0— que contenía 0,4 mM de AdoMet, 10 mM de Met, 1 mM de DTT, 0,1 mg/ml de BSA. Después de la incubación durante 1 hora a 50 °C, las muestras se filtraron y se dejaron reaccionar alícuotas de 10 µl con OPA, tal como se detalló en el ejemplo 2. Luego siguió el análisis de los niveles de SMM, tal como se describió en dicho ejemplo, con los resultados resumidos en la FIG. 14A. Solamente el extracto de las células transformadas con pET19b-MMT originó un pico del cromatograma del mismo tiempo de retención que el del estándar de la SMM. Por consiguiente, la ausencia de picos similares en los cromatogramas de las células transformadas con pET19b-line8063-Prod3 y pET19b-line8063-Prod4 indica que el Mutante 8063 carece de la capacidad de generar MMT activa.
- Se realizó un experimento separado destinado a verificar que el Mutante 8063 carece de la capacidad de generar MMT activa, de longitud completa. Se separaron muestras de 5 µl de proteínas solubles en células y muestras de 10 µl de proteínas derivadas del sedimento de los extractos de *E. coli* mencionados con anterioridad mediante electroforesis estándar y se sondaron con un anticuerpo anti-MMT policlonal de conejo dirigido contra un antígeno peptídico de 15 residuos de longitud de la MMT de la cebada [véase la FIG. 13E (el tramo de la secuencia marcado con asteriscos)]; la preparación de anticuerpo anti-MMT policlonal de 12 ml purificada por afinidad se adquirió a *Invitrogen* (Proyecto núm. L0402801K; animal núm. C7511) y se usó en análisis de transferencia de Western estándares a una dilución de 1:1000 (FIG. 14B, C)].
- En detalle, las proteínas mencionadas con anterioridad se cargaron en 10% de SDS-gel poliacrilamida y se separaron por electroforesis a 150 V durante 75 minutos, después de lo cual las proteínas se transfirieron a una membrana de floruro de polivinilideno (Immobilon-P, Millipore) mediante un aparato de transferencia o *electroblotting* (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) que funcionó a 2,5 mAmp por cm² (máximo de 25 V). Los Transblots® se colocaron durante 1 hora a 25 °C en tampón de bloqueo [1x solución salina tamponada en fosfato (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*), 1% de BSA]. Se extrajo la solución de bloqueo y se colocó la membrana en una solución de anticuerpo anti-MMT durante 1 hora. Posteriormente, la membrana se enjuagó con 1xPBS y se incubó durante 1 hora en una solución de fosfatasa alcalina IgG anticonejo de cabra (*Sigma*). Después de la incubación mencionada con anterioridad, la membrana se enjuagó en 1xTBS, seguido de la visualización de las bandas de proteínas después de la incubación usando nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (*Sigma*). Finalmente, el gel se enjuagó en agua para detener la reacción de la fosfatasa.
- La preparación del anticuerpo anti-MMT —tal como se describió con anterioridad— se usó para sondar los blots de las proteínas solubles en células y proteínas derivadas del sedimento de las células *E. coli* transformadas con pET19b-MMT (FIG. 14B, C; líneas marcadas como “2”), pET19b-line8063-Prod3 (FIG. 14B, C; líneas marcadas como “3”), pET19b-line8063-Prod4 (FIG. 14B, C; líneas marcadas como “4”) y pET19b (FIG. 14B, C; líneas marcadas como “5”). A pesar de las diferencias en los patrones de banda generales de las proteínas solubles en células y proteínas derivadas del sedimento (estas últimas generalmente aparecen como una mancha de bandas de proteínas que comienza en la parte superior del gel y se extienden de manera descendente hasta la parte inferior del mismo), la MMT de longitud completa se reconoció como una banda proteínica que migra junto con la proteína marcadora de 120 kDa (líneas marcadas como “1”) en los extractos de células transformadas con pET19b-MMT. Se espera que las formas inactivas de la proteína MMT de las células transformadas con pET19b-line8063-Prod3 y pET19b-line8063-Prod4 correspondan a las bandas teñidas intensamente en la región del blot entre 30 kDa y 40 kDa. Es notable que la banda proteínica con tinción de 80 kDa no derive de la MMT ya que también aparece en los extractos de las células de control negativo transformadas con el vector pET19b.
- Sobre la base de los resultados experimentales con la expresión heteróloga de las formas de MMT —tal como se describió con anterioridad— y diseñados para generar formas de MMT recombinantes de la cebada de tipo silvestre y el Mutante 8063, se concluyó que solamente la MMT de tipo silvestre —no las formas de MMT en dicho mutante— es activa. Por lo tanto, la capacidad de catalizar la conversión de Met a la SMM del precursor de DMS se restringe a la cebada de tipo silvestre, en contraposición con el Mutante 8063.

Ejemplo 13

Sistemas de monitoreo para el Mutante 8063 de la cebada

- Además del ensayo bioquímico para la detección de pepitas de cebada del Mutante 8063 (véase el ejemplo 2), el presente ejemplo describe un método genético diseñado para identificar pepitas mutantes o productos de las

mismas. Con las modificaciones adecuadas conocidas para la persona entendida en la técnica, el método también se puede aplicar para detectar si un determinado producto vegetal se prepara usando el Mutante 8063 de la cebada. El ensayo se basó en un análisis para detectar polimorfismo de nucleótido único (SNP), específicamente la mutación G→A en posición 3076 del gen para la MTT en el Mutante 8063, tal como se ilustra en la FIG. 15 y con características de los conjuntos de cebadores de oligonucleótidos enumerados en la Tabla 7.

Un producto de la PCR de 271 pb —con la secuencia dada como SEC ID NO: 33— se genera cuando el conjunto de cebadores núm. 20 se aplica en una reacción con el ADN genómico de la cebada de la vc. Prestige como molde, mientras que no se amplifica ningún producto cuando del ADN genómico del Mutante 8063 sirve como molde —en este último caso simplemente porque no existe formación de pares de bases entre el extremo 3' del cebador inverso y el molde (FIG. 19A). No obstante, un producto de la PCR de 271 pb se obtiene con el conjunto de cebadores núm. 21 en una amplificación por PCR con el ADN genómico del Mutante 8063 (SEC ID NO: 34; FIG 19A), ya que el cebador inverso tiene una coincidencia de secuencia completa con el molde. El conjunto de cebadores núm. 22, que consiste de cuatro de los cebadores mencionados con anterioridad, enumerados para los conjuntos de cebadores núm. 20 y 21 —dos para la amplificación de un fragmento que contiene la mutación G3076→A en el gen para la MMT del Mutante 8063 y dos para la mutación G1462→A en el gen para la MMT del Mutante 14018 (SEC ID NO: 36, véase ejemplo 17)— se diseña para monitorear la presencia de un gen para la MMT mutado que contiene ambas mutaciones de nucleótidos mencionadas con anterioridad.

Cada una de las amplificaciones por PCR mencionadas con anterioridad se realiza a nivel experimental como una reacción de la polimerasa RedTaq de 50 µl (*Sigma*, número de catálogo D6063), que consiste de 200 ng de ADN genómico y 50 a 100 pmol de cada cebador de un conjunto de cebadores específicos (Tabla 7). Después de la amplificación en un ciclador para PCR estándar (1 minuto a 95 °C; luego 30 ciclos de: 94 °C, 60 segundos; 64 °C, 30 segundos; 72 °C, 30 segundos; finalizando con 10 minutos a 72 °C), se aplicó una alícuota de 25 µl de la muestra a electroforesis estándar sobre un gel de agarosa al 2 %. Tal como se ilustra en la FIG. 15C, la PCR con el ADN genómico de la vc. Prestige en presencia del conjunto de cebadores núm. 20 y el conjunto de cebadores núm. 21 produce un fragmento de ADN de 271 pb o bien no produce ningún fragmento, respectivamente. La PCR con el ADN genómico del Mutante 8063 en presencia del conjunto de cebadores núm. 20 y el conjunto de cebadores núm. 21 no produce ningún fragmento o bien produce un fragmento de ADN de 271 pb, respectivamente. En esos casos donde este último resultado se obtiene por una PCR con el ADN genómico de un grano de cebada de identidad desconocida, existe una alta probabilidad de que el ADN de molde sea idéntico al del Mutante 8063. Otros intentos por sustentar esta conclusión incluyen los análisis para evaluar los niveles de SMM (véase el ejemplo 2) y la actividad de la MMT (véase el ejemplo 4).

Una forma separada para verificar que el Mutante 8063 carezca de MMT implica el análisis de transferencia de Western, que usa el procedimiento técnico y el anticuerpo anti-MMT, tal como se detalló en el ejemplo 3. En términos prácticos, las pepitas de la vc. Prestige y del Mutante 8063 germinaron a 20 °C durante 4 días, seguido de homogenización separada de un grano de tipo silvestre y un grano mutante, cada una en 250 µl de H₂O. Después de la centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos, se mezcló 15 µl de cada sobrenadante con 5 µl de tampón de carga de SDS, se hirvió durante 5 minutos, se cargó sobre 12 % de SDS-gel poliacrilamida, se separó por electroforesis, se sometió a transferencia *electroblotting* y eventualmente se sondó con el anticuerpo anti-MMT policlonal (FIG. 15D). Una banda proteínica de MMT distinta de 120 kDa se reconoció con facilidad en el extracto de la vc. Prestige, mientras que ninguna proteína inmunoreactiva del Mutante 8063 migró junto con la proteína marcadora de 120 kDa. Por consiguiente, el análisis de transferencia de Western mencionado con anterioridad es útil para chequear si las pepitas de cebada germinantes producen MMT o carecen de esta capacidad. Otras evaluaciones moleculares y bioquímicas se pueden emplear para confirmar si un determinado grano deriva del Mutante 8063.

Tabla 7. Cebadores para la detección de SNP del Mutante 8063

Num. del conjunto del cebador	Extremos del producto de la PCR*	Producto final (SEC ID NO:)	Cebador directo (secuencia de ADN 5'→3')****	Cebador inverso (secuencia de ADN 5'→3')****
20	2831-3101 *	33	CGATTCCAGCTTCCGGTTG (SEC ID NO: 77)	CATCTAGTCACTCAAAGAATTGCTAC (SEC ID NO: 81)
21	2831-3101 **	34	CGATTCCAGCTTCCGGTTG (SEC ID NO: 78)	CATCTAGTCACTCAAAGAATTGCTAT (SEC ID NO: 82)
22	2831-3101** 1361-1483 ***	34 36	CGATTCCAGCTTCCGGTTG (SEC ID NO: 79) GGCATCCAGATTCATCTTCAG (SEC ID NO: 80)	CATCTAGTCACTCAAAGAATTGCTAT (SEC ID NO: 83) CTACGGAAACAAGAGGTGCCAAT (SEC ID NO: 84)

*) Numeración de pares de base como el de la secuencia de tipo silvestre genómica para la MMT (SEC ID NO: 3).
 **) Numeración de pares de base como el de la secuencia genómica para la MMT del Mutante 8063 (SEC ID NO: 8).
 ***) Numeración de pares de base como el de la secuencia genómica para la MMT del Mutante 14018 (SEC ID NO: 19).
 *****) Secuencia en el extremo 5' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR".
 *****) Secuencia complementaria en el extremo 3' del fragmento indicada en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR"

Ejemplo 14**El gen codificante de la MMT del Mutante 14018 de la cebada se muta en el sitio de corte y empalme 5' del intrón 2**

5 Siguiendo el hallazgo de los niveles extremadamente bajos de SMM, o directamente nada de SMM, en los extractos del Mutante 14018 de las pepitas de cebada germinantes, la planta se sometió a análisis bajo las mismas condiciones experimentales que las detalladas para el Mutante 8063 en el ejemplo 9 anterior. No obstante, el material vegetal de tipo silvestre en este caso se obtuvo de la vc. Sebastian, ya que fue utilizado para mutagénesis con NaN_3 en el lote de pepitas que comprendían el Mutante 14018. Los experimentos para identificar la mutación, que causaron el fenotipo con MMT nula, se diseñaron y se llevaron a cabo tal como se describe en el presente documento a continuación.

15 En primer lugar, se realizó unen comparación con las distintas secuencias de ADN genómico para el gen codificante de la MMT de la vc. Sebastian (SEC ID NO: 16) para la secuencia de ADN genómico; SEC ID NO: 17 para la secuencia de ADNc; SEC ID NO: 18 para la secuencia de ADNc traducida; en todos los casos con secuencias idénticas a las de la vc. Prestige tal como se describe en el ejemplo 8 en el presente documento) y el Mutante 14018 (SEC ID NO: 19, para la secuencia genómica y SEC ID NO: 20, 21, 23, 25 para las secuencias de ADNc), concentrándose en las regiones que abarcan los codones de iniciación y terminación de la traducción. Se identificó una transición de base G→A en la parte del gen secuenciada del Mutante 14018, específicamente en un sitio de corte y empalme dador inmediatamente cadena abajo del exón 2 en la primera base del intrón 2, más específicamente en el nucleótido núm. 1462 y consecuentemente se anticipó para afectar el procesamiento de ARN primario del transcripto génico (FIG. 16).

25 En segundo lugar, al utilizar el conjunto de cebadores 16 (Tabla 4), se diseñó y estableció una reacción RT-PCR para amplificar la región génica que abarcaba el exón 2 y el exón 5 del gen codificante de la MMT de la vc. Sebastian y del Mutante 14018 (FIG. 16A). Después de la amplificación del ADN, los productos de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa; el resultado se ilustra en la FIG. 16B. De manera similar a la descrita para el Mutante 8063 en el ejemplo 9, el ARN de tipo silvestre de la vc. Sebastian produjo un fragmento de PCR — Producto 5 en la FIG. 16B— que, en longitud y secuencia de ADN (véase SEC ID NO: 20) fue idéntico al que abarca las bases 246 a 933 del ADNc de longitud completa para la MMT de cebada de tipo silvestre (SEC ID NO: 17). Este resultado destaca nuevamente que el corte y empalme alternativo no es una característica de la expresión génica de tipo silvestre.

35 En tercer lugar, el ARN de molde purificado del Mutante 14018 se utilizó en una reacción de PCR, que generó tres fragmentos específicos —denotados como Producto 6 (SEC ID NO: 21), Producto 7 (SEC ID NO: 23) y Producto 8 (SEC ID NO: 25) en la FIG. 16B, C— que fueron diferentes en longitud y secuencia del producto amplificado del molde de tipo silvestre. Esta observación sugiere que la mutación única en el sitio de corte y empalme 5' del intrón 2 en el gen para la MMT del Mutante 14018 obstruye el procesamiento previo de ARNm mediante la eliminación del sitio de corte y empalme normal pero, en cambio, activa el uso de sitios de corte y empalme adicionales ocultos. En este aspecto, tanto para el Producto 6 como para el Producto 7, se identificó un sitio de corte y empalme oculto en el intrón 2, mientras que el del Producto 8 estaba en el exón 2. Se proporciona unen comparación gráfica en la FIG. 16C de los resultados de secuenciación mencionados con anterioridad.

45 Además, los análisis de secuencia de ADN revelaron codones de terminación prematura de la traducción en el Producto 6 [TAG en las bases 1579-1581 de acuerdo con la numeración de base del ADN genómico de la cebada, de la vc. Sebastian (SEC ID NO: 16)], Producto 7 [TAA en las bases 1840-1842 de acuerdo con la numeración de base del ADN genómico de la cebada, de la vc. Sebastian (SEC ID NO: 16)] y Producto 8 [TGA en las bases 1916-1918 de acuerdo con la numeración de base del ADN genómico de la cebada, de la vc. Sebastian (SEC ID NO: 16)], que produjeron proteínas traducidas de una longitud de 186, 180 y 163 aminoácidos, enumeradas como SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 24 e SEC ID NO: 26, respectivamente. Junto con los resultados descritos con anterioridad para el Mutante 8063 (FIG. 12D, E), las ilustraciones de la FIG. 16D, E brindan datos específicos sobre la naturaleza de las bases específicas implicadas en los eventos de corte y empalme alternativo.

Ejemplo 15**Plásmidos de expresión para la síntesis de MMT truncadas del Mutante 14018**

60 El razonamiento y la estrategia de construcción de los plásmidos de expresión que dirigen la síntesis de las tres versiones recombinantes truncadas de la MMT derivada del Mutante 14018 fueron como los que se describieron en el ejemplo 11 para el Mutante 8063. En resumen, el fin experimental fue verificar que los eventos de corte y empalme aberrante del Mutante 14086 generaran transcritos que codifiquen MMT inactivas. Los tramos génicos recombinantes deberían codificar, por consiguiente, las proteínas cuyas secuencias —enumeradas en SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 24, e SEC ID NO: 26— reflejan los eventos de corte y empalme aberrante que generan el Producto 6, el Producto 7 y el Producto 8 (véase la FIG. 16B, C).

El hecho de emplear el plásmido pET19b-MMT (véase el ejemplo 10) como molde en tres PCR estándares consecutivas con los conjuntos de cebadores núm. 23, 24 y 25 (Tabla 8), generó un fragmento amplificado de 394 pb (SEC ID NO: 30). El mismo se digirió con SacII-BamHI y se ligó con el fragmento grande SacII-BamHI del pET19b-MMT (FIG. 17A), lo que originó el plásmido de expresión pET19b-line14086-Prod6 (FIG. 17B), diseñado para la síntesis de una MMT truncada correspondiente al Producto 6, tal como se ilustró en la FIG. 16B.

Al utilizar el mismo procedimiento que se describió con anterioridad en el presente documento para el fragmento de 394 pb —pero ahora con los conjuntos de cebadores con los números 23, 24 y 26 en tres amplificaciones por PCR consecutivas (Tabla 8)— se generó un fragmento de 376 pb (SEC ID NO: 31), que, ante la digestión con SacII-BamHI, se ligó con el fragmento grande SacII-BamHI del pET19b-MMT (FIG. 17A), lo que originó el plásmido de expresión pET19b-line14086-Prod7 (FIG. 17C). Este plásmido de expresión se diseñó para la síntesis de una MMT truncada correspondiente a la que originó el Producto 7, tal como se ilustra en la FIG. 16B.

En un experimento en paralelo —realizado de manera similar al descrito con anterioridad para el pET19b-MMT, pero con los conjuntos de cebadores núm. 27 y 28 (Tabla 8)— se amplificó un fragmento de 325 pb (SEC ID NO: 32) que, ante la digestión con SacII-BamHI, se ligó con el fragmento grande SacII-BamHI del pET19b-MMT (FIG. 17A), lo que originó el plásmido de expresión pET19b-line14086-Prod8 (FIG. 17D) para la síntesis de una MMT truncada correspondiente al Producto 8 (véase FIG. 16B).

Tabla 8. Cebadores para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018 (para construcciones plasmídicas)

Num. del conjunto cebador	Secuencia del cebador** (secuencia de ADN 5'→3')	Extremos del producto de la PCR**	Producto final (SEC ID NO:)
23	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEC ID NO: 85) Inverso: CGAGATAAGATAAATATCTACGGAACAAGAGG TGCCAATCTTGAAGGGCACCCTTTTCTGC (SEC ID NO: 86)	1-27 245-307	30
24	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEC ID NO: 87) Inverso: AACCTGAGTAAATGTCTAACTTCTGCAGGTCC CATGTTTGCAACAAACGAGATAAGATAAATATCT ACGG (SEC ID NO: 88)	1-27 285-354	30
25	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEC ID NO: 89) Inverso: GGATCCCTACTGGCAGACACCTAAAAGTTTCA TATAAAGTAACCTGAGTAAATGTCTAACTTCTG (SEC ID NO: 90)	1-27 329-394	30
26	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEC ID NO: 91) Inverso: GGATCCTTATATCCAGACCATAAACCTGAGTAA ATGTCTAACTTCTGC (SEC ID NO: 92)	1-27 329-376	31
27	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCTTCCGCAC (SEC ID NO: 93) Inverso: AGGTTTATCCATGCAATCTTGATAOCTCTTGGG TTTATATCCAGACCATAAACCTTGGCCACATCC CAGCTCTGCTACTG (SEC ID NO: 94)	1-27 198-277	32

Num. del conjunto del cebador	Secuencia del cebador** (secuencia de ADN 5'→3')	Extremos del producto de la PCR**	Producto final (SEC ID NO:)
28	Directo: GGCCGCGGGGCTCGAGTGCnCCGCAC (SEC ID NO: 95) Inverso: <u>GGATCCTTATAGATTGGGAGACCATCGTCGTC</u> <u>JAGTGCATTCAAGTAAAGGTTTATCCATGCAAT</u> CTTGATAGCTCTTGG (SEC ID NO: 96)	1-27 246-325	32
<p>*) Nótese que el mismo cebador directo, con el sitio SacII subrayado, se utiliza en todas las reacciones. Para los cebadores inversos, las extensiones 5' sin hibridar al ADN de molde, se indican con un subrayado ondeado; los sitios BamHI se ilustran en itálica y los codones de terminación de traducción complementarios en negrita.</p> <p>**) Los números se refieren a los números de nucleótidos en los correspondientes SEC ID NO: enumerados en la columna de al lado</p>			

Ejemplo 16

Las formas de MMT recombinantes del Mutante 14018 son inactivas

5 Se condujo el procedimiento del ejemplo 12 reemplazando los construcciones derivados del Mutante 8063 por los del Mutante 14018. Se transformaron las bacterias *E. coli* con pET19b-line14018-Prod6, pET19b-line14018-Prod7 y pET19b-line14018-Prod8 (FIG. 17A a D, con la correspondiente alineación de aminoácidos ilustrada en la FIG. 17E) –pero los experimentos excluyeron los análisis de transferencia de Western ya que el anticuerpo anti-MMT descrito en el ejemplo 12 se generó contra un tramo de secuencia ausente en la parte específica del Mutante 14018 de la MMT.

15 Ninguno de los extractos de las bacterias transformadas reveló la capacidad de generar SMM (FIG. 18), de manera que la misma argumentación que la provista en el ejemplo 12 anterior sienta las bases para la conclusión de que el Mutante 14018 de cebada genera enzimas MMT no funcionales, que carecen de la capacidad catalítica para formar la SMM, precursora de DMS.

Ejemplo 17

20 Sistemas de monitoreo para el Mutante 14018 de la cebada

Además del ensayo bioquímico de detección de pepitas de cebada del Mutante 14018 (véase el ejemplo 2), el presente ejemplo describe un método genético que se diseñó para identificar las pepitas mutantes o los productos vegetales preparados del Mutante 14018 de la cebada. Se basa en el análisis para detectar polimorfismo de nucleótido único (SNP), específicamente la mutación G→A en posición 1462 del gen para la MTT en el Mutante 14018, tal como se ilustra en la FIG. 19 y con características de los conjuntos de cebadores de oligonucleótidos enumerados en la Tabla 9.

30 Un producto de PCR de 121 pb, con la secuencia dada como SEC ID NO: 35, se genera cuando el conjunto de cebadores núm. 29 se usa en una reacción con el ADN genómico de la cebada de la vc. Sebastian como molde, mientras que no se amplifica ningún producto cuando el ADN genómico del Mutante 14018 sirve como molde –en este último caso, simplemente porque no existen pares de base entre el extremo 3' del cebador inverso y el molde (FIG. 19B). No obstante, se obtiene un producto de PCR de 121 pb con el conjunto de cebadores núm. 30 en una amplificación de PCR con ADN genómico del Mutante 14018 (SEC ID NO: 36), ya que el cebador inverso tiene una coincidencia de secuencia completa con el molde (FIG. 19B). El conjunto de cebadores núm. 31, que consiste en los cuatro cebadores mencionados con anterioridad listados para los conjuntos de cebadores núm. 29 y 30 –dos para la amplificación de un fragmento que contiene la mutación G1462→A en el gen para la MMT del Mutante 14018 (es decir, SEC ID NO: 36) y dos para la mutación G3076→A en el gen para la MMT del Mutante 8063 (es decir, SEC ID NO: 34; véase el ejemplo 9)– se diseña para monitorear la presencia de un gen para la MMT mutado que contiene ambas mutaciones de nucleótidos mencionadas con anterioridad.

45 Cada una de las amplificaciones por PCR mencionadas con anterioridad se realiza a nivel experimental como una reacción de polimerasa RedTaq de 50 µl (Sigma, número de catálogo D6063), que consiste de 200 ng de ADN genómico y 50 a 100 pmol de cada cebador de un conjunto de cebadores específicos (Tabla 7). Después de la amplificación en un ciclador para PCR estándar (1 minuto a 95 °C; luego, 30 ciclos de: 94 °C, 60 segundos; 64 °C, 30 segundos; 72 °C, 30 segundos; finalizando con 10 minutos a 72 °C), se sometió una alícuota de 25 µl de la muestra a electroforesis estándar sobre gel de agarosa al 2 %. Tal como se ilustra en la FIG. 19 C, la PCR con el ADN genómico de la vc. Sebastian en presencia del conjunto de cebadores núm. 29 y del conjunto de cebadores núm. 30 produjo un fragmento de ADN de 121 pb y no produjo ningún fragmento, respectivamente. La PCR con el ADN genómico del Mutante 14018 en presencia del conjunto de cebadores núm. 29 y del conjunto de cebadores

núm. 30 no produjo ningún fragmento y produjo un fragmento de ADN de 123 pb, respectivamente. En aquellos casos donde este último resultado se debe a una PCR con ADN genómico de un grano de cebada de identidad desconocida, existe una alta probabilidad de que el ADN de molde sea idéntico al del Mutante 14018. Otros intentos de sustentar la conclusión incluyen los análisis para evaluar los niveles de SMM (véase el ejemplo 2) y la actividad de la MMT (véase el ejemplo 4).

Una forma separada para verificar que el Mutante 14018 carezca de MMT implica análisis *Western Blot*, usando el procedimiento técnico y el anticuerpo anti-MMT, tal como se detalló en el ejemplo 3. En términos prácticos, las pepitas de la vc. Sebastian y del Mutante 14018 se germinaron a 20 °C durante 4 días, seguido de homogenización separada de la pepita de tipo silvestre y de la pepita mutante, cada una en 100 µl de H₂O. Después de la centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos, se mezcló 15 µl de cada sobrenadante con 5 µl de tampón de carga SDS, se hirvió durante 5 minutos, se cargó en 12 % de SDS-gel poliacrilamida, se separó por electroforesis, se sometió a transferencia *electroblotting* y eventualmente se sondó con el anticuerpo anti-MMT policlonal (FIG. 15D). Una banda proteínica MMT distinta de 120 kDa se reconoció con facilidad en el extracto de la vc. Sebastian, mientras que ninguna proteína inmunoreactiva del Mutante 14018 migró junto con la proteína marcadora de 120 kDa. Por consiguiente, el método de análisis de transferencia de Western mencionado con anterioridad es útil para chequear si las pepitas de cebada germinantes producen MMT o carecen de esta capacidad. Otras evaluaciones moleculares y bioquímicas se pueden emplear para confirmar si un determinado grano deriva del Mutante 14018.

20

Tabla 9. Cebadores para la detección SNP del Mutante 14018.

Num. del conjunto de cebador	Extremos del producto de la PCR	Producto final (SEC ID NO:)	Cebador directo (secuencia de ADN 5'→3')****	Cebador inverso (secuencia de ADN 5'→3')*****
29	1361-1481 *	35	GGCATCCAGATTCCATCTTCAG (SEC ID NO: 97)	CTACGGAAACAAGAGGGTGCCAAC (SEC ID NO: 101)
30	1361-1483 **	36	GGCATCCAGATTCCATCTTCAG (SEC ID NO: 98)	CTACGGAAACAAGAGGGTGCCAAT (SEC ID NO: 102)
31	1361-1483 ** 2831-3101 *** 34	36	GGCATCCAGATTCCATCTTCAG (SEC ID NO: 99) CGATTCCAGCTTCCGGTTG (SEC ID NO: 100)	CTACGGAAACAAGAGGGTGCCAAT (SEC ID NO: 103) CATCTAGTCACTCAAAGAAATTGCTAT (SEC ID NO: 104)

*) Numeración de pares de base como el de la secuencia de tipo silvestre genómica para la MMT (SEC ID NO: 16).
 **) Numeración de pares de base como el de la secuencia genómica para la MMT del Mutante 14018 (SEC ID NO: 19).
 ***) Numeración de pares de base como el de la secuencia genómica para la MMT del Mutante 8063 (SEC ID NO: 8).
 ****) Secuencia en el extremo 5' del fragmento indicado en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR".
 *****) Secuencia complementaria en el extremo 3' del fragmento indicada en la columna rotulada "extremos del producto de la PCR"

REFERENCIAS CITADAS**Documentos de patentes**

- 5 Documento de patente de los Estados Unidos con el número 4.683.195 de Mullis, K.B. et al.,
Documento de patente de los Estados Unidos con el número 4.800.159 de Mullis, K.B. et al.,
Documento de patente de los Estados Unidos con el número 5.242.694 de Reuther, H.
Documento de patente de los Estados Unidos con el número 6.660.915 de Douma, A.C. et al.,
10 Documento de patente de los Estados Unidos con el número 7.420.105 de Breddam, K. et al.,
Solicitud de patente PCT con el número WO 2005/087934 de Breddam, K. et al.,

Otras publicaciones

- 15 American Association of Cereal Chemists, "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". ISBN 0-913250-86-4 (1995).
- American Society of Brewing Chemists, "Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists". ISBN 1-881696-01-4 (1992).
- 20 Bourgis, F. et al., "S-Methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase". *Plant Cell* 11:1485-1497, 1999.
- Briggs, D.E. et al., "Malting and brewing science. Volumen I Malt and sweet wort". Chapman y Hall, Nueva York, EE. UU. ISBN 0412165805, 1981.
- 25 Dufour, J.P., "Direct assay of S-methylmethionine using high-performance liquid chromatography and fluorescence techniques". *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 44:1-6, 1986.
- 30 Durai, S. et al., "Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells". *Nucleic Acids Res.* 33:5978-5990, 2005.
- European Brewery Convention, *Analytica - EBC*. ISBN 3-418-00759-7 (1998).
- Hansen, M. et al., "Antisense-mediated suppression of C-hordein biosynthesis in the barley grain results in correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition". *J. Exp. Bot.* 58:3987-3995, 2007.
- Hough, J.S. et al., *Malting and brewing science. Volumen II "Hopped wort and beer"*. Chapman y Hall, Nueva York, EE. UU. ISBN 0412165902, 1982.
- 40 Hysert, D.W. et al., "The origin and control of dimethyl sulfide and its precursor in malt". *Tech. Q. MBAA* 17:34-43, 1980.
- 45 Iida, S. y Terada, R., "Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants". *Plant Mol. Biol.* 59:205-219, 2005.
- Imashuku, H., "Two new technologies for efficient and flexible wort boiling: 1. Rest before wort boiling to convert SMM to DMS; 2. Hop boiling separately from wort". *Third Brewing Congress. Presentación O-52, Libro del Programa*, p. 91 y diapositivas de presentación adjuntas 2008.
- 50 Institute of Brewing, "Institute of Brewing. Methods of analysis". ISBN 0-900489-10-3, 1997.
- Kleinhofs, A. et al., "Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*". *Mutat. Res.* 51:29-35, 1978.
- 55 Ko, S. et al., "S-Methylmethionine is both a substrate and an inactivator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase". *Arch. Biochem. Biophys.* 421:85-90, 2004.
- Kocsic, M.G. et al., "Insertional inactivation of the methionine S-methyltransferase gene eliminates the S-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio". *Plant Physiol.* 131:1808-1815, 2003.
- 60 Kumar, S. et al., "Gene targeting in plants: fingers on the move". *Trends Plant Sci.* 11:159-161, 2006.
- Lal, S. et al., "A splice site mutant of maize activates cryptic splice sites, elicits intron inclusion and exon exclusion, and permits branch point elucidation". *Plant Physiol.* 121:411-418, 1999.
- 65

- Maquat, L.E. y Carmichael, G.G., "Quality control of mRNA function". *Cell* 104:173-176, 2001.
- McElroy, D. y Jacobsen, J., "What's brewing in barley biotechnology?". *Bio/Technology* 13:245-249, 1995.
- 5 Meilgaard, M.C., "Prediction of flavour differences between beers from their chemical composition". *J. Agric. Food Chem.* 30:1009-1017, 1982.
- Mendell, J.T. y Dietz, H.C., "When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance". *Cell* 107:411-414, 2002.
- 10 Mudd, S.H. y Datko, A.H., "The S-methylmethionine cycle in *Lemna paucicostata*". *Plant Physiol.* 93:623-630, 1990.
- Nevo, E. "Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent". En Shewry, P.R. (ed.): *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, páginas 19-43. CAB International, Wallingford, Reino Unido. ISBN 0-85198-725-7, 1992. 1992.
- 15 Pimenta, M.J. et al., "Determination of S-adenosyl-L-methionine:L-methionine S-methyltransferase activity by selective adsorption of [methyl-3H]S-adenosylmethionine onto activated charcoal". *Anal. Biochem.* 225:167-169, 1995. Phenomenex, HPLC application. ID núm.: 15992, 2006.
- 20 Ranocha, P. et al., "The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity". *Plant J.* 25:575-584, 2001.
- 25 Rasmussen, S.K. y Hatzack, F., "Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis". *Hereditas* 129:107-112, 1998.
- 30 Robbins M.P. et al., "Gene manipulation of condensed tannins in higher plants". *Plant Physiol.* 116:1133-1144, 1998.
- Sambrook, J. y Russell, D.W., "Molecular cloning. A laboratory manual", 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU. ISBN 0-87969-577-3, 2001.
- 35 Scheuren, H. y Sommer, K., "Vaporescence versus boiling - Expulsion of aromatic compounds during the whole wort production". Third Brewing Congress. Presentación O-55, Libro del Programa, página 92 y diapositivas adjuntas de la presentación, 2008.
- 40 Sinibaldi, R.M. y Mettler I.J., "Intron splicing and intron-mediated enhanced expression in monocots". *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 42:229-257, 1992.
- Stahl, Y. et al., "Antisense downregulation of the barley limit dextrinase inhibitor modulates starch granule sizes distribution, starch composition and amylopectin structure". *Plant J.* 39:599-611, 2004.
- 45 Tagmount, A. et al., "An essential role of S-adenosyl-L-methionine:L-methionine S-methyltransferase in selenium volatilization by plants. Methylation of selenomethionine to selenium-methyl-L-selenium-methionine, the precursor of volatile selenium". *Plant Phys.* 130:847-856, 2002.
- 50 Thanbichler, M. et al., "S-Methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 181:662-665, 1998.
- Tzfira, T. y White, C., "Towards targeted mutagenesis and gene replacement in plants". *Trends Biotechnol.* 23:567-569, 2005.
- 55 von Bothmer, R. "The wild species of *Hordeum*: Relationships and potential use for Improvement of cultivated barley". En Shewry, P. R. (ed.): *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, páginas 3 a 18. CAB International, Wallingford, Reino Unido. ISBN 0-85198-725-7, 1992.
- 60 Wu, J. et al., "Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) silences the accumulation of aberrant trypsin proteinase inhibitor mRNA in *Nicotiana attenuata*". *Plant J.* 51:693-706, 2007.

Tabla 10. Listado de secuencias

SEQ ID	Tipo	Descripción
NO: 1	Ácido nucleico	ADNc de la cebada de la vc. <i>Haruna Nijo</i> , que abarca los codones de iniciación y terminación del gen de la MMT. ADNc, marco de lectura abierto para la MMT. Secuencia extraída de <i>GenBank</i> , n.º de ref. AB028870.
NO: 2	Proteína	Secuencia para la MMT de la cebada de la vc. <i>Haruna Nijo</i> , traducida de la SEC ID NO: 1.
NO: 3	Ácido nucleico	ADNg de la cebada de la vc. <i>Prestige</i> , secuencia genómica que abarca los codones de iniciación y terminación del gen para la MMT.
NO: 4	Ácido nucleico	ADNc de la cebada de la vc. <i>Prestige</i> , que abarca los codones de iniciación y terminación del gen para la MMT, secuencia de ADNc del marco de lectura abierto para la MMT.
NO: 5	Ácido nucleico	ADNc reclonado de la cebada de la vc. <i>Prestige</i> ; ADNc reclonado del marco de lectura abierto para la MMT que abarca los codones de iniciación y terminación del gen para la MMT, pero que contiene tres mutaciones (véase el Ejemplo 10). Utilizada para expresión heteróloga de la MMT de la cebada en <i>E. coli</i> .
NO: 6	Proteína	Secuencia para la MMT de la cebada de la vc. <i>Prestige</i> , traducida de la SEC ID NO: 4
NO: 7	Proteína	Secuencia para la MMT de la cebada, vc. <i>Prestige</i> , traducida de SEC ID NO: 5, utilizada para la síntesis de la MMT en <i>E. coli</i> .
NO: 8	Ácido nucleico	ADNg de la cebada del Mutante 8063, Secuencia genómica para la MMT que abarca los codones de iniciación y terminación del gen para la MMT.
NO: 9	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR de la cebada, vc. <i>Prestige</i> , correspondiente al Producto 1 en la FIG. 12B, C.
NO: 10	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR del Mutante 8063 de cebada, correspondiente al Producto 2 en la FIG. 12B, C.
NO: 11	Proteína	Secuencia entera traducida, derivada de ARN no ensamblado del Mutante 8063; dicho ARN funciona como molde en la amplificación por RT-PCR, lo que forma el Producto 2 en la FIG. 12B, C.
NO: 12	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR del Mutante 8063 de cebada, correspondiente al Producto 3 en la FIG. 12B, C.
NO: 13	Proteína	Secuencia entera traducida, derivada de ARN no ensamblado del Mutante 8063; dicho ARN funciona como molde en la amplificación por RT-PCR, lo que forma el Producto 3 en la FIG. 12B, C.
NO: 14	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR del Mutante 8063 de cebada, correspondiente al Producto 4 en la FIG. 12B, C.
NO: 15	Proteína	Secuencia entera traducida, derivada de ARN no ensamblado del Mutante 8063; dicho ARN funciona como molde en la amplificación por RT-PCR, lo que forma el Producto 4 en la FIG. 12B, C.
NO: 16	Ácido nucleico	ADNg de la cebada de la vc. <i>Sebastian</i> . Secuencia genómica para la MMT que abarca los codones de iniciación y terminación del gen para la MMT
NO: 17	Ácido nucleico	ADNc de la cebada de la vc. <i>Sebastian</i> , secuencia del ADNc del marco de lectura abierto para la MMT que abarca los codones de iniciación y terminación del gen para la MMT.
NO: 18	Proteína	Secuencia para MMT de la cebada de la vc. <i>Sebastian</i> , traducida de la SEC ID NO: 17
NO: 19	Ácido nucleico	ADNg de la cebada del Mutante 14018. Secuencia genómica para la MMT que abarca los codones de iniciación y terminación del gen para la MMT.
NO: 20	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR de cebada de la vc. <i>Sebastian</i> , correspondiente al Producto 5 en la FIG. 16B, C.

ES 2 586 616 T3

SEQ ID	Tipo	Descripción
NO: 21	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR del Mutante 14018 de cebada, correspondiente al Producto 6 en la FIG. 16B, C.
NO: 22	Proteína	Secuencia entera traducida, derivada de ARN no ensamblado del Mutante 14018; dicho ARN funciona como molde en la amplificación por RT-PCR, lo que forma el Producto 6 en la FIG. 16B, C.
NO: 23	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR del Mutante 14018 de cebada, correspondiente al Producto 7 en la FIG. 16B, C.
NO: 24	Proteína	Secuencia entera traducida, derivada de ARN no ensamblado del Mutante 14018; dicho ARN funciona como molde en la amplificación por RT-PCR, lo que forma el Producto 7 en la FIG. 16B, C.
NO: 25	Ácido nucleico	Secuencia de fragmento amplificado por RT-PCR del Mutante 14018 de cebada, correspondiente al Producto 8 en la FIG. 16B, C.
NO: 26	Proteína	Secuencia entera traducida, derivada de ARN no ensamblado del Mutante 14018; dicho ARN funciona como molde en la amplificación por RT-PCR, lo que forma el Producto 8 en la FIG. 16B, C.
NO: 27	Ácido nucleico	Fragmento SacII-BamHI del Producto 2 (FIG. 12B, C) – con un sitio BamHI introducido directamente cadena abajo del codón de terminación de traducción – para la construcción del plásmido de expresión pET19b-line8063-Prod2 (véase la FIG. 13B).
NO: 28	Ácido nucleico	Fragmento SacII-BamHI del Producto 3 (FIG. 12B, C) - con un sitio BamHI introducido directamente cadena abajo del codón de terminación de traducción – para la construcción del plásmido de expresión pET19b-line8063-Prod3 (véase la FIG. 13C) (idéntica al SEC ID NO: 27).
NO: 29	Ácido nucleico	Fragmento SacII-BamHI del Producto 4 (FIG. 12B, C) —con un sitio BamHI introducido directamente cadena abajo del codón de terminación de traducción— para la construcción del plásmido de expresión pET19b-line8063-Prod4 (véase el FIG. 13D).
NO: 30	Ácido nucleico	Fragmento SacII-BamHI del Producto 6 (FIG. 16B, C) —con un sitio BamHI introducido directamente cadena abajo del codón de terminación de traducción— para la construcción del plásmido de expresión pET19b-line14018-Prod6 (véase la FIG. 17B).
NO: 31	Ácido nucleico	Fragmento SacII-BamHI del Producto 7 (FIG. 16B, C) —con un sitio BamHI introducido directamente cadena abajo del codón de terminación de traducción— para la construcción del plásmido de expresión pET19b-line14018-Prod7 (véase la FIG. 17C).
NO: 32	Ácido nucleico	Fragmento SacII-BamHI del Producto 8 (FIG. 16B, C) —con un sitio BamHI introducido directamente cadena abajo del codón de terminación de traducción— para la construcción del plásmido de expresión pET19b-line14018-Prod8 (véase la FIG. 17D).
NO: 33	Ácido nucleico	Fragmento de la PCR generado de ADN genómico de la vc. Prestige, amplificado usando el conjunto de cebadores núm. 20 (véase la Tabla 7).
NO: 34	Ácido nucleico	Fragmento de la PCR generado de ADN genómico del Mutante 8063, amplificado usando el conjunto de cebadores núm. 21 (véase la Tabla 7).
NO: 35	Ácido nucleico	Fragmento de la PCR generado de ADN genómico de la vc. Sebastian, amplificado usando el conjunto de cebadores núm. 29 (véase la Tabla 9).
NO: 36	Ácido nucleico	Fragmento de la PCR generado de ADN genómico del Mutante 14018, amplificado usando el conjunto de cebadores núm. 30 (véase la Tabla 9).
NO: 37	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.

ES 2 586 616 T3

SEQ ID	Tipo	Descripción
NO: 38	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada
NO: 39	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 40	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 41	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 42	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 43	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 44	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 45	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 46	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 47	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 48	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia genómica codificante de la MMT de la cebada.
NO: 49	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 50	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 51	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada.
NO: 52	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada.
NO: 53	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada.
NO: 54	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 55	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 56	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada.
NO: 57	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada.
NO: 58	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 59	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 60	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 61	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 62	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 63	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 64	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de la secuencia de ADNc codificante de la MMT de la cebada
NO: 65	Ácido nucleico	Cebador directo para detectar el corte y empalme alternativo del gen codificante de la MMT de la cebada.
NO: 66	Ácido nucleico	Cebador directo para detectar el corte y empalme alternativo del gen codificante de la MMT de la cebada.
NO: 67	Ácido nucleico	Cebador inverso para detectar el corte y empalme alternativo del gen codificante de la MMT de la cebada.
NO: 68	Ácido nucleico	Cebador inverso para detectar el corte y empalme alternativo del gen codificante de la MMT de la cebada.
NO: 69	Péptido	His-tag
NO: 70	Péptido	Sitio de la enteroquinasa

SEQ ID	Tipo	Descripción
NO: 71	Ácido nucleico	Cebador directo para amplificar la secuencia codificante de proteínas del gen para la MMT de la cebada.
NO: 72	Ácido nucleico	Cebador inverso para amplificar la secuencia codificante de proteínas del gen para la MMT de la cebada.
NO: 73	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 8063
NO: 74	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 8063
NO: 75	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 8063
NO: 76	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 8063
NO: 77	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 78	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 79	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 80	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 81	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 82	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 83	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 84	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 8063
NO: 85	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 86	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 87	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 88	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 89	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 90	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 91	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 92	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 93	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 94	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 95	Ácido nucleico	Cebador directo para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 96	Ácido nucleico	Cebador inverso para la amplificación de los fragmentos de ADN del Mutante 14018
NO: 97	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 14018
NO: 98	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 14018
NO: 99	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 14018
NO: 100	Ácido nucleico	Cebador directo para la detección SNP del Mutante 14018
NO: 101	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 14018
NO: 102	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 14018
NO: 103	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 14018
NO: 104	Ácido nucleico	Cebador inverso para la detección SNP del Mutante 14018

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Carlsberg Breweries A/S
Heineken Supply chain B.V.
- <120> Bebidas derivadas de cebada y malta con bajo nivel de DMS
- <130> P1600PC00
- 10 <160> 104
- <170> PatentIn version 3.4

ES 2 586 616 T3

<210> 1
 <211> 3267
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. Haruna Nijo

5

<400> 1
 atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcctggcgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
 gcggcgtacg gcgccgcca a ggccgtgctg gaggcggctc aggcgccggc cacgcgcgcc 120
 gaggccaggc ggctcctcgg cggcgtgcga cggcgccttc ccgccggcgg cccggcccg 180
 gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccac acgtcgtcct cgacccccac 240
 ctccaaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt 300
 ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcatccaga ttccatcttc 360
 agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca 420
 gaaaagtggg gcccttcgaa ggtttatggg ctggatataa acccaagacc tatcaagatt 480
 gcatggataa acctttactt gaatgacta gacgacgatg gtctcccaat ctatgatgcg 540
 gaggggaaaa cattgcttga cagagtcgaa ttctatgaat ctgatcttct ttcttactgt 600
 agagataaca agatagaact tgatcgcatt gttggatgca taccacagat tcttaacccc 660
 aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc 720
 ttgagcaact actgtgctct ccagggtttt gttgaggacc aatttggcct cgggttgatt 780
 gctcgggctg ttgaagaagg gatattctgt ataaagccta gtggtcttat ggtattcaac 840
 atgggaggcc ggccaggaca aggtgtctgt gaggcgcctat ttcttcgccg tggatttcgc 900
 atcaataagc tctggcaaac aaaaattatg caggctgccg acacagacat ctccgcttta 960
 gttgaaattg agaaaaatag ccggcatcgc ttcgagttct ttatggatct tgttggggat 1020
 cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg catttcacat 1080
 gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtgaagaa aatatttgag 1140
 ttccttaaag acggattcca tgaagtcagc agctccctcg atttgtcctt tgatgatgat 1200
 tctgttgctg atgaaaaat tcctttccta gcatacctag ctagtcttct gcaagagaat 1260
 aagtctaata cttgtgagcc tccagctgga tgtttaaatt tccggaatct tgttgctgga 1320
 tttatgaaga gttaccacca catcccatta actcctgata atgttgttgt gttcccatcc 1380
 cgtgctggtg caatcgaaaa tgctcttcgg ttgttctcac ctggacttgc aattggtgac 1440
 gaacacctaa ccagacactt gcccaagcaa tggttaacat ctttagcaat tgaggaaagt 1500

aaccatgcta aagatacagt aactgtaatc gaagcaccac gccaatcaga tttgctgatt 1560
gagttgatca ggaaactgaa gccccagggt gttgttactg gcatggctca gtttgaggct 1620
atcaccagtg ctgctttcgt gaacttatta agtgtaacga aagatggttg tccccgatta 1680
ttactagata tttcagaaca tctggaattg tctagtctgc caagctcaaa tgggtgattg 1740
aaatatcttg ctgggaagac cctgccttca catgaggcta tattgtgtgg cttagttaag 1800
aatcagggtt attctgatct ggaagttgct tttgctatct ctgaagatcc aactgtttat 1860
aaggcattgt cacaaactat tgagctattg gaaggacata cttctgtgat cagccagcac 1920
tattatgggt gtcttttcca tgagctgctg gcatttcaaa ttggtgaccg gcatccacaa 1980
caagagagag aacctgcaga agtgatatct aaggagatga tagggttttc aagttcagct 2040
atgtccacc tagaaggagc tgagtttttc gttcctgggt ccatggaatc cgggtgcata 2100
catatggatc tggaccgcag cttcttgcca gtaccttctg cagtaaaccg ctccattttc 2160
gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaactg atgtccgttc cagcattcag 2220
cagctgggtg aagatagcta tggtttctca gcaggcggtg cttctgaaat tatatacggg 2280
aacacctgtc tcgctctctt caacaagctt gttctttgct gcatgcaaga acagggcacc 2340
ttgcttttcc ctttgggaac caacgggcat tatgtcaacg cagcaaagtt tgtgaatgca 2400
accaccttga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta 2460
gccgacacac tagagaaggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaatcaac 2520
cctactggct tctgtacag tgacgacgat atagcagagc tgctttctgt ctgtgcgaca 2580
tacggagcca ggggtggtgat agatacctcc tcctctggtc tggagttcca agccaccggc 2640
tgcagccagt ggaatttggg aagatgtctt tctaattgca agtcttcaaa gccctcgttc 2700
tccgttgtcc tgctcggaga gctgtccttt gagctgacca cggctgggct tgatttcggg 2760
tttctgatta tgagcgactc gtccttgggt gacacatttt acagtttccc aagcttgagt 2820
cggccacaca gcacgttgaa gtacactttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag 2880
gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgccgac 2940
cagttgatca agatgcttga gagctgcggc tgggacgctg tgggctgcca tggcggcatc 3000
tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt ggcaaatcgc tcaagggtgga cggctttgag 3060
ggcaagctgg acagccacaa catgagggaa gccctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt 3120
agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc 3180
ggcgacttcg accgggcat ggagtgatc gcccggttca gggagctggt ccttgggtggc 3240
ggtgctaagg tgaatggtag caactag 3267

<210> 2
<211> 1088
<212> PRT
<213> Cebada, vc. Haruna Nijo

5

<400> 2

ES 2 586 616 T3

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
Página 2

ES 2 586 616 T3

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

ES 2 586 616 T3

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

ES 2 586 616 T3

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

ES 2 586 616 T3

Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845

Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860

Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880

Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895

Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910

Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925

Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940

Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960

Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975

Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990

Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Al
 995 1000 1005

Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020

Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035

Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050

Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065

Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080

Val Asn Gly Ser Asn
 1085

ES 2 586 616 T3

<210> 3
 <211> 6459
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. Prestige

5

<400> 3

```

atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttctggcgg cgtgccaggc gtcgggacgac      60
gctggctacg gcgccgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgcgcc      120
gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcga cggcgcctcg ccgccggcgg cccggccgcg      180
gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccag acgtcgtcct cgacccccac      240
ctccaagggt gccccgcccc ttccctacac acccgttgtc gacccgcacg tctttcgccg      300
atctggccgt caaaagcacg cggcttggtg gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta      360
tggctggcca gtcgatcagt aatttgcca taactggagt ataacctgg tctctaactc      420
ctacctgacc atataccgag ttggttttct ttcttctgt ttccgtattt gtgtagtttt      480
ttcttttctt tcgagcatga tgttctttga attaatgcgt accagactcc agtaattcga      540
cattttgaat tttggcgagt gttcttgaa ttataacac aacgaggctt tgatcaagtg      600
gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattctcta tttccaaca      660
atttgatgg cctctaagca tctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agatttattc      720
atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt      780
tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag      840
tggggcaagc atgctgcaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt      900
tatctttttt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaaccta      960
taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac     1020
taaataggac atctgtccgc tatatcttta gtaataaatt gtatatagac gcagtctttg     1080
tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga     1140
cttctttgtt acgttttgtg tgcataaagc attaacttct gtcttttagtt ggcgcagcgg     1200
taaaaacacc cattgcttaa tattttattt gctttccgta gcttgataaa atttcaactg     1260
cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agataccag cattttcatt     1320
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattcaga ttccatcttc     1380
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt ggatatccat tgcacttgca     1440
gaaaagtggg gcccttcgaa ggttggcacc tcttgttccg tagatattta tcttatctcg     1500
tttgttgcaa acatgggacc tgcagaagtt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa     1560
cttttaggtg tctgccagta gtctgctggt ggtctaattt tcttgggata cctgatgccg     1620
tcgagcatat tgctttcaa ttttgggcaa ggcattacca ccacatattg tttctacaat     1680
gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt     1740
ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgagtc agcttggcat taccttactt     1800
gagccttggg tgttcttttg aaggtttatg gtctggatat aaaccaaga gctatcaaga     1860
ttgcatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tggctctcca atctatgat     1920
    
```

ES 2 586 616 T3

cggaggggaa aacattgctt gacagagtcg aattctatga atctgatctt ctttcttact 1980
 gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttgttgatg cataccacag gtacggtcag 2040
 gtttttacca atttcctgtg aatggggatt atagtcgatc agaacttgat caaaatgccc 2100
 ttaatatctg ctttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact 2160
 gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccagggtgagt 2220
 tgagatctat ttaaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaattggtt acccatgtca 2280
 gagtctccaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact ttaagttct 2340
 atcctgaaat tgactttaca atgcttgctc ataatctgct tacgaaatat gcgtttgaac 2400
 atttctcttt tccttgtagg catgtggtca gacctttata taagaaaatg aagtttttgt 2460
 agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct 2520
 aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgtg taatatatat atgtcgatag 2580
 ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia 2640
 cctgtatgga caaatgtgat cagcacccca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata 2700
 tggaaattatt aacagcggta tttattttta ccctgtttaa ttttttcctt tgctaaaaga 2760
 atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg 2820
 gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc 2880
 attcagggtt ttgttgagga ccaatttggc ctccgggttg ttgctcgggc tgttgaagaa 2940
 gggatatctg tgataaagcc tagtggctct atggatttca acatgggagg ccggccagga 3000
 caaggtgtct gtgagcgctt atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa 3060
 acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttaactaat cccagtgttt 3120
 ttccatgcca gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgacac 3180
 caatcttcag ctgggcctag aattttcctc taccggctta catttttaca ttacagaacc 3240
 aatttttgtt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat 3300
 ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct 3360
 tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg 3420
 catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat 3480
 actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg 3540
 agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag 3600
 ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaaattc ctttcttagc 3660
 atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaatect tgtgagcctc cagctggatg 3720
 tttaaatttc cggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tcccattaac 3780
 tcctgatgta agacttggtg tctattgcct acaattatgt ttgcttatta gaaattcata 3840
 agatcaacct atttgatgct tctcacgat gcttcatgtg aacttcctt ttcctctggt 3900
 gcaccagaat gttgttgtgt tccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt 3960
 gttctcacct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaacc agacacttgc ccaagcaatg 4020

ES 2 586 616 T3

gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc ccctctttct ttctgtgttt 4080
 ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagt atgctgacaa gaatttcgat 4140
 gttattgcca ttcttctaaa tttcaggaaa gtaaccatgc taaagataca gtaactgtaa 4200
 tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg 4260
 ttgttgttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgctttc gtgaacttat 4320
 taagtgtaac gaaagatggt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat 4380
 tgtctagtct gccaaagctca aatgggtgat tgaatatatct tgctgggaag accctgcctt 4440
 cacatgctggc tatattgtgt ggcttagtta agaatcagggt gtgtgtcaat cagcctgaac 4500
 tctagttgaa ctgttgtgca tactatatag aatatcttga cttttatatg tactttagaa 4560
 acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatttta cttgcagggt tattctgatc 4620
 tggaagttgc ttttgcctac tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta 4680
 ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgtcttttcc 4740
 atgagctgct ggcatttcaa attgggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggctt 4800
 gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca 4860
 agtggacact ccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta 4920
 gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca 4980
 tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatatcta 5040
 aggagatgat agggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttcg 5100
 ttcttggttc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
 taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
 ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
 caggcggcgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
 ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
 acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
 caggcttcaa gatcgaacca agtgccttag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
 gggctctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
 tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gatacctcct 5640
 cctctggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttgaa agatgtcttt 5700
 ctaatgtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgtcct gctcggagag ctgtcctttg 5760
 agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
 acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
 ggaagctggt gggctcttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
 agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatc 6000
 ctgtgtttag gctctctggt ttcttccctt gatcagctct ccgatccctt tacatcctta 6060

ES 2 586 616 T3

ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgTTTT 6120
 attttctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
 catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaadc gctcaaggTg 6240
 gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
 gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccgg actactgccg cttcagcttt 6360
 gctctggaga gcggcgactt cgaccgggCC atggagtgca tcgcccggtt cagggagctg 6420
 gtccttggtg gcgggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

<210> 4
 <211> 3267
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. Prestige

5

<400> 4
 atggctgCGG cggcggggga cgtggaggcg ttcttgCGG cgtgccaggc gtcgggCGac 60
 gcggcgTAcg gcgccGcCaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgcgcc 120
 gaggccaggc ggctcctcgg cggcgtgCGa cggcgttctg ccgccggcgg cccggcccg 180
 gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccag acgtcgtcct cgacccccac 240
 ctccaaggat tccagcaaaG aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt 300
 ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcatccaga ttccatcttc 360
 agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt ggatatccat tgcacttgca 420
 gaaaagtggT gcccttcgaa ggtttatggt ctggatataa acccaagagc tatcaagatt 480
 gcatggataa acctttactt gaatgcacta gacgacgatg gtctcccaat ctatgatgcg 540
 gaggggaaaa cattgcttga cagagtcgaa ttctatgaat ctgatcttct ttcttactgt 600
 agagataaca agatagaact tgatcgcatt gttggatgca taccacagat tcttaacccc 660
 aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc 720
 ttgagcaact actgtgctct ccagggtttt gttgaggacc aatttggcct cgggttgatt 780
 gctcgggctg ttgaagaagg gatatctgtg ataaagccta gtggtcttat ggtattcaac 840
 atgggaggcc ggccaggaca aggtgtctgt gagcgcctat ttctacgccg tggatttcgc 900
 atcaataagc tctggcaaac aaaaattatg caggctgctg acacagacat ctccgcttta 960
 gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct tgttggggat 1020
 cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg catttcacat 1080
 gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtgaagaa aatatttgag 1140
 ttcttaaag acggattcca tgaagtcagc agctccctcg atttgcctt tgatgatgat 1200
 tctgttgctg atgaaaaaat tctttccta gcatacctag ctagtctctt gcaagagaat 1260
 aagtctaadc cttgtgagcc tccagctgga tgtttaaatt tccggaatct tgttgctgga 1320
 tttatgaaga gttaccacca catcccatta actcctgata atggtgttgt gttcccatcc 1380
 cgtgctgTtg caatcGaaaa tgctcttcgg ttgttctcac ctggacttgc aattgTtgac 1440

ES 2 586 616 T3

gaacacctaa ccagacactt gcccaagcaa tggttaacat ctttagcaat tgaggaaagt 1500
 aaccatgcta aagatacagt aactgtaatc gaagcaccac gccaatcaga tttgctgatt 1560
 gagttgatca ggaaactgaa gcctcagggt gttgttactg gcatggctca gtttgaggct 1620
 atcaccagtg ctgctttcgt gaacttatta agtghtaacga aagatggttg tccccgatta 1680
 ttactagata tttcagaaca tctggaattg tctagtctgc caagctcaaa tgggtgattg 1740
 aaatatcttg ctgggaagac cctgccttca catgaggctc tattgtgtgg cttagttaag 1800
 aatcaggttt attctgatct ggaagttgct tttgctatct ctgaagatcc aactgtttat 1860
 aaggcattgt cacaaactat tgagctattg gaaggacata cttctgtgat cagccagcac 1920
 tattatgggt gtcttttcca tgagctgctg gcatttcaaa ttggtgaccg gcatccacaa 1980
 caagagagag aacctgcaga agtgatatct aaggagatga tagggtttcc aagttcagct 2040
 atgtccacc tagaaggagc tgagttttc gttcctgggt ccatggaatc cgggtgcata 2100
 catatggatc tggaccgcag cttcttgcca gtaccttctg cagtaaaccg cttcattttc 2160
 gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaaccg atgtccgttc cagcattcag 2220
 cagctgggtg aagatagcta tggtttctca gcaggcgggt cttctgaaat tatatacggg 2280
 aacacctgtc tcgctctctt caacaagctt gttctttgct gcatgcaaga acagggcacc 2340
 ttgcttttcc ccttggaac caacgggcat tacgtcaacc cagcaaagt tgtgaatgca 2400
 accaccttga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta 2460
 gccgacacac tagagaagggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaaatcaac 2520
 cctactggct tcctgtacag tgacgacgat atagcagagc tgctttctgt ctgtgcgaca 2580
 tacggagcca ggggtggtgat agatacctcc tcctctgggtc tggagttcca agccaccggc 2640
 tgcagccagt ggaatttggg aagatgtctt tctaagtca agtcttcaaa gccctcgttc 2700
 tccgttgctc tgctcggaga gctgtccttt gagctgacca cggctgggct tgatttcggg 2760
 tttctgatta tgagcgactc gtccttgggt gacacatttt acagtttccc aagcttgagt 2820
 cggccacaca gcacgttgaa gtacacgttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag 2880
 gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgccgac 2940
 cagttgatca agacgcttga gagctgcggc tgggacgctg tgggctgcca tggcggcacc 3000
 tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt ggcaaatcgc tcaaggtgga cggctttgag 3060
 ggcaagctgg acagccacaa catgagggaa gccctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt 3120
 agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc 3180
 ggcgacttcg accgggcat ggagtgcac gcccggttca gggagctggt ccttgggtggc 3240
 ggtgctaagg tgaatggtag caactag 3267

<210> 5
 <211> 3267
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. Prestige

5

<400> 5

ES 2 586 616 T3

atggctgctg cggcggggga cgtggaggcg ttcttggcgg cgtgccaggc gtcgggagac 60
gcggcgtacg gcgccgcca ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgtgca 120
gaggcccgtc ggctcctcgg cgccgtgcga cgtcgttttg cagcagggtg tccagccgcg 180
gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccacg acgtcgtcct cgacccccac 240
ctccaaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt 300
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattccaga ttccatcttc 360
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca 420
gaaaagtggg gcccttcgaa ggtttatggt ctggatataa acccaagagc tatcaagatt 480
gcatggataa acctttactt gaatgcacta gacgacgatg gtctcccaat ctatgatgcg 540
gaggggaaaa cattgcttga cagagtcgaa ttctatgaat ctgatcttct ttcttactgt 600
agggataaca agatagaact tgatcgcatt gttggatgca taccacagat tcttaacccc 660
aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc 720
ttgagcaact actgtgctct ccagggtttt gttgaggacc aatttggcct cgggttgatt 780
gctcgggctg ttgaagaagg gatattctg ataaagccta gtggtcttat ggtattcaac 840
atgggaggcc ggcccgggca aggtgtctgt gagcgcctat ttcttcgccg tggatttcgc 900
atcaataagc tctggcaaac aaaaattatg caggctgccg acacagacat ctccgcttta 960
gttgaaattg agaaaaatag ccggcatcgc ttcgagttct ttatggatct tgttggggat 1020
cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg catttcacat 1080
gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtgaagaa aatatttgag 1140
ttccttaag acggattcca tgaagtcagc agctccctcg atttgtcctt tgatgatgat 1200
tctgttgctg atgaaaaat tctttccta gcatacctag ctagtttctt gcaagagaat 1260
aagtctaatc cttgtgagcc tccagctgga tgtttaaatt tccggaatca tgttgctgga 1320
tttatgaaga gttaccacca catcccatta actcctgata atgttgttgt gttcccatcc 1380
cgtgctgttg caatcgaaa tgctcttcgg ttgttctcac ctggacttgc aattgttgac 1440
gaacacctaa ccagacactt gcccaagcaa tggttaacat ctttagcaat tgaggaaagt 1500
aaccatgcta aagatacagt aactgtaatc gaagcaccac gccaatcaga tttgctgatt 1560
gagttgatca ggaaactgaa gccccagggt gttgttactg gcatggctca gtttgaggct 1620
atcaccagtg ctgctttcgt gaacttatta agtghtaacga aagatggttg tccccatta 1680
ttactagata tttcagaaca tctggaattg tctagtctgc caagctcaa tgggtgtattg 1740
aaatatcttg ctgggaagac cctgccttca catgcggcta tattgtgtgg cttagttaag 1800
aatcaggttt attctgatct ggaagtgtct tttgctatct ctgaagatcc aactgtttat 1860
aaggcattgt cacaaactat tgagctattg gaaggacata cttctgtgat cagccagcac 1920
tattatgggt gtcttttcca tgagctgctg gcatttcaaa ttggtgaccg gcatccacaa 1980
caagagagag aacctgcaga agtgatatct aaggagatga tagggttttc aagttcagct 2040
atgtccaccc tagaaggagc tgagtttttc gttcctgggt ccatggaatc cgggtgcata 2100

ES 2 586 616 T3

catatggatc tggaccgcag cttcttgcca gtaccttctg cagtaaacgc ctccatttc 2160
 gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaactg atgtccgttc cagcattcag 2220
 cagctgggtga aagatagcta tggttttctca gcaggcgggtg cttctgaaat tatatacggg 2280
 aacacctgtc tcgcgctctt caacaagctt gttctttgct gcatgcaaga acagggcacc 2340
 ttgcttttcc ccttggaac caacgggcat tatgtcaacg cagcaaagtt tgtgaatgca 2400
 accaccttga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta 2460
 gccgacacac tagagaaggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaatcaac 2520
 cctactggct tcctgtacag tgacgacgat atagcagagc tgctttctgt ctgtgcgaca 2580
 tacggagcca ggggtggat agatacctcc tcctctggtc tggagttcca agccaccggc 2640
 tgcagccagt ggaatttggga aagatgtctt tctaattgca agtcttcaaa gccctcgttc 2700
 tccgttgctc tgctcggaga gctgtccttt gagctgacca cggctgggct tgatttcggg 2760
 tttctgatta tgagcgactc gtccttggtt gacacatttt acagtttccc aagcttgagt 2820
 cggccacaca gcacgttgaa gtacactttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag 2880
 gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgccgac 2940
 cagttgatca agatgcttga gagctgcggc tgggacgctg tgggctgcca tggcggcatc 3000
 tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt agcaaatcgc tcaaggtgga cggctttgag 3060
 ggcaagctgg acagccacaa catgagggaa gccctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt 3120
 agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc 3180
 ggcgacttcg accgggccat ggagtgcac ccccggttca gggagctggt ccttggtgga 3240
 ggtgctaagg tgaatggtag caactag 3267

<210> 6
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Cebada, vc. Prestige

5

<400> 6

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30
 Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45
 Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60
 Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

ES 2 586 616 T3

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

ES 2 586 616 T3

Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
 645 650 655
 Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
 660 665 670
 Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
 675 680 685
 Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
 690 695 700
 Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
 705 710 715 720
 Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
 725 730 735
 Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
 755 760 765
 Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
 770 775 780
 Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
 805 810 815
 Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845
 Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880
 Cys ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895
 Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910

ES 2 586 616 T3

Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925

Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940

Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960

Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975

Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Thr Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990

Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr A
 995 1000 1005

Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020

Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035

Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050

Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065

Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080

Val Asn Gly Ser Asn
 1085

<210> 7
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Cebada, vc. Prestige

5

<400> 7
 Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys

ES 2 586 616 T3

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

ES 2 586 616 T3

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

ES 2 586 616 T3

Val Ala Phe Ala Ile Ser Glu Asp Pro Thr Val Tyr Lys Ala Leu Ser
 610 615 620
 Gln Thr Ile Glu Leu Leu Glu Gly His Thr Ser Val Ile Ser Gln His
 625 630 635 640
 Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
 645 650 655
 Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
 660 665 670
 Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
 675 680 685
 Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
 690 695 700
 Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
 705 710 715 720
 Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
 725 730 735
 Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
 755 760 765
 Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
 770 775 780
 Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
 805 810 815
 Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845
 Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880

ES 2 586 616 T3

Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895
 Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910
 Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940
 Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960 965
 Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975
 Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990
 Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005
 Tyr Ile Ser Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020
 Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035
 Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050
 Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065
 Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080
 Val Asn Gly Ser Asn
 1085

<210> 8
 <211> 6459
 <212> ADN
 <213> Cebada, mutante 8063

5

<400> 8

ES 2 586 616 T3

```
atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttggcgg cgtgccaggc gtcgggagac    60
gcggcgtacg gcgccgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgcgcc    120
gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcga cggcgcttcg ccgccggcgg cccggccgcg    180
gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccacg acgtcgtcct cgacccccac    240
```

ES 2 586 616 T3

ctccaagggt gcccgcccc ttccctacac acccgttgtc gaccgcac tctttcgccg 300
 atctggccgt caaaagcacg cggcttgga gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta 360
 tggctggcca gtcgatcagt aatttggcca taactggagt ataaccttgg tctctaactt 420
 ctacctgacc atataccgag ttggttttct ttcttcttgt ttccgtatct gtgtagtttt 480
 ttcttttctt tcgagcatga tgttcttga attaatgct accagactcc agtaattcga 540
 cattttgaat tttggcgagt gttcttggaa ttataacac aacgaggctt tgatcaagtg 600
 gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattctcta tttcccaaca 660
 attttgatgg cctctaagca tcctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agatttattc 720
 atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt 780
 tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag 840
 tggggcaagc atgctgcaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt 900
 tatctttttt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaacctt 960
 taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac 1020
 taaataggac atctgtccgc tatatcttta gtaataatt gtatatagac gcagtctttg 1080
 tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga 1140
 cttctttggt acgttttgtg tgcataaagc attaacttct gtctttagtt ggcgcagcgg 1200
 taaaaacacc cattgcttaa tattttatct gctttccgta gcttgataaa atttcaactg 1260
 cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt 1320
 ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattcaga ttccatcttc 1380
 agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca 1440
 gaaaagtggg gcccttcgaa ggttggcacc tcttgttccg tagatattta tcttatctcg 1500
 tttgttgcaa acatgggacc tgcagaagt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa 1560
 cttttagggt tctgccagta gtctgctggt ggtctaattt tcttggata cctgatgccg 1620
 tcgagcatat tgctttcaa ttttgggcaa ggcatocca ccacatattg tttctacaat 1680
 gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt 1740
 ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgcagtc agcttggcat taccttactt 1800
 gagccttggg tgttcttttg aaggtttatg gtctggatat aaaccaaga gctatcaaga 1860
 ttgatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tggctccca atctatgatg 1920
 cggaggggaa aacattgctt gacagagtcg aattctatga atctgatctt ctttcttact 1980
 gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttgttggatg cataccacag gtacggtcag 2040
 gtttttacca atttcctgtg aatggggatt atagtcgatc agaacttgat caaaatgccc 2100
 ttaatatctg cctttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact 2160
 gaaaattcaa gtgaggagt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccagggtgag 2220
 tgagatctat ttaaactcaa gccattcagt ttacctgta ctaaattgggt acccatgtca 2280

ES 2 586 616 T3

gagctccaa atcttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact ttttaagtct 2340
atcctgaaat tgactttaca atgcttggtc ataatctgct tacgaaatag gcgtttgaac 2400
atctctcttt tccttgtagg catgtggtca gacctttata taagaaaatg aagtttttgt 2460
agaaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct 2520
aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgtg taatatatat atgtcgatag 2580
ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia 2640
cctgtatgga caaatgtgat cagcacccca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata 2700
tggaattatt aacagcggta tttattttta cctgttttaa ttttttctt tgctaaaaga 2760
atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg 2820
gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc 2880
atcaggggtt ttgttgagga ccaatttggc ctcgggttga ttgctcgggc tgttgaagaa 2940
gggatatctg tgataaagcc tagtggctct atgggtattca acatgggagg ccggccagga 3000
caagggtgtct gtgagcgcct atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa 3060
acaaaaatta tgcagatagc aattctttga gtgactagat gttaactaat cccagtgttt 3120
ttccatgccg gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac 3180
caatcttcag ctgggcctag aattttcatc taccggctta catttttaca ttacagaacc 3240
aatttttgtt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat 3300
ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct 3360
tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg 3420
catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat 3480
actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg 3540
agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag 3600
ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaaattc ctttcttagc 3660
atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaactct tgtgagctc cagctggatg 3720
tttaaatttc cggatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tcccattaac 3780
tcctgatgta agacttggtg tctattgcct acaattatgt ttgcttatta gaaattcata 3840
agatcaacct attgatgct tctcacgtat gcttcagtgt acacttcctt ttctctggt 3900
gcaccagaat gttgttgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt 3960
gttctcacct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaac agacacttgc ccaagcaatg 4020
gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc cctctttct ttctgtgttt 4080
ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagtt atgctgacaa gaatttcgat 4140
gttattgcc a tcttctaaa tttcaggaaa gtaaccatgc taaagatata gtaactgtaa 4200
tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg 4260
ttgttgttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgctttc gtgaacttat 4320
taagtgtaac gaaagatgtt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat 4380

ES 2 586 616 T3

tgtctagtct gccaaagctca aatgggtgtat tgaaaatatct tgctgggaag accctgcctt 4440
 cacatgcggc tatattgtgt ggcttagtta agaatcagggt gtgtgtcaat cagcctgaac 4500
 tctagttgaa ctgtttgtgca tactatatag aatatcttga cttttatatg tacttttagaa 4560
 aactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatttta cttgcagggt tattctgatc 4620
 tggaagttgc ttttgctatc tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta 4680
 ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgtcttttcc 4740
 atgagctgct ggcatttcaa attgggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggcct 4800
 gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca 4860
 agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta 4920
 gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctgggtt atgtttttca 4980
 tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatata 5040
 aggagatgat agggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttcg 5100
 ttcttggttc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
 taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
 ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctgggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
 caggcgggtc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
 ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
 acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
 caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
 gggctctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
 tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gatacctect 5640
 cctctggctc ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttggaa agatgtcttt 5700
 ctaatgtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgcct gctcggagag ctgtcctttg 5760
 agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
 acacatttta cagtttcca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttea 5880
 ggaagctgtt gggctttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
 agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatc 6000
 ctgtgtttag gctctctgtt ttcttccccct gatcagctct ccgatccccct tacatcctta 6060
 ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattcttcc ctcttgtttt 6120
 attttctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
 catggcggca tctc gatgct tgcaaaaaccg accgcctaca ttggcaaadc gctcaagggtg 6240
 gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctctc gaggtccacc 6300
 gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccgg actactgccg cttcagcttt 6360
 gctctggaga gcggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccgggt caggagctg 6420

ES 2 586 616 T3

gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

<210> 9
 <211> 882
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. Prestige

5

<400> 9
 gtttatggtc tggatataaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cttttacttg 60
 aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgcgg aggggaaaac attgcttgac 120
 agagtccaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt 180
 gatcgcattg ttggatgcat accacagatt cttaacccca atccagaggc aatgtcaaag 240
 attgtaactg aaaattcaag tgaggagttc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc 300
 cagggttttg ttgaggacca atttggcctc gggttgattg ctcgggctgt tgaagaaggg 360
 atatctgtga taaagcctag tggctttatg gtattcaaca tgggaggccg gccaggacaa 420
 ggtgtctgtg agcgcctatt tcttcgccgt ggatttcgca tcaataagct ctggcaaaca 480
 aaaattatgc aggctgctga cacagacatc tccgctttag ttgaaattga gaaaaatagc 540
 cgacatcgct tcgagttctt tatggatctt gttggggatc agcctgtgtg tgcgcgcaca 600
 gcatgggcat acatgaaatc tgggtggccgc atttcacatg ctttgtctgt gtatagctgt 660
 caacttcgcc agcccaacca ggtgaagaaa atatctgagt tccttaaaga cggattccat 720
 gaagtcagca gctccctcga tttgtccttt gatgatgatt ctgttgctga tgaaaaaatt 780
 cctttcctag catacctagc tagtttcttg caagagaata agtctaatacc ttgtgagcct 840
 ccagctggat gtttaaattt ccggaatctt gttgctggat tt 882

10

<210> 10
 <211> 1089
 <212> ADN
 <213> Cebada, mutante 8063

15

<400> 10

ES 2 586 616 T3

gtttatggtc tggatataaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cctttacttg	60
aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgcgg aggggaaaac attgcttgac	120
agagtccaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt	180
gatcgcattg ttggatgcat accacagatt cttaacccca atccagaggc aatgtcaaag	240
attgtaactg aaaattcaag tgaggagttc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc	300
caggttttgt tgaggaccaa tttggcctcg ggttgattgc tcgggctggt gaagaagga	360
tatctgtgat aaagcctagt ggtcttatgg tattcaacat gggaggccgg ccaggacaag	420
gtgtctgtga gcgcctatct ctacgccgtg gatttcgcat caataagctc tggcaaacaa	480
aaattatgca gatagcaatt cttcgagtga ctagatgtta actaatccca gtgtttttcc	540
atgccagcaa cagcattgta tcctggttag aggaatatgc tcttcatggt gcacaccaat	600
cttcatctgg acctggaatt ttcattacc ggcttacatt ttacattac agaaccaatt	660
tttgttgagg atcattacca actagttggg tctttgcagg ctgctgacac agacatctcc	720
gctttagttg aaattgagaa aaatagccga catcgtctcg agttctttat ggatcttggt	780
ggggatcagc ctgtgtgtgc gcgcacagca tgggcataca tgaatctgg tggccgcatt	840
tcacatgctt tgtctgtgta tagctgtcaa cttcgccagc ccaaccaggt gaagaaaata	900
tttgagttcc ttaaagacgg attccatgaa gtcagcagct ccctcgattt gtcctttgat	960
gatgattctg ttgctgatga aaaaattcct ttcttagcat acctagctag tttcttgcaa	1020
gagaataagt ctaatccttg tgagcctcca gctggatggt taaatttccg gaatcttggt	1080
gctggattt	1089

<210> 11
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Cebada, mutante 8063

 <400> 11

5

ES 2 586 616 T3

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
145 150 155 160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
165 170 175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
180 185 190

ES 2 586 616 T3

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
 195 200 205
 Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
 210 215 220
 Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
 245 250 255
 Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
 260 265 270
 Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
 275 280 285
 Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
 290 295 300
 Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ile Ala Ile Leu
 305 310 315

5

- <210> 12
- <211> 955
- <212> ADN
- <213> Cebada, mutante 8063
- <400> 12

ES 2 586 616 T3

gtttatggtc tggatataaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cctttacttg	60
aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgcgg aggggaaaac attgcttgac	120
agagtcgaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt	180
gatcgcattg ttggatgcat accacagatt cttaacccca atccagaggc aatgtcaaag	240
attgtaactg aaaattcaag tgaggagttc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc	300
caggttttgt tgaggaccaa tttggcctcg ggttgattgc tcgggctggt gaagaagggga	360
tatctgtgat aaagcctagt ggtcttatgg tattcaacat gggaggccgg ccaggacaag	420
gtgtctgtga gcgcctatct ctacgccgtg gatttcgcat caataagctc tggcaaacaa	480
aaattatgca gatagcaatt cttcgagtga ctagatgtta actaatccca gtgtttttcc	540
atgccagcaa cagcattgta tcctggctgc tgacacagac atctccgctt tagttgaaat	600
tgagaaaaat agccgacatc gcttcgagtt ctttatggat cttggtgggg atcagcctgt	660
gtgtgcgcgc acagcatggg catacatgaa atctggtggc cgcatttcac atgctttgtc	720
tgtgtatagc tgtcaacttc gccagcccaa ccaggatgaag aaaatatttg agttccttaa	780
agacggattc catgaagtca gcagctccct cgatttgctc tttgatgatg attctgttgc	840
tgatgaaaaa attcctttcc tagcatacct agctagtttc ttgcaagaga ataagtctaa	900
 tccttgtgag cctccagctg gatgtttaaa tttccggaat cttggtgctg gattt	 955

5

- <210> 13
- <211> 315
- <212> PRT
- <213> Cebada, mutante 8063

- <400> 13

ES 2 586 616 T3

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
145 150 155 160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
165 170 175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
180 185 190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
195 200 205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
210 215 220

Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
225 230 235 240

ES 2 586 616 T3

Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
 245 250 255
 Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
 260 265 270
 Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
 275 280 285
 Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
 290 295 300
 Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ile Ala Ile Leu
 305 310 315

5 <210> 14
 <211> 810
 <212> ADN
 <213> Cebada, mutante 8063

<400> 14
 gtttatggtc tggatataaa cccaagagct atcaagattg catggataaa cctttacttg 60
 aatgcactag acgacgatgg tctcccaatc tatgatgctgg aggggaaaac attgcttgac 120
 agagtcgaat tctatgaatc tgatcttctt tcttactgta gagataacaa gatagaactt 180
 gatcgcattg ttggatgcat accacagatt cttaacccca atccagaggc aatgtcaaag 240
 attgtaactg aaaattcaag tgaggagttc ttgtactcct tgagcaacta ctgtgctctc 300
 caggttttgt tgaggaccaa tttggcctcg ggttgattgc tcgggctggt gaagaagggg 360
 tatctgtgat aaagcctagt ggtcttatgg tattcaacat gggaggcccg ccaggacaag 420
 gctgctgaca cagacatctc cgctttagtt gaaattgaga aaaatagccg acatcgcttc 480
 gagttcttta tggatcttgt tggggatcag cctgtgtgtg cgcgcacagc atgggcatac 540
 atgaaatctg gtggccgcat ttcacatgct ttgtctgtgt atagctgtca acttcgccag 600
 cccaaccagg tgaagaaaat atttgagttc cttaaagacg gattccatga agtcagcagc 660
 tccctcgatt tgcctttga tgatgattct gttgctgatg aaaaaattcc tttcctagca 720
 tacctagcta gtttcttgca agagaataag tctaatacct gtgagcctcc agctggatgt 780
 ttaaatttcc ggaatcttgt tgctggattt 810

10 <210> 15
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Cebada, mutante 8063

15 <400> 15
 Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg

ES 2 586 616 T3

<210> 16
 <211> 6459
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. sebastian

5

<400> 16
 atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttggcgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
 gcggcgtagc gcgccgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgcgcc 120
 gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcga cggcgcttcg ccgccggcgg cccggcccg 180
 gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccacg acgtcgtcct cgacccccac 240
 ctccaagggt gcccgcccc ttccctacac acccgttgtc gaccgcgcatc tctttcgccg 300
 atctggccgt caaaagcac cggcttggtg gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta 360
 tggctggcca gtcgatcagt aatttggcca taactggagt ataaccttgg tctctaattct 420
 ctacctgacc atataccgag ttggttttct ttcttcttgt ttccgtatct gtgtagtttt 480
 ttcttttctt tcgagcatga tgttctttga attaattcgt accagactcc agtaattcga 540
 cattttgaat tttggcggagt gttcttggaa ttataaacac aacgaggctt tgatcaagtg 600
 gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattctcta tttcccaaca 660
 attttgatgg cctctaagca tcctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agatttattc 720
 atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt 780
 tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag 840
 tggggcaagc atgctgcaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt 900
 tatctttttt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaaccta 960
 taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac 1020
 taaataggac atctgtccgc tatatcttta gtttaataatt gtatatagac gcagtctttg 1080
 tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga 1140
 cttctttgtt acgttttgtg tgcataaagc attaacttct gtcttttagt ggcgcgagcgg 1200
 taaaaacacc cattgcttaa tattttattt gctttccgta gcttgataaa atttcaactg 1260
 cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt 1320
 ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattccaga ttccatcttc 1380
 aggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt ggatatccat tgcaattgca 1440
 gaaaagtggg gcccttcgaa ggttggcacc tcttgttccg tagatattta tcttatctcg 1500
 tttgttgcaa acatgggacc tgcagaagtt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa 1560
 cttttagggt tctgccagta gtctgctggg ggtctaattt tcttgggata cctgatgccg 1620
 tcgagcatat tgctttcaaa ttttgggcaa ggcattacca ccacatattg tttctacaat 1680
 gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt 1740
 ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgcagtc agcttggcat taccttactt 1800
 gagccttggg tgttcttttg aaggtttatg gtctggatat aaaccaaga gctatcaaga 1860

ES 2 586 616 T3

ttgcatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tggctctccca atctatgatg 1920
 cggaggggaa aacattgctt gacagagtcg aattctatga atctgatcct ctttcttact 1980
 gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttgttgatg cataccacag gtacggtcag 2040
 gtttttacca atttcctgtg aatggggatt atagtcgatc agaacttgat caaaatgccc 2100
 ttaatatctg cttttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact 2160
 gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccaggtgagt 2220
 tgagatctat ttaaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaatgggt acccatgtca 2280
 gagtctccaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact ttaagtctct 2340
 atcctgaaat tgactttaca atgcttgctc ataactctgct tacgaaatat gcgtttgaac 2400
 atttctctt tccttgtagg catgtggctc gacctttata taagaaaatg aagttttgt 2460
 agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct 2520
 aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgt taatatatat atgtcगतग 2580
 ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia 2640
 cctgtatgga caaatgtgat cagcaccoca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata 2700
 tggaaattatt aacagcggta tttattttta ccctgtttaa tttttcctt tgctaaaaga 2760
 atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg 2820
 gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc 2880
 attcaggggt ttgttgagga ccaatttggc ctccgggtga ttgctcgggc tgttgaagaa 2940
 gggatatctg tgataaagcc tagtggctct atggatttca acatggggagg ccggccagga 3000
 caaggtgtct gtgagcgcct atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa 3060
 acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttaactaat ccagtggtt 3120
 ttccatgcca gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac 3180
 caatcttcag ctgggcctag aattttcatc taccggctta catttttaca ttacagaacc 3240
 aatttttgtt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat 3300
 ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct 3360
 tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg 3420
 catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat 3480
 actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg 3540
 agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag 3600
 ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaaatc ctttcttagc 3660
 atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaactct tgtgagcctc cagctggatg 3720
 tttaaattc cggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tccattaac 3780
 tcctgatgta agacttgggtg tctattgctt acaattatgt ttgcttatta gaaattcata 3840
 agatcaacct atttgatgct tctcacgtat gcttcatgtg acacttcctt ttcctctggt 3900

ES 2 586 616 T3

gcaccagaat gttgttgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt 3960
gttctcacct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaacc agacacttgc ccaagcaatg 4020
gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc ccctctttct ttctgtgttt 4080
ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagtt atgctgacaa gaatttcgat 4140
gttattgcca ttcttctaaa tttcaggaaa gtaacatgc taaagataca gtaactgtaa 4200
tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg 4260
ttgttgttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgctttc gtgaacttat 4320
taagtgtaac gaaagatggt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat 4380
tgtctagtct gccaaagctca aatgggtgat tgaaatatct tgctgggaag accctgcctt 4440
cacatgcggc tatatttgtg ggcttagtta agaatcagggt gtgtgtcaat cagcctgaac 4500
tctagttgaa ctgttgtgca tactatatag aatatcttga cttttatatg tactttagaa 4560
acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatittta cttgcagggt tattctgac 4620
tggaagttgc ttttgctatc tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta 4680
ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgtcttttcc 4740
atgagctgct ggcatttcaa attgggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggctt 4800
gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca 4860
agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta 4920
gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca 4980
tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatata 5040
aggagatgat agggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttcg 5100
ttcctggttc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
ctgaaaccga tgctccgttc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
caggcggcgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgctttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggt tctcagccgt 5520
gggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gatacctct 5640
cctctggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttgaa agatgtcttt 5700
ctaatgtcaa gtcttcaaag cctctgttct ccgttgcct gctcggagag ctgtcctttg 5760
agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
ggaagctggt gggctttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatc 6000

ES 2 586 616 T3

ctgtgttttag gctctctggt ttcttccccct gatcagctct cccatccccct tacatcctta 6060
 ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgtttt 6120
 attttcctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgag gctgggacgc tgtgggctgc 6180
 catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaadc gctcaagggtg 6240
 gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
 gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccgg actactgccg cttcagcttt 6360
 gctctggaga gcggcgactt cgaccgggccc atggagtgca tcgccccggtt cagggagctg 6420
 gtccttggtg gcgggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

<210> 17
 <211> 3267
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. sebastian

5

<400> 17
 atggctgagg cggcggggga cgtggaggcg ttcctggcgg cgtgccaggc gtcgggagac 60
 gcggcgtacg gcgccccaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgcgcc 120
 gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcca cggcgcttcg ccgccggcgg cccggcccg 180
 gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccag acgtcgtcct cgacccccac 240
 ctccaaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt 300
 ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcatccaga ttccatcttc 360
 agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt ggatatccat tgcacttgca 420
 gaaaagtggg gcccttcgaa ggtttatggt ctggatataa acccaagagc tatcaagatt 480
 gcatggataa acctttactt gaatgcacta gacgacgatg gtctcccaat ctatgatgag 540
 gaggggaaaa cattgcttga cagagtcgaa ttctatgaat ctgatcttct ttcttactgt 600
 agagataaca agatagaact tgatcgatt gttggatgca taccacagat tcttaacccc 660
 aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc 720
 ttgagcaact actgtgctct ccagggtttt gttgaggacc aatttggcct cgggttgatt 780
 gctcgggctg ttgaagaagg gatattctgt ataaagccta gtggtcttat ggtattcaac 840
 atgggaggcc ggccaggaca aggtgtctgt gagcgcctat ttctacgccg tggatttcgc 900
 atcaataagc tctggcaaac aaaaattatg caggctgctg acacagacat ctccgcttta 960
 gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct tgttggggat 1020
 cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg catttcacat 1080
 gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtgaagaa aatatttgag 1140
 ttcttaaaag acggattcca tgaagtcagc agctccctcg atttgcctt tgatgatgat 1200
 tctgttgctg atgaaaaaat tcctttccta gcatacctag ctagtcttct gcaagagaat 1260
 aagtctaadc cttgtgagcc tccagctgga tgtttaaatt tccggaatct tgttgctgga 1320
 tttatgaaga gttaccacca catcccatta actcctgata atggtgtgtg gttcccatcc 1380

ES 2 586 616 T3

cgtgctggtg caatcgaaaa tgctcttcgg ttgttctcac ctggacttgc aattggtgac 1440
 gaacacctaa ccagacactt gcccaagcaa tggttaacat ctttagcaat tgaggaaagt 1500
 aaccatgcta aagatacagt aactgtaatc gaagcaccac gccaatcaga tttgctgatt 1560
 gagttgatca ggaaactgaa gcctcagggtt gttgttactg gcatggctca gtttgaggct 1620
 atcaccagtg ctgctttcgt gaacttatta agtgtaacga aagatggttg tttccgatta 1680
 ttactagata tttcagaaca tctggaattg tctagtctgc caagctcaaa tgggtgattg 1740
 aaatatcttg ctgggaagac cctgccttca catgcggcta tattgtgtgg cttagttaag 1800
 aatcaggttt attctgatct ggaagttgct tttgctatct ctgaagatcc aactgtttat 1860
 aaggcattgt cacaaactat tgagctattg gaaggacata cttctgtgat cagccagcac 1920
 tattatggtt gtcttttcca tgagctgctg gcatttcaaa ttggtgaccg gcatccacaa 1980
 caagagagag aacctgcaga agtgatatct aaggagatga tagggttttc aagttcagct 2040
 atgtccacc tagaaggagc tgagtttttc gttcctgggtt ccatggaatc cggtgtcata 2100
 catatggatc tggaccgcag cttcttgcca gtaccttctg cagtaaaccg ctccattttc 2160
 gaaagttttg ttcgtcagaa catcactgat tctgaaaccg atgtccgttc cagcattcag 2220
 cagctggtga aagatagcta tggtttctca gcaggcgggtg cttctgaaat tatatacggg 2280
 aacacctgtc tcgctctctt caacaagctt gttctttgct gcatgcaaga acagggcacc 2340
 ttgcttttcc ccttgggaac caacgggcat tacgtcaacg cagcaaagt tgtgaatgca 2400
 accacctga ctattccaac gaaggcagat tcaggcttca agatcgaacc aagtgtctta 2460
 gccgacacac tagagaaggt gtctcagccg tgggtctata tttctggccc cacaatcaac 2520
 cctactggct tctgtacag tgacgacgat atagcagagc tgctttctgt ctgtgcgaca 2580
 tacggagcca ggggtggtgat agatacctcc tctctgggtc tggagttcca agccaccggc 2640
 tgcagccagt ggaatttggg aagatgtctt tctaattgca agtcttcaaa gccctcgttc 2700
 tccgttgctc tgctcggaga gctgtcctt gagctgacca cggctgggct tgatttcggg 2760
 tttctgatta tgagcgactc gtccttgggt gacacatttt acagtttccc aagcttgagt 2820
 cggccacaca gcacgttgaa gtacacgttc aggaagctgt tgggtcttaa gaaccagaag 2880
 gatcagcatt tctctgatct catccttgag cagaaggaga cgttgaagaa tcgtgccgac 2940
 cagttgatca agacgcttga gagctgcggc tgggacgctg tgggctgcca tggcggcatc 3000
 tcgatgcttg caaaaccgac cgcctacatt ggcaaaccgc tcaagggtgga cggttttgag 3060
 ggcaagctgg acagccacaa catgagggaa gccctcctga ggtccaccgg gctgtgcatt 3120
 agcagcagcg ggtggacagg ggtgccggac tactgccgct tcagctttgc tctggagagc 3180
 ggcgacttcg accgggccat ggagtgcac gccccggttca gggagctggt ccttgggtggc 3240
 ggtgctaagg tgaatggtag caactag 3267

<210> 18
 <211> 1088
 <212> PRT

ES 2 586 616 T3

<213> Cebada, vc. sebastian

<400> 18

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

ES 2 586 616 T3

Ala Phe Val Asn Leu Leu Ser Val Thr Lys Asp Val Gly Ser Arg Leu
545 550 555 560

Leu Leu Asp Ile Ser Glu His Leu Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ser Ser
565 570 575

Asn Gly Val Leu Lys Tyr Leu Ala Gly Lys Thr Leu Pro Ser His Ala
580 585 590

Ala Ile Leu Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp Leu Glu
595 600 605

Val Ala Phe Ala Ile Ser Glu Asp Pro Thr Val Tyr Lys Ala Leu Ser
610 615 620

Gln Thr Ile Glu Leu Leu Glu Gly His Thr Ser Val Ile Ser Gln His
625 630 635 640

Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
645 650 655

Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
660 665 670

Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
675 680 685

Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
690 695 700

Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
705 710 715 720

Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
725 730 735

Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
740 745 750

Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
755 760 765

Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
770 775 780

Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
785 790 795 800

Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
805 810 815

ES 2 586 616 T3

Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830

Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845

Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860

Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880

Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895

Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910

Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925

Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940

Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960

Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975

Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990

Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005

Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu
 1010 1015 1020

Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu
 1025 1030 1035

Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg
 1040 1045 1050

Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu
 1055 1060 1065

Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys
 1070 1075 1080

Val Asn Gly Ser Asn
 1085

ES 2 586 616 T3

<210> 19
 <211> 6459
 <212> ADN
 <213> Cebada, mutante 14018

5

<400> 19

```

atggctgagg cggcggggga cgtggaggcg ttcctggcgg cgtgccaggc gtcgggagac    60
gcggcgtagc gcgccgcaaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cacgcgcgcc    120
gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcca cggcgcttcg ccgccggcgg cccggccgcg    180
gggctcgagt gcttccgcac cttccacttc cgcattccag acgtcgtcct cgacccccac    240
ctccaagggt gcccgcccc ttcctacac acccgttgtc gacccgcatt tctttcgccg    300
atctggccgt caaaagcacg cggcttggtg gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta    360
tggctggcca gtcgatcagt aatttgcca taactggagt ataacttg tctctaattc    420
ctacctgacc atataccgag ttggttttct ttcttcttgt ttccgtattt gtgtagtttt    480
ttcttttctt tcgagcatga tgttctttga attaatgctg accagactcc agtaattcga    540
cattttgaat tttggcgagt gttcttgtaa ttataaacac aacgaggctt tgatcaagtg    600
gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattcteta tttcccaaca    660
attttgatgg cctctaagca tcctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agatttattc    720
atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt    780
tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag    840
tggggcaagc atgctgcaaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt    900
tatctttttt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaacctt    960
taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac   1020
taaataggac atctgtccgc tataatctta gtaataaatt gtatatagac gcagtctttg   1080
tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga   1140
cttctttgtt acgtttttgt tgcataaagc attaacttct gtcttttagtt ggcgcagcgg   1200
taaaaacacc cattgcttaa tattttattt gctttccgta gcttgataaa atttcaactg   1260
cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agataccag cattttcatt   1320
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattcaga ttccatcttc   1380
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca   1440
gaaaagtggg gcccttcgaa gattggcacc tcttgttccg tagatattta tcttatctcg   1500
tttgttgcaa acatgggacc tgcagaagtt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa   1560
cttttaggtg tctgccagta gtctgctggt ggtctaattt tcttggtata cctgatgccg   1620
tcgagcatat tgctttcaaa ttttgggcaa ggcattacca ccacatattg tttctacaat   1680
gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt   1740
ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgcagtc agcttggcat taccttactt   1800
    
```

ES 2 586 616 T3

gagccttggg tgttcttttg aaggtttatg gtctggatat aaacccaaga gctatcaaga 1860
ttgcatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tggctctcca atctatgatg 1920
cggaggggaa aacattgctt gacagagtcg aattctatga atctgatctt ctttcttact 1980
gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttgttggatg cataccacag gtacggtcag 2040
gtttttacca atttcctgtg aatggggatt atagtcgatc agaacttgat caaaatgccc 2100
ttaatatctg cttttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgttaact 2160
gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccagggtgagt 2220
tgagatctat ttaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaatgggt acccatgtca 2280
gagtctcaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact tftaagtctt 2340
atcctgaaat tgactttaca atgcttgttc ataatctgct tacgaaatat gcgtttgaac 2400
atctctcttt tccttgttag catgtggcca gacctttata taagaaaatg aagtttttgt 2460
agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct 2520
aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgta taatatatat atgtcgatag 2580
ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia 2640
cctgtatgga caaatgtgat cagcacccca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata 2700
tgggaattatt aacagcggta tttattttta ccctgtttaa ttttttcctt tgctaaaaga 2760
atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg 2820
gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc 2880
attcaggggt ttgttgagga ccaatttggc ctccgggtga ttgctcgggc tgttgaagaa 2940
gggatatctg tgataaagcc tagtggctct atggatttca acatgggagg ccggccagga 3000
caagggtgct gtgagcgctt atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa 3060
acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttactaat cccagtgttt 3120
ttccatgcca gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac 3180
caatcttcag ctgggcctag aattttcatt taccggctta catttttaca ttacagaacc 3240
aatttttgtt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat 3300
ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct 3360
tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctgggtggccg 3420
catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat 3480
actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg 3540
agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag 3600
ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaaattc ctttcttagc 3660
atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaactct tgtgagcctc cagctggatg 3720
tttaaatttc cggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tcccattaac 3780
tcctgatgta agacttgggt tctattgcct acaattatgt ttgcttatta gaaattcata 3840

ES 2 586 616 T3

agatcaacct atttgatgct tctcacgat gcttcatgtg acacttcctt ttcctctggt 3900
 gcaccagaat gttggtgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt 3960
 gttctcacct ggacttgcaa ttggtgacga acacctaacc agacacttgc ccaagcaatg 4020
 gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc ccctctttct ttctgtgttt 4080
 ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagtt atgctgacaa gaatttcgat 4140
 gttattgcca ttcttctaaa tttcaggaaa gtaaccatgc taaagataca gtaactgtaa 4200
 tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg 4260
 ttggtgttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgctttc gtgaacttat 4320
 taagtgtaac gaaagatggt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat 4380
 tgtctagtct gccaaactca aatgggtgat tgaatatct tgctgggaag accctgcctt 4440
 cacatgccc tatatttgtt ggcttagtta agaatcaggt gtgtgtcaat cagcctgaac 4500
 tctagttgaa ctgttggtgca tactatatag aatatcttga cttttatag tactttagaa 4560
 acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatttta cttgcagggt tattctgatc 4620
 tggaaagtgc ttttgctatc tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta 4680
 ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgccttttcc 4740
 atgagctgct ggcatttcaa attggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggctt 4800
 gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca 4860
 agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttcctctta 4920
 gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tctcaacgt ggtctggttt atgtttttca 4980
 tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatatcta 5040
 aggagatgat agggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttccg 5100
 ttctggttc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
 taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
 ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctgggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
 caggcgggtc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
 ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
 acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
 caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
 gggctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
 tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtgggtgata gatacctcct 5640
 cctctggctt ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttggaag agatgtcttt 5700
 ctaatgtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgctct gctcggagag ctgtcctttg 5760
 agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tcttggttg 5820
 acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
 ggaagctggt gggctttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940

ES 2 586 616 T3

agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatc 6000
 ctgtgttttag gctctctgtt ttcttcccct gatcagctct ccgatcccct tacatcctta 6060
 ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgtttt 6120
 attttctctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
 catggcggca tctcgaatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaadc gctcaagggtg 6240
 gacggccttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
 gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccg actactgccg ctccagcttt 6360
 gctctggaga gcgccgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccgggt cagggagctg 6420
 gtccttgggt gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

<210> 20
 <211> 688
 <212> ADN
 <213> Cebada, vc. sebastian

5

<400> 20
 aggattccag caaagaaaga agctaacaat gatggagata cccagcattt tcattccaga 60
 agactgggtca ttcactttct acgagggctc caaccggcat ccagattcca tcttcagggga 120
 taagacagta gcagagctgg gatgtggcaa tggttggata tccattgcac ttgcagaaaa 180
 gtggtgccct tcgaaggttt atggtctgga tataaaccca agagctatca agattgcatg 240
 gataaacctt tacttgaatg cactagacga cgatggctc ccaatctatg atgcggaggg 300
 gaaaacattg cttgacagag tcgaattcta tgaatctgat cttctttctt actgtagaga 360
 taacaagata gaacttgatc gcattggttg atgcatacca cagattctta accccaatcc 420
 agaggcaatg tcaaagattg taactgaaaa ttcaagtgag gagttcttgt actccttgag 480
 caactactgt gctctccagg gttttgttga ggaccaattt ggccctcgggt tgattgctcg 540
 ggctgttgaa gaagggatat ctgtgataaa gcctagtggc cttatgggat tcaacatggg 600
 aggccggcca ggacaagggt tctgtgagcg cctatttctt cgccgtggat ttcgcatcaa 660
 taagctctgg caaacaaaaa ttatgcag 688

10

<210> 21
 <211> 1050
 <212> ADN
 <213> Cebada, mutante 14018

15

<400> 21
 aggattccag caaagaaaga agctaacaat gatggagata cccagcattt tcattccaga 60
 agactgggtca ttcactttct acgagggctc caaccggcat ccagattcca tcttcagggga 120
 taagacagta gcagagctgg gatgtggcaa tggttggata tccattgcac ttgcagaaaa 180
 gtggtgccct tcgaagattg gcacctcttg ttccgtagat atttatctta tctcgtttgt 240
 tgcaaacatg ggacctgcag aagttagaca ttactcagg ttactttata tgaaactttt 300
 aggtgtctgc cagtagtctg ctggtggtct aattttcttg gtatacctga tgccgtcgag 360

ES 2 586 616 T3

catattgctt tcaaattttg ggcaaggcat taccaccaca tattgtttct' acaatgctga	420
acaattgctc tcctttgaaa ggaagaaaaa caagaatgac atgcacctta gtagttaag	480
ccacaaatac cagcgaatca aattagtttg cagtcagctt ggcattacct tacttgagcc	540
ttggttgttc ttttgaagggt ttatggctctg gatataaacc caagagctat caagattgca	600
tggataaacc tttacttgaa tgcactagac gacgatggtc tcccaatcta tgatgaggag	660
gggaaaacat tgcttgacag agtcgaattc tatgaatctg atcttctttc ttactgtaga	720
gataacaaga tagaacttga tcgcattggt ggatgcatac cacagattct taacccaat	780
ccagaggcaa tgtcaaagat tgtaactgaa aattcaagtg aggagttctt gtactccttg	840
agcaactact gtgctctcca gggttttggt gaggaccaat ttggcctcgg gttgattgct	900
cgggctgttg aagaagggat atctgtgata aagcctagtg gtcttatggt attcaacatg	960
ggaggccggc caggacaagg tgtctgtgag cgcctatttc ttgcctgtgg atttcgcatc	1020
aataagctct ggcaaacaaa aattatgcag	1050

<210> 22
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Cebada, mutante 14018

5

<400> 22

ES 2 586 616 T3

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

- <210> 23
- <211> 771
- 5 <212> ADN
- <213> Cebada, mutante 14018
- <400> 23

ES 2 586 616 T3

```

aggattccag caaagaaaga agctaacaat gatggagata cccagcattt tcattccaga      60
agactgggtca ttcactttct acgaggggtct caaccggcat ccagattcca tcttcagggg      120
taagacagta gcagagctgg gatgtggcaa tggttggata tccattgcac ttgcagaaaa      180
gtgggtgccct tcgaagattg gcacctcttg ttccgtagat atttatctta tctcgtttgt      240
tgcaaacatg ggacctgcag aagttagaca tttactcagg tttatggctt ggatataaac      300
ccaagagcta tcaagattgc atggataaac ctttacttga atgcactaga cgacgatgg      360
ctcccaatct atgatgcgga ggggaaaaca ttgcttgaca gagtcgaatt ctatgaatct      420
gatcttcttt cttactgtag agataacaag atagaacttg atcgcattgt tggatgcata      480
ccacagattc ttaaccccaa tccagaggca atgtcaaaga ttgtaactga aaattcaagt      540
gaggagtctt tgtactcctt gagcaactac tgtgctctcc agggttttgt tgaggaccaa      600
tttggcctcg ggttgattgc tcgggctggt gaagaagga tatctgtgat aaagcctagt      660
ggtcttatgg tattcaacat gggaggccgg ccaggacaag gtgtctgtga gcgcctatct      720
cttcgccgtg gatttcgcat caataagctc tggcaaacaa aaattatgca g              771

```

<210> 24
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Cebada, mutante 14018

5

<400> 24

```

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1                    5                    10                    15
Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
                20                    25                    30
Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
                35                    40                    45
Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50                    55                    60
Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65                    70                    75                    80

```


ES 2 586 616 T3

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
 35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
 85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
 100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Leu Trp Ser Gly Tyr Lys Pro Lys Ser Tyr Gln
 130 135 140

Asp Cys Met Asp Lys Pro Leu Leu Glu Cys Thr Arg Arg Arg Trp Ser
 145 150 155 160

Pro Asn Leu

<210> 27
 <211> 781
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Fragmento de SacII BamHI del Producto 2

10

<400> 27

ES 2 586 616 T3

```

ggccgcgggg ctcgagtgct tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga      60
ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat      120
tttcattcca gaagactggt cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc      180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatggttgga tatccattgc      240
acttgcagaa aagtggtgcc cttcgaaggt ttatggctcg gatataaacc caagagctat      300
caagattgca tggataaacc ttacttgaa tgcactagac gacgatggtc tcccaatcta      360
tgatgcggag gggaaaacat tgcttgacag agtcgaattc tatgaatctg atcttctttc      420
ttactgtaga gataacaaga tagaacttga tcgcattggt ggatgcatac cacagattct      480
taaccccaat ccagaggcaa tgtcaaagat tgtaactgaa aattcaagtg aggagttctt      540
gtactccttg agcaactact gtgctctcca gggttttggt gaggaccaat ttggcctcgg      600
gttgattgct cgggctggtg aagaagggat atctgtgata aagcctagtg gtcttatggt      660
attcaacatg ggaggccggc caggacaagg tgtctgtgag cgcctatttc tacgccgtgg      720
atctcgcatac aataagctct ggcaaacaaa aattatgcag atagcaattc tttgaggatc      780
c                                                                                   781

```

5 <210> 28
 <211> 781
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de SacII BamHI del Producto 3

```

<400> 28
ggccgcgggg ctcgagtgct tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga      60
ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat      120
tttcattcca gaagactggt cattcacttt ctacgagggt ctcaaccggc atccagattc      180
catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatggttgga tatccattgc      240
acttgcagaa aagtggtgcc cttcgaaggt ttatggctcg gatataaacc caagagctat      300
caagattgca tggataaacc ttacttgaa tgcactagac gacgatggtc tcccaatcta      360
tgatgcggag gggaaaacat tgcttgacag agtcgaattc tatgaatctg atcttctttc      420
ttactgtaga gataacaaga tagaacttga tcgcattggt ggatgcatac cacagattct      480
taaccccaat ccagaggcaa tgtcaaagat tgtaactgaa aattcaagtg aggagttctt      540
gtactccttg agcaactact gtgctctcca gggttttggt gaggaccaat ttggcctcgg      600
gttgattgct cgggctggtg aagaagggat atctgtgata aagcctagtg gtcttatggt      660
attcaacatg ggaggccggc caggacaagg tgtctgtgag cgcctatttc tacgccgtgg      720
atctcgcatac aataagctct ggcaaacaaa aattatgcag atagcaattc tttgaggatc      780
c                                                                                   781

```

15 <210> 29
 <211> 703
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>

ES 2 586 616 T3

<223> Fragmento de SacII BamHII del Producto 4

<400> 29

ggccgcgggg	ctcgagtgct	tccgcacctt	ccacttccgc	atccacgacg	tcgtcctcga	60	
ccccacctc	caaggattcc	agcaaagaaa	gaagctaaca	atgatggaga	taccagcat	120	
tttcattcca	gaagactggg	cattcacttt	ctacgagggt	ctcaaccggc	atccagattc	180	
catcttcagg	gataagacag	tagcagagct	gggatgtggc	aatggttggg	tatccattgc	240	
acttgcagaa	aagtgggtgcc	cttcgaaggt	ttatgggtctg	gatataaacc	caagagctat	300	
caagattgca	tggataaacc	tttacttgaa	tgcactagac	gacgatggtc	tcccaatcta	360	
5	tgatgcggag	gggaaaacat	tgcttgacag	agtcgaattc	tatgaatctg	atcttctttc	420
ttactgtaga	gataacaaga	tagaacttga	tcgcattggt	ggatgcatac	cacagattct	480	
taacccaat	ccagaggcaa	tgtcaaagat	tgtaactgaa	aattcaagtg	aggagtcttt	540	
gtactccttg	agcaactact	gtgctctcca	gggttttggt	gaggaccaat	ttggcctcgg	600	
gttgattgct	cgggctggtg	aagaagggat	atctgtgata	aagcctagtg	gtcttatggt	660	
attcaacatg	ggaggccggc	caggacaagg	ctgctaagga	tcc		703	

<210> 30

<211> 394

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de SacII BamHII del Producto 6

<400> 30

ggccgcgggg	ctcgagtgct	tccgcacctt	ccacttccgc	atccacgacg	tcgtcctcga	60
ccccacctc	caaggattcc	agcaaagaaa	gaagctaaca	atgatggaga	taccagcat	120
tttcattcca	gaagactggg	cattcacttt	ctacgagggt	ctcaaccggc	atccagattc	180
catcttcagg	gataagacag	tagcagagct	gggatgtggc	aatggttggg	tatccattgc	240
acttgcagaa	aagtgggtgcc	cttcgaagat	tggcacctct	tgttccgtag	atatttatct	300
tatctcgttt	gttgcaaaca	tgggacctgc	agaagttaga	catttactca	ggttacttta	360
tatgaaactt	ttaggtgtct	gccagtaggg	atcc			394

<210> 31

<211> 376

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de SacII BamHII del Producto 7

<400> 31

ES 2 586 616 T3

	ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga	60
	ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat	120
	tttcattcca gaagactggt cattcacttt ctacgagggg ctcaaccggc atccagattc	180
	catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatggttgga tatccattgc	240
	acttgcagaa aagtgggtgcc cttcgaagat tggcacctct tgttccgtag atatttatct	300
	tatctcgttt gttgcaaaca tgggacctgc agaagttaga catttactca ggtttatggg	360
	ctggatataa ggatcc	376
5	<210> 32 <211> 325 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Fragmento de SacII BamHI del Producto 8	
	<400> 32	
	ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcacctt ccacttccgc atccacgacg tcgtcctcga	60
	ccccacctc caaggattcc agcaaagaaa gaagctaaca atgatggaga taccagcat	120
	tttcattcca gaagactggt cattcacttt ctacgagggg ctcaaccggc atccagattc	180
	catcttcagg gataagacag tagcagagct gggatgtggc aatggtttat ggtctggata	240
	taaaccaag agctatcaag attgcatgga taaaccttta ctggaatgca ctagacgacg	300
	atggtctccc aatctataag gatcc	325
15	<210> 33 <211> 271 <212> ADN <213> Cebada, vc. Prestige	
	<400> 33	
	cgattccagc ttccggttgt taattttggt atgtttgtga actttgctgc attcagggtt	60
	ttgttgagga ccaatttggc ctccgggttga ttgctcgggc tgttgaagaa gggatatctg	120
	tgataaagcc tagtggctct atggtattca acatgggagg ccggccagga caaggtgtct	180
	gtgagcgcct atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa acaaaaatta	240
20	tgcaggtagc aattctttga gtgactagat g	271
25	<210> 34 <211> 271 <212> ADN <213> Cebada, mutante 8063	
	<400> 34	

ES 2 586 616 T3

	cgattccagc ttccggttgt taattttggt atgtttgtga actttgctgc attcagggtt	60
	ttggtgagga ccaatttggc ctccgggttga ttgctcgggc tgttgaagaa gggatatctg	120
	tgataaagcc tagtggctct atggtattca acatgggagg ccggccagga caaggtgtct	180
	gtgagcgcct atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa acaaaaatta	240
	tgcagatagc aattccttga gtgactagat g	271
5	<210> 35 <211> 121 <212> ADN <213> Cebada, vc. sebastian	
	<400> 35	
	ggcatccaga ttccatcttc agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt	60
	ggatatccat tgcacttgca gaaaagtggg gcccttcgaa ggttggcacc tcttgttccg	120
10	t	121
	<210> 36 <211> 123 <212> ADN <213> Cebada, mutante 14018	
15	<400> 36	
	ggcatccaga ttccatcttc agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatggtt	60
	ggatatccat tgcacttgca gaaaagtggg gcccttcgaa gattggcacc tcttgttccg	120
	tag	123
20	<210> 37 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador PCR	
	<400> 37 atggctgagg cgccggggga cgtgg 25	
30	<210> 38 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador PCR	
40	<400> 38 aggattccag caaagaaaga age 23	
45	<210> 39 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador PCR	

<400> 39
 gattcttaac cccaatccag aggc 24

5 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 40
 gggttttgtt gaggaccaat ttggc 25

15 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 41
 tgctgcttc gtgaacttat t 21

25 <210> 42
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 42
 catatggatc tggaccgcag cttctt 26

35 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 43
 ccttgaagg gcaccactt tctgc 25

45 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador PCR

55 <400> 44
 ctggagagca cagtagttgc tcaag 25

60 <210> 45
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 45

ES 2 586 616 T3

ctgcataatt ttgtttgcc agagc 25

<210> 46
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador PCR

10 <400> 46
 tacaccattt gagcttgca gact 24

<210> 47
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador PCR

20 <400> 47
 aaaatggagg cgttactgc agaa 24

25 <210> 48
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 48
 35 ctagttgcta ccattcacct tagcacc 27

<210> 49
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 49
 45 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 50
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador PCR

55 <400> 50
 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 51
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador PCR

65 <400> 51
 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

ES 2 586 616 T3

5
<210> 52
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

<400> 52
10 atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 53
<211> 25
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

20 <400> 53
atggctgcgg cggcggggga cgtgg 25

<210> 54
<211> 25
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

30 <400> 54
ggctcctcgg cgccgtgcga cggcg 25

<210> 55
<211> 25
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

40 <400> 55
ggctcctcgg cgccgtgcga cggcg 25

45 <210> 56
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 56
55 ggctcctcgg cgccgtgcga cggcg 25

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

65 <400> 57
gtacgccgcg tcgccgacg 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 58
 10 cgcgccggcgg cgaagcgccg 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 20 <400> 59
 gtgcggaagc actcgagccc 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 30 <400> 60
 cgtggatgcg gaagtggaag 20
 <210> 61
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 40 <400> 61
 cttggaggtg ggggtcgagg acgacg 26
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 50 <400> 62
 gtgcggaagc actcgagccc 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 60 <400> 63
 cgtggatgcg gaagtggaag 20
 65 <210> 64

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 64
 ctggagggtg ggggtcgagg acgacg 26

10 <210> 65
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador PCR

20 <400> 65
 gtttatggtc tggatataaa cccaag 26

<210> 66
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador PCR

30 <400> 66
 aggattccag caaagaaaga age 23

<210> 67
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador PCR

40 <400> 67
 aaatccagca acaagattcc ggaaa 25

45 <210> 68
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 68
 ctgcataatt ttgttgcc agagc 25

55 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> His Tag

<400> 69

ES 2 586 616 T3

Met Gly His
1 5 10

5 <210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sitio de enteroquinasa
<400> 70

Ser Ser Gly His Ile Asp Asp Asp Asp Lys His

1 5 10

15 <210> 71
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 71
catatgatgg ctgcggcggc gggggacgtg g 31

25 <210> 72
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador PCR

35 <400> 72
gaattctagt tgctaccatt caccttagca cc 32

40 <210> 73
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

45 <400> 73
ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcac 27

50 <210> 74
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

55 <400> 74
ggatcctcaa agaattgcta tctgcataat tttgtttgc cagagc 46

60 <210> 75
<211> 27
<212> ADN

ES 2 586 616 T3

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
5
<400> 75
ggccgcgggg ctcgagtgtc tccgcac 27
10
<210> 76
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial
15
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 76
ggatccttag cagcctgtc ctggccggcc tcccatg 37
20
<210> 77
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
25
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 77
30 cgattccagc ttccggtg 19
<210> 78
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
35
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 78
40 cgattccagc ttccggtg 19
<210> 79
<211> 19
<212> ADN
45 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
50 <400> 79
cgattccagc ttccggtg 19
<210> 80
<211> 22
55 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
60 <400> 80
ggcatccaga ttccatcttc ag 22
65 <210> 81
<211> 26
<212> ADN

ES 2 586 616 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 5 <400> 81
 catctagtca ctcaaagaat tgctac 26
 <210> 82
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador PCR
 <400> 82
 catctagtca ctcaaagaat tgctat 26
 20 <210> 83
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 83
 30 catctagtca ctcaaagaat tgctat 26
 <210> 84
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 84
 40 ctacggaaca agaggcgcca at 22
 <210> 85
 <211> 27
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 50 <400> 85
 ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcac 27
 <210> 86
 <211> 63
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 60 <400> 86
 cgagataaga taaatatcta cggaacaaga ggtgccaatc ttcgaagggc accacttttc 60
 tgc 63
 <210> 87

ES 2 586 616 T3

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 87
 ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcac 27

10 <210> 88
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 88
 aacctgagta aatgtctaac ttctgcaggt cccatgtttg caacaaacga gataagataa 60
 atatctacgg 70

20

<210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador PCR

30 <400> 89
 ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcac 27

<210> 90
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Cebador PCR

40 <400> 90
 ggatccctac tggcagacac ctaaaagttt catataaagt aacctgagta aatgtctaac 60
 ttctgc 66

45 <210> 91
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador PCR

50 <400> 91
 ggccgcgggg ctcgagtgt tccgcac 27

<210> 92
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Cebador PCR

60

ES 2 586 616 T3

<400> 92
 ggatccttat atccagacca taaacctgag taaatgtcta acttctgc 48

5 <210> 93
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 93
 ggccgcgggg ctcgagtgc tccgcac 27

15 <210> 94
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 94
 aggtttatcc atgcaatcct gatagctcct gggtttatat ccagaccata aaccattgcc 60
 acatcccagc tctgctactg 80

25 <210> 95
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

35 <400> 95
 ggccgcgggg ctcgagtgc tccgcac 27

40 <210> 96
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 96
 ggatccttat agattgggag accatcgtcg tctagtgcac tcaagtaaag gtttatccat 60
 gcaatccttga tagctccttg 80

50 <210> 97
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 97
 ggcatccaga ttccatctc ag 22

60 <210> 98

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 98
 ggcatccaga ttccatcttc ag 22

10 <210> 99
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 99
 ggcatccaga ttccatcttc ag 22

<210> 100
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 100
 cgattccagc ttccggttg 19

<210> 101
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 101
 ctacggaaca agaggtgcca ac 22

<210> 102
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 102
 ctacggaaca agaggtgcca at 22

<210> 103
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 103
 ctacggaaca agaggtgcca at 22

60 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 103
 ctacggaaca agaggtgcca at 22

65

ES 2 586 616 T3

<210> 104
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> Cebador PCR
10
<400> 104
catctagtca ctcaaagaat tgctat 26

REIVINDICACIONES

1. Una bebida preparada a partir de una planta de cebada o una parte de la misma en la que dicha bebida contiene un nivel de dimetil sulfuro (DMS) por debajo de 20 ppm y un nivel de S-metil-l-metionina (SMM) de menos de 20 ppm y en la que dicha planta de cebada o parte de la misma porta una mutación en el gen que codifica la metionina S-metiltransferasa (MMT), causando una pérdida total de MMT funcional.
2. La bebida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha bebida es una bebida de malta.
3. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la bebida es cerveza.
4. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la bebida contiene menos de 10 ppm de DMS.
5. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la bebida contiene menos de 10 ppm de S-metil-l-metionina (SMM).
6. Una planta de cebada o una parte de la misma en la que la planta de cebada porta una mutación en el gen que codifica la metionina S-metiltransferasa (MMT) que provoca una pérdida total de función de la MMT.
7. La planta de cebada o parte de la misma de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la mutación se encuentra en un sitio de corte y empalme del gen que codifica la MMT.
8. La planta de cebada o una parte de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en la que la mutación en el gen que codifica la MMT es una mutación G→A de la base n.º 3076 de la SEQ ID NO: 3 o una mutación G→A de la base n.º 1462 de la SEQ ID NO: 16.
9. La planta de cebada o una parte de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que la mutación da como resultado un gen que codifica una forma truncada de MMT que comprende un fragmento N-terminal de MMT de tipo silvestre y opcionalmente secuencias C-terminales adicionales no encontradas en la MMT de tipo silvestre, en la que dicho fragmento N-terminal comprende como máximo los 500 restos de aminoácido N-terminales de la SEQ ID NO: 6.
10. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la bebida se prepara a partir de una planta de cebada o una parte de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
11. Una composición de malta que comprende una planta de cebada procesada o una parte de la misma, en la que dicha planta de cebada es la planta de cebada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
12. La composición de malta de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la composición de malta es malta molida.
13. Una composición de mosto preparada usando la planta de cebada o parte de la misma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o usando una composición de malta preparada a partir de dicha planta de cebada o parte de la misma o mezclas de las mismas, en la que la composición de mosto comprende menos de 20 ppm de SMM.
14. Un método para producir una bebida que contiene menos de 20 ppm de DMS y menos de 20 ppm de SMM, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (i) preparar una composición que comprende una planta de cebada o partes de la misma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9;
 - (ii) procesar la composición de (i) en una bebida;
 obteniendo de este modo una bebida que contiene menos de 20 ppm de DMS y menos de 20 ppm de SMM.
15. Un método para producir una composición de malta que comprende como máximo 200 ppm de DMS libre, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (i) proporcionar granos de una planta de cebada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9;
 - (ii) remojar dichos granos;
 - (iii) germinar los granos remojsados en condiciones predeterminadas;
 - (iv) tratar los granos germinados con calor;
 produciendo de este modo una composición de malta que comprende como máximo 200 ppm de DMS libre.

16. La planta de cebada o parte de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que la planta de cebada porta una mutación en el gen que codifica lipooxigenasa 1, causando una pérdida total de la actividad de lipooxigenasa 1.
- 5 17. La composición de malta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en la que la composición de malta se prepara a partir de la planta de cebada o parte de la misma, de acuerdo con la reivindicación 16.
- 10 18. La composición de mosto de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la composición de mosto se prepara a partir de la planta de cebada o parte de la misma de acuerdo con la reivindicación 16.
19. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la bebida se prepara a partir de la planta de cebada o parte de la misma de acuerdo con la reivindicación 16.

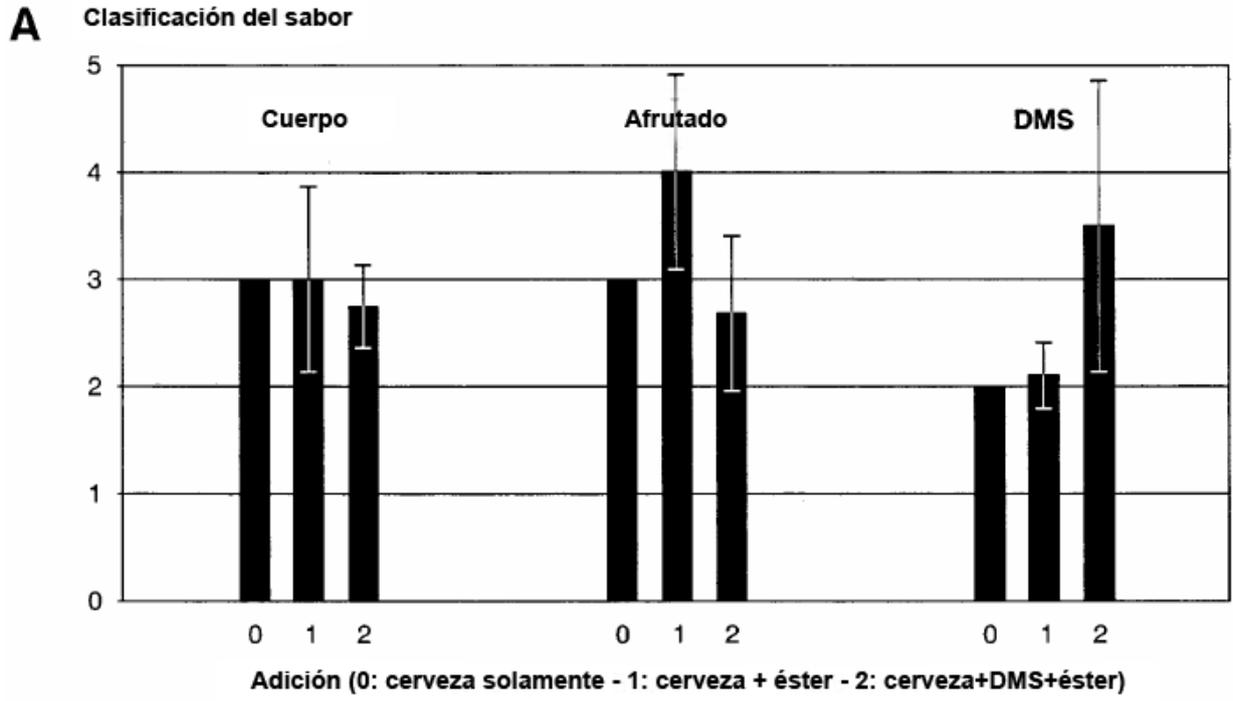
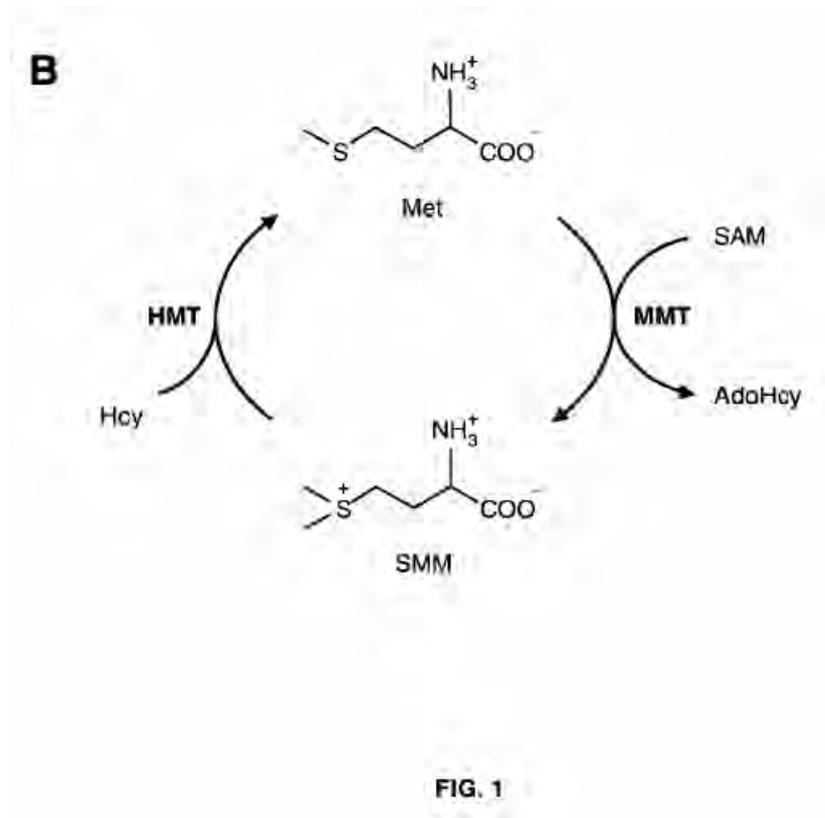


FIG. 1



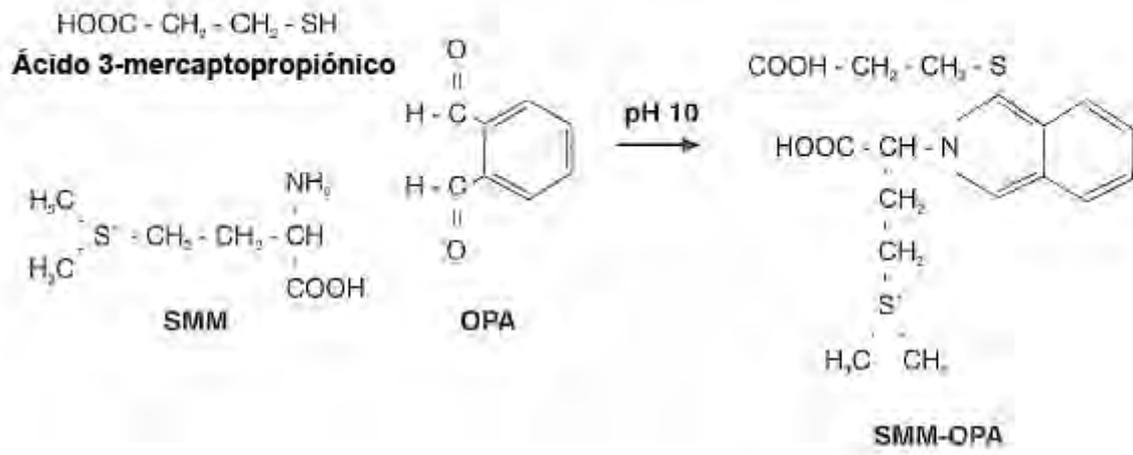


FIG. 2

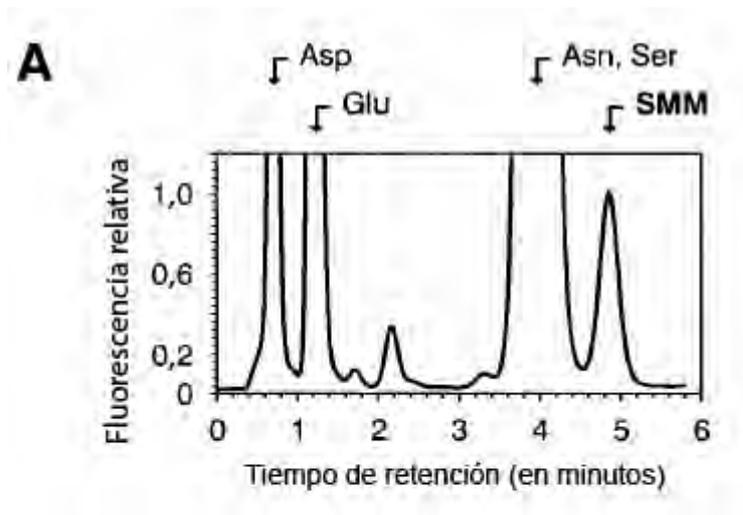


FIG. 3

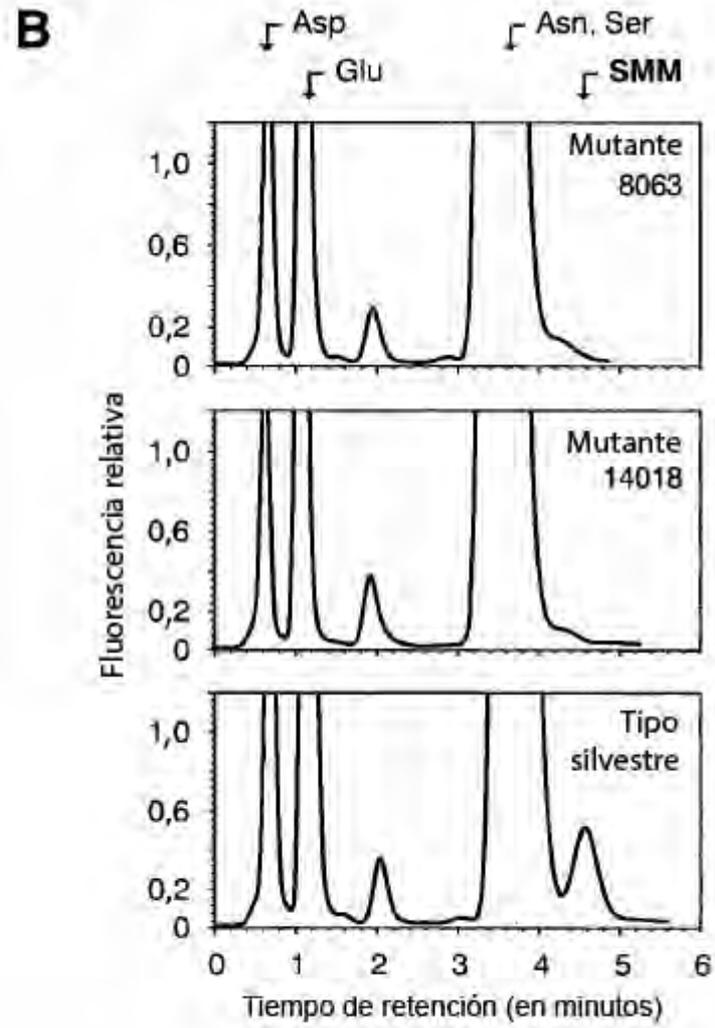


FIG. 3

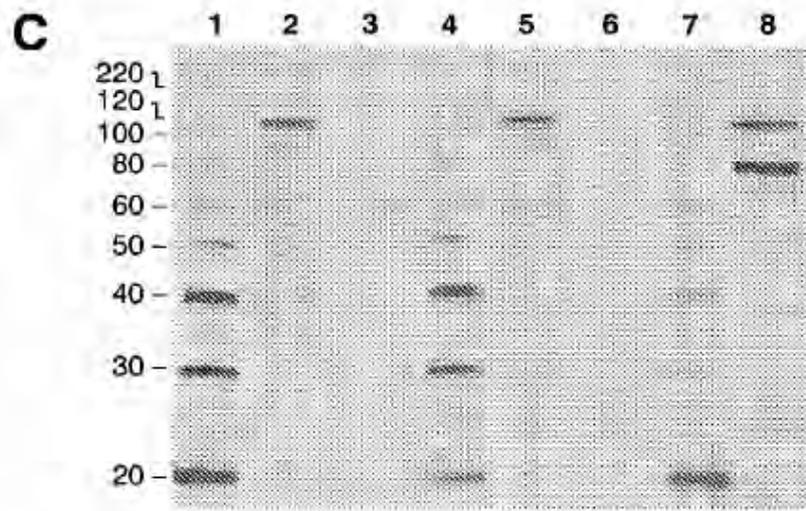


FIG. 3

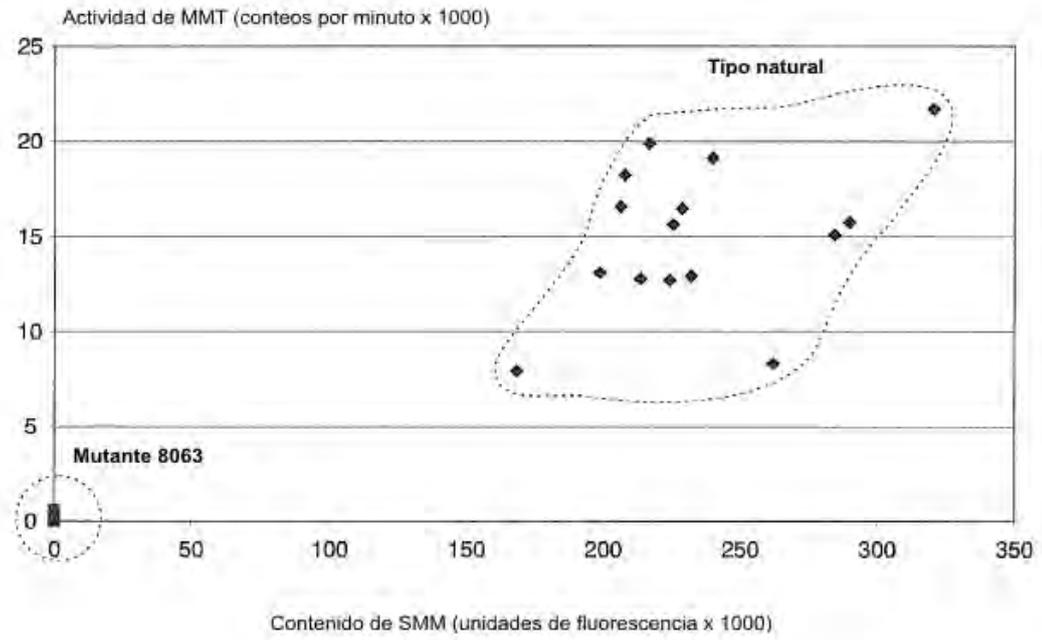


FIG. 4

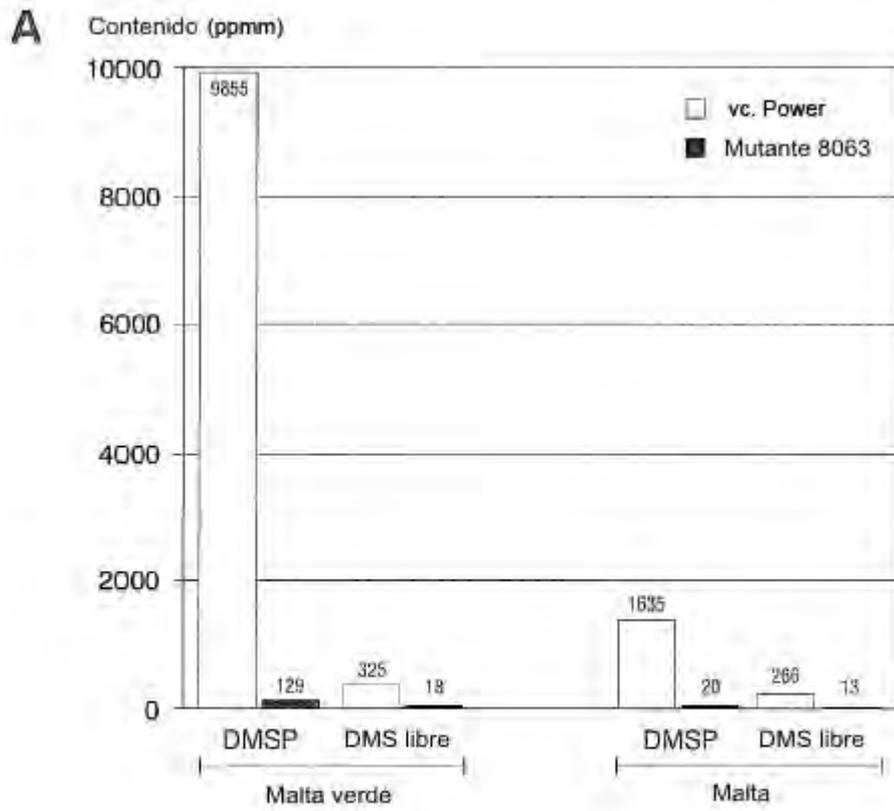


FIG. 5

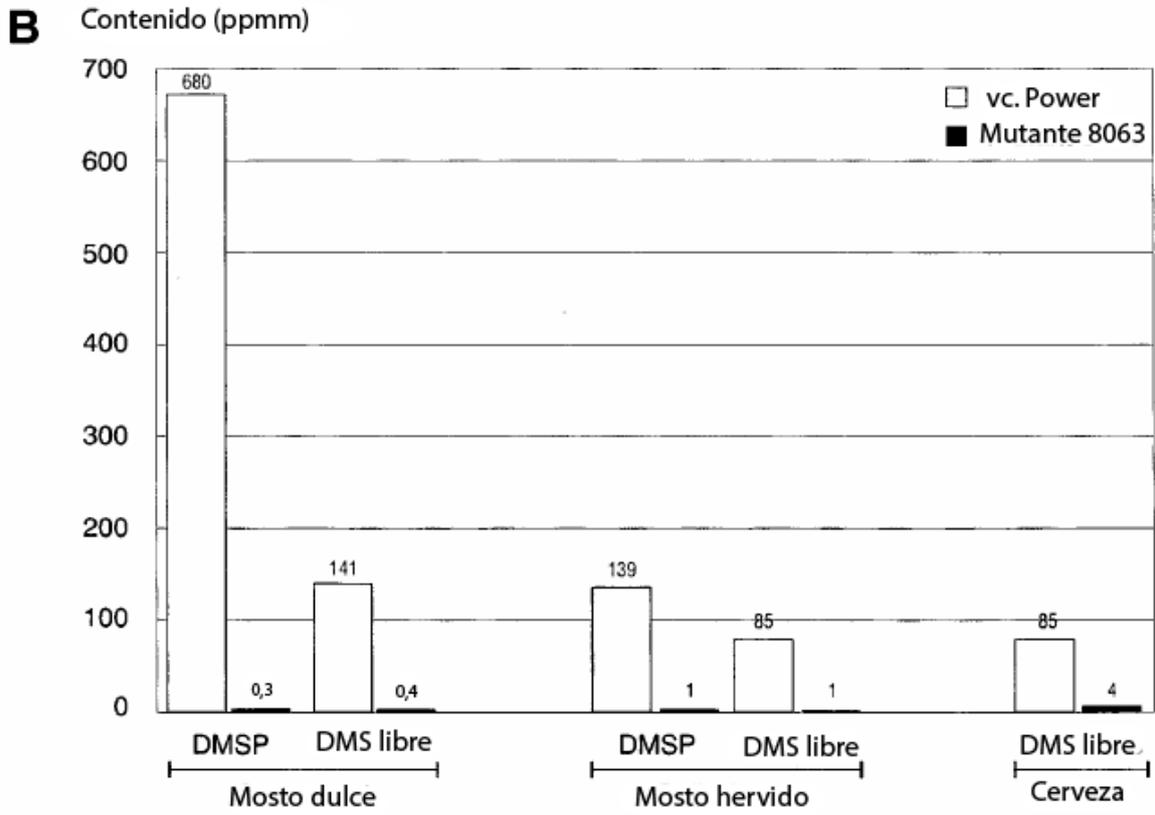


FIG. 5

A

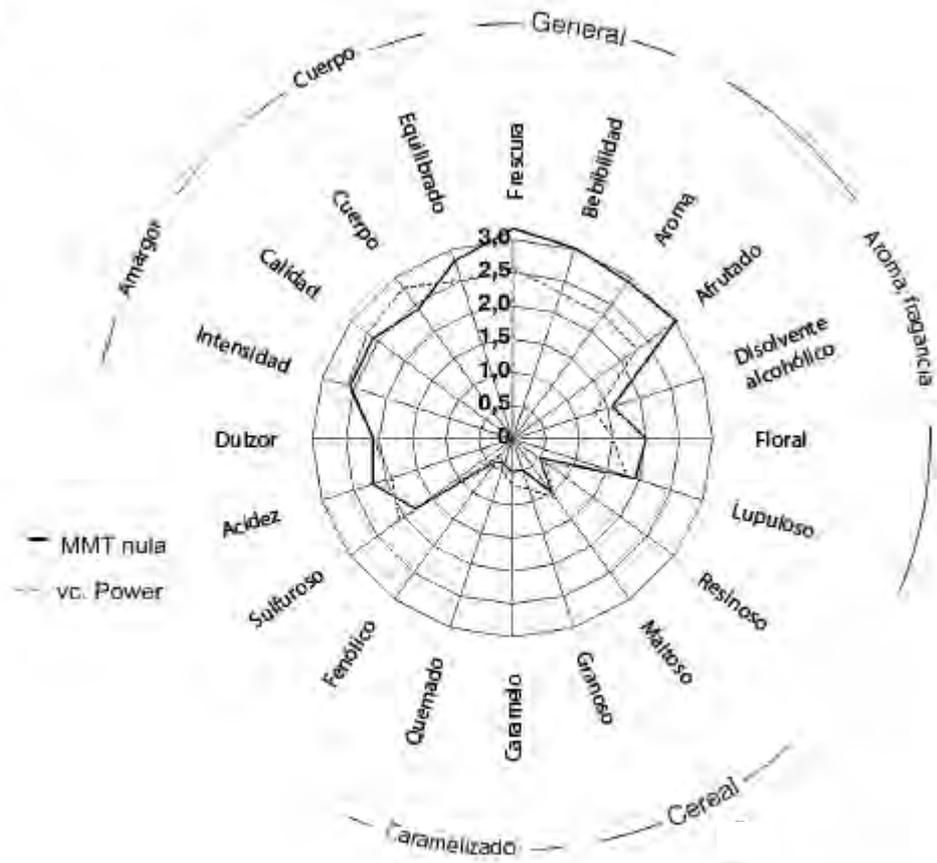


FIG. 6

B

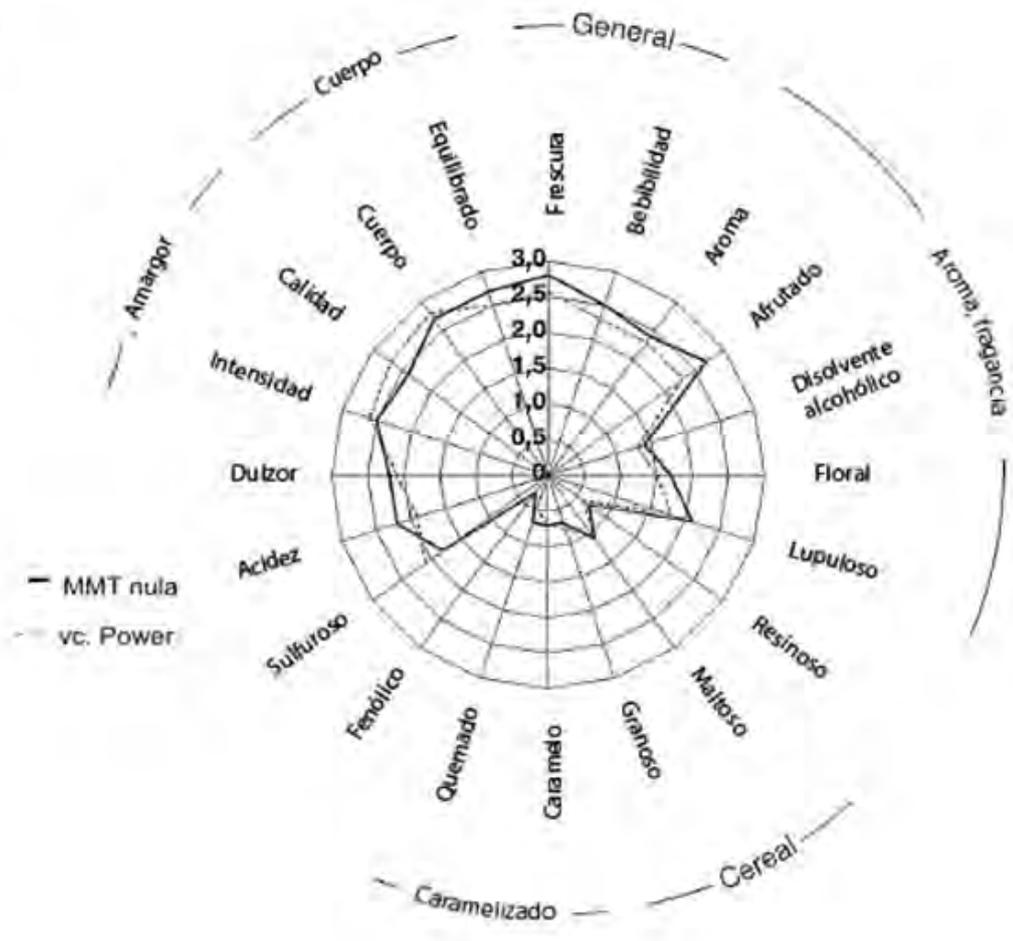


FIG. 6

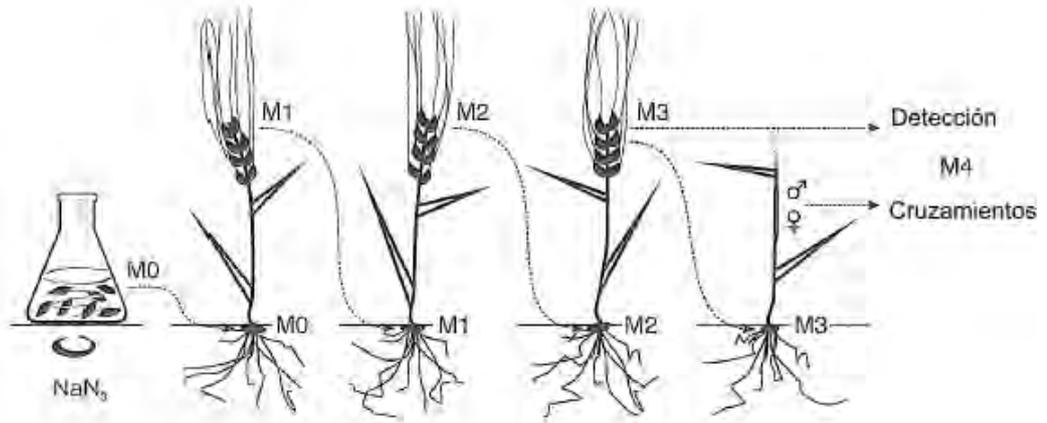


FIG. 7

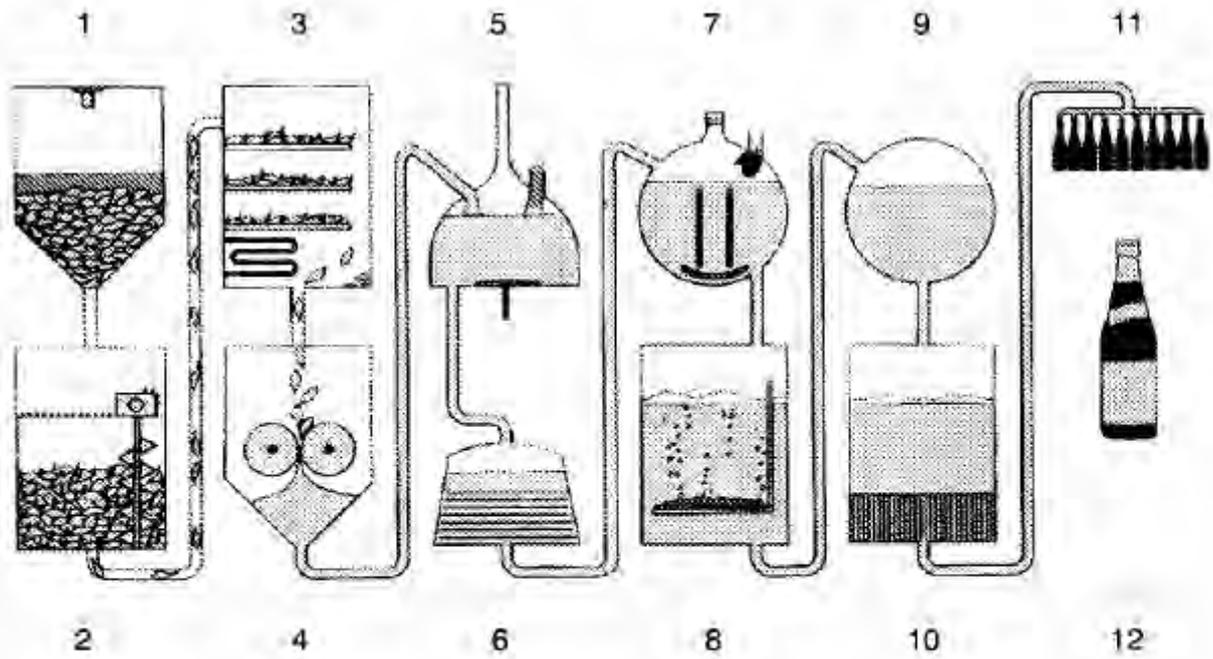


FIG. 8



FIG. 9

```

1  ATGCTGCAGCGCGCGGAGCGTGGAGGCTTCTGCGCGCGTCCAGCGCTCGGCGGAC 60
1  M A A A A G D V E A F L A A C Q A S D D 20
81  GCGCGTACGGCGCGCCAGGCGGTGCTGGAGCGGCTGGAGGCGCGGCCACGCGCGC 120
21  A A Y G A A K A V L E R L E A P A T R A 40
121  GAGGCCAGGCGGCTGGTGGCGCGGTGCGAGCGGCTTGGCGCGCGCGCGCGCGCG 180
41  E A R R L L G A V R R R F A A G G P A A 60
181  GGGCTGGAGTGGCTTGGCGCGCTGGACTTGGCGATGCAAGGCGGTGGTGGTGGCGCG 240
61  G L E C F R T F H F R I H D V V L D P H 80
241  CTCGAAAGATTCCAGCAAGAAAGAGCTAACAATGATGGAGATACCGAGCATTTTCATT 300
81  L Q G F Q Q R K K L T M M E I P S I F I 100
301  GCGAAGACTGGTCATTCACCTTCTACGAGGGTGTCAAGCGGCATCCAGATTCATCTTC 360
101  F E D W S F T F Y E G L N R H P D S I F 120
361  AGGGATAAGACAGTAGCAGAGCTGGGATGTGGCAATGGTTGGATATCCATTGGACTTGA 420
121  R D K T V A E L G C G N G W I S I A L A 140
421  GAAAATGGTGGCTTGGAGGTTATGGTGGATATAAACCGAAGAGCTATGAGATT 480
141  E K W C P S K V Y G L Q I N P R A I K J 160
481  GCATGGATAAACCTTACCTTGAATGCACTAGACAGGATGGTCTCCCAATCTATGATGG 540
161  A W T N L Y L N A L D D D G L P I Y D A 180
541  GAGGGGAAAACATTGCTTGCAGAGTGGAAATTCATGAATCTGATCTTCTTCTTACTGT 600
181  E G K T L L D R V E F Y E S D L L S Y C 200
601  AGAGATAACAAGATAGAAGCTTGCATCCATTGGTGGATGCATACCGAGATTCTTAACCC 660
201  R D M K I E L D R I V G C I P Q I L M P 220
661  AATCCAGAGGCAATGTCAAGATTGTAACGAAAATTCAGTGGAGATTCTTGTACTCC 720
221  N P E A M S K I V T E N S S E E F L Y S 240
721  TTGAGCAACTACTGTGCTCTCCAGGTTTTTGTGGAGACCAATTTGGCTCGGGTTGATT 780
241  L S N Y C A L Q G F V E D Q F G L G L I 260
781  GCTCGGCTGTTGAAGAAAGGATATCTGATGATAAGCCTAGTGGTCTTATGGTATTCAC 840
261  A R A V E E G I S V T K P S G L M V F N 280
841  ATGGAGGCGCGCCAGGACAAGGIGTCTGTGAGCGCTATTTCTAGCGCGTGGATTTCGC 900
281  M U G R P G Q G V C E K I F L R R G F H 300
901  ATCAATAAGCTCTGGCAACAAAAATTAAGGAGGCTGGTGGACAGACATCTCCGCTTFA 960
301  I N K L W Q T K I M G A A D I D I S A L 320
961  GTTGAATTTGAGAAAAATAGCCGACATCGCTTCGAGTTCTTTATGGATCTTGTGGGGAT 1020
321  V E I E K N S R H R F E F F M D L V G D 340
1021  GAGCCTGTGTGGCGCACAGCATGGGCAACATGAAATCTGGTGGCGCATTTTCACAT 1080
341  G P V C A R T A W A Y M K S G G R I S H 360

```

FIG. 10

1081 GGTTTGTCTGTATAGCTGTCAACTTCGCCAGCCCAACGAGGTGAAGAAAAATTTGAG 1140
 361 A L S V Y S C D L R Q P N Q V K K I F E 380

1141 TTCCTAAAGACGGATTCCATGAAGTCAGCAGCTCCCTCGAATTGTCTTTGATGATGAT 1200
 381 F L K D G F H E V S S S L D L S F D D D 400

1201 TCTGTTGCTGATGAAAAATTCCTTTCTAGCATACTAGCTAGTTTCTTGCAGAGAAAT 1260
 401 S V A D E K I P F L A Y L A S F L Q E N 420

1261 AAGTCTAATCCTTGTGAGCCTCCAGCTGGATGTTAAATTTCCGAACTTTGTTGCTGGA 1320
 421 K S H P C E R P P A G Q L N F R N L V A G 440

1321 TTTATGAAGAGTTACCACCAGATCCDATTAACTCCTGATAATGTTGTTGTTGCCATCC 1380
 441 F M K S Y H H I P L T P D N V V V F P S 460

1381 GGTGCTATTGCAATCGAAAAATGCTCTTCCGTTGTTCTCACCCTGGACTTGCATTTGTTGAC 1440
 461 R A V A I E W A L R L F S P G L A I V D 480

1441 SAACACCTAACGAGACACTTCGCCAAGCAATGGTTAACATCTTAGCAATTGAGGAAAGT 1500
 481 E S I T R H L P K Q W L T S L A I E E S 500

1501 AACCATGOTAAAGTACAGTAACTGTAACTGGAAGCAACAGCCAAATCAGATTTGCTGATT 1560
 501 N H A K D T V T V I E A P R Q S D L L I 520

1561 GAGTTGATCAGGAAACTGAAAGCCTGAGGTTGTTGTTACTGCAATGGCTCAGTTTGAGGCT 1620
 521 E L I R K L K P Q V V V T G M A Q F E A 540

1621 ATCACCAGTCTGCTTTCCGTAACCTATTAAGTGAACGAAAGATGTTGGTTCCCGATTA 1680
 541 I T S A A F V N L L S V T K D V G S R L 560

1681 TTACTAGATATTTGAGAACATCTGGAATTTGCTAGTCTGCCAAGCTCAAAATGGTGTATTG 1740
 561 L L D I S E H L E L S S L P S S N G V L 580

1741 AATATCTTGTGGGAGAACCTGCTTCACATGCGGCTATATTTGTGCGCTTAGTTAAG 1800
 581 K Y L A G K T L P S H A A I L C G L V K 600

1801 AATCAGGTTTATCTGATCTGGAAGTTGCTTTTGGTATCTCTGAAAGTCCAACCTGTTTAT 1960
 601 N Q V Y S D L E V A F A I S E D P T V Y 620

1861 AAGGCATTGTCAAGAACTATTGAGCTATTGGAAGGACATACTTCTGTGATCAGCCAGCAC 1920
 621 K A L S Q T I E L L E G H T S V I S O H 640

1921 TATTATGGTTGTCTTTTCCATGAGCTGCTGGCATTTCAAAATGGTGACCGGCATCCACAA 1980
 641 Y Y G C L F H E L L A F Q I G D R H P Q 660

1981 CAAAGAGAGAACCTGCGAAGTGAATCTAAGGAGATGATAGGCTTTTCAAGTTCAGCT 2040
 661 Q E R E P A E V I S K E M I G F S S S A 680

2041 ATGTCCACCCTAGAAGGAGGTGAGTTTTCGTTCTGGTTCCATGGAATCCGGTGTGATA 2100
 681 M S T L E G A E F F V P G S M E S G V I 700

2101 DATATGGATCTGGACCGCAGCTTCTTGGCAGTACCTTCTGCAGTAAACGCCTCGATTTTC 2160
 701 H M D L D R S F L P V P S A V N A S I F 720

2161 SAAGTETTGTTCAGAACATCACTGATTCTGAAACGATGTCGGTTCCAGCATTCAG 2220
 721 E S F V R Q N I T D S E T D V R S S I Q 740

FIG. 10 - Continuación

2221	CAGCTGGTGAAGATAGCTATGGTTTCACGACGGCGGTGCTTCTGAATTTATATACGGG	2280
741	Q L V K D S Y G F S A G G A S E I I Y G	760
2281	AACACCTGTCTCGCCCTCTTCAACAAGCTTGTCTTTGCTGCATGCAAGAACAGGGCACC	2340
761	N T C L A L F N K L V L C C M Q E Q G T	780
2341	TTGGTTTTCGCCCTTGGGAACCAACGGGGATTACGTCAACCCAGCAAABTTTGTGAATGCA	2400
781	L L F P L G T N G H Y V N A A K F V N A	800
2401	ACCACCTTACTATTCGAACGAAGCGAGATTGAGGCTTCAAGATCGAACCAAGTGGTCTA	2460
801	T T L T I P T K A D S G F K I E P S A L	820
2461	GGGACACACTAGAGAAGGTGTCTCAGCCGTGGGTCTATATTTCTGGCCCAACAATCAAC	2520
821	A D T L E K V S Q P W V Y I S G P T J W	840
2521	CCTACTGGCTTCTGTACAGTGAACGATATAGCAGAGCTGCTTTCTGTCTGTGCGACA	2580
841	P T G F L Y S D D I A E L L S V C A T	860
2581	TACGGAGCCAGGCTGGTATAGATACCTGCTGCTGGTCTGGAGTTCCAAGCCACCGGC	2640
861	Y G A R V V I D T S S S G L E F Q A T G	880
2641	TGCAGCCAGTGGAAATTTGGAAGATGTCTTTCTAATGTCAAGTCTTCAAAGCCCTGGTTC	2700
881	C S Q W N L E R C L S N V K S S K P S F	900
2701	TCCGTTGCTGCTGGGAGAGCTGTCTTTGAGCTGACCAAGGCTGGGCTTGATTTCGGG	2760
901	S V V L I G E L S F E L T T A G L D F G	920
2761	TTCTGATTATGAGGCACTGCTCCTTGGTTGACAGATTTTACAGTTTCCCAAGCTTGAGT	2820
921	F L I W S D S G L V D T F Y S F P S I S	940
2821	GGCCACACAGCAGCTTGAAGTACAGCTTCAAGGAGCTGTTGGGCTTAAAGAACCAAGAG	2880
941	R P H S T L K Y T F R K L L G L K N Q K	960
2881	GATCAGCATTTCTCTGATCTCATCCTTGAGCAGAAGGAGAGCTTGAAGAATCGTGGCAGC	2940
961	D D H F S D I I L E Q K E T L K N R A D	980
2941	CAGTTGATCAAGAGGCTTGAGAGCTGCGGCTGGGAGGCTGTGGGCTGCCATGGGGGATC	3000
981	Q L I K T L E S C G W D A V G C H G G I	1000
3001	TGCATGCTTGCAAAACCGAGCCGCTACATTGGCAAAATCGCTCAAGGTGGAGGGCTTTGAG	3060
1001	S M L A K P T A Y I G K S L K V D G F E	1020
3061	GGCAAGCTGGACAGCCACAACATGAGGGAGCCCTCCTGAGGTCCACCGGCTGTGCATT	3120
1021	G K L D S H N M R E A L L R S T G E C I	1040
3121	AGCAGCAGCGGGTGGACAGGGTGCCTGGACTACTGCCGCTTCAAGCTTTGCTCTGGAGAGC	3180
1041	S S S G W T G V P D Y C H F S F A L E S	1060
3181	GGGACTTCGACCGGGCATGGAGTGCATCGCCGGTTCAAGGAGCTGGTCTTGGTGGC	3240
1061	G D F D R A M E C I A R F R E L Y L G G	1080
3241	GGTGTAAAGGTGAAATGGTAGCAACTAG	
1081	G A K V N G S N ?	

FIG. 10 – Continuación

	1	60
VC. Haruna Nijo	MAAAAGDVEAFLLACDAAGGDAAYGAANAVLERLEAPATRAEARRLLGAVRRRF AAGGPAA	
vc. Prestige	MAAAAGDVEAFLLACDAAGGDAAYGAANAVLERLEAPATRAEARRLLGAVRRRF AAGGPAA	
	61	120
VC. Haruna Nijo	GLECFRTFHFRTHDVLDPHLQGFQDRKKLTMMETPSIFIPEDWSFTFYEQLNRHPDSIF	
vc. Prestige	GLECFRTFHFRTHDVLDPHLQGFQDRKKLTMMETPSIFIPEDWSFTFYEQLNRHPDSIF	
	121	180
VC. Haruna Nijo	RDKTVAELGCGNGWISIALAEKWCP SKVYGLDINPR[REDACTED]KIAWINL YL NALDOOGLPIYDA	
vc. Prestige	RDKTVAELGCGNGWISIALAEKWCP SKVYGLDINPR[REDACTED]KIAWINL YL NALDOOGLPIYDA	
	181	240
VC. Haruna Nijo	EGKTLDRVEFYESQLLSYCRDNKTELDRIVGCIPQILNPNPEAMSKI VTENSSEEFLYS	
vc. Prestige	EGKTLDRVEFYESQLLSYCRDNKTELDRIVGCIPQILNPNPEAMSKI VTENSSEEFLYS	
	241	300
VC. Haruna Nijo	LSNYCALGGFVEDDFGLGLIARAVERGT SVIKPSSL MFMGGRRPGGGVGERLFLRHGFR	
vc. Prestige	LSNYCALGGFVEDDFGLGLIARAVERGT SVIKPSSL MFMGGRRPGGGVGERLFLRHGFR	
	301	360
VC. Haruna Nijo	INKLWOTKIMQAADTDISALVEIENMSRHRFEFFMDLVGDDPVCARTAWAYMKSGGRISH	
vc. Prestige	INKLWOTKIMQAADTDISALVEIENMSRHRFEFFMDLVGDDPVCARTAWAYMKSGGRISH	
	361	420
VC. Haruna Nijo	ALSVYSCDLRQPNQVKKIFEFLLKUGFHEVSSSLDLSFD DQSVADEKTPFLAYLAGFLQEN	
vc. Prestige	ALSVYSCDLRQPNQVKKIFEFLLKUGFHEVSSSLDLSFD DQSVADEKTPFLAYLAGFLQEN	
	421	480
VC. Haruna Nijo	KSNPCEPPAGCLNFRNLVAGFMKSYRHPI LTPDNVVVFP SRAVAIENALRLFSPLAIVD	
vc. Prestige	KSNPCEPPAGCLNFRNLVAGFMKSYRHPI LTPDNVVVFP SRAVAIENALRLFSPLAIVD	
	481	540
VC. Haruna Nijo	EHLTRHLPKQWLTSLAIEESNHAKDTVTVIEAPROSILIELIRKLPQVWVTGMAQFEA	
vc. Prestige	EHLTRHLPKQWLTSLAIEESNHAKDTVTVIEAPROSILIELIRKLPQVWVTGMAQFEA	

FIG. 11

vc. Haruna Nijo	541	800
vc. Prestige	ITSAAFVNL LSVTKDYGSRL LLDI SEHLESSL PSSMGVL KYLAGKTL PSHAA IL CGLVK	
vc. Haruna Nijo	801	860
vc. Prestige	NOVYSDLEVAFATSEDPVYKALSQT IELLEGHTEV ISDHYYGCL FHELL AFOIGDRHPQ	
vc. Haruna Nijo	861	720
vc. Prestige	QEREPAEVI SKEMI QFSSSAMSTLEGAEFFVPSME SGVIHMDLDRSFLPVP SAVNASIF	
vc. Haruna Nijo	721	780
vc. Prestige	ESFVRONTITDSETOVRSSIOOLVKDSYGF SAGBASE IIVGNTCLALFNH(LVLCOMQEOGT	
vc. Haruna Nijo	781	840
vc. Prestige	LIFPLIUTNGHYVNAAKFVNATTL TTPTKA0SGFK IEPALADTLE KVSQPVVYISGFTIN	
vc. Haruna Nijo	841	900
vc. Prestige	PTGFLYSDDQIAELL SVCATYGARVV IDTSSSGLEFQATGCSQWNLERCLSNVKSBNP5F	
vc. Haruna Nijo	901	960
vc. Prestige	SVVLQGLS FELTTAGLDFGFLIMSDSSLVDTFYSFPSL SRPHSTLKYTFRKL LGLKNOK	
vc. Haruna Nijo	961	1020
vc. Prestige	DOHFSDLILEQKETLKNRADQLIKLESCGWDAVQCHGIGISMLAKPTAYIGKSLKVDGFE	
vc. Haruna Nijo	1021	1080
vc. Prestige	QKLDSHMREALLRSTGLCISSSGHTGVPDYDRF3FAL ESQDFDRAMECIARFRELVLGG	
vc. Haruna Nijo	1081	
vc. Prestige	QAKVNGSN	

FIG. 11 – Continuación

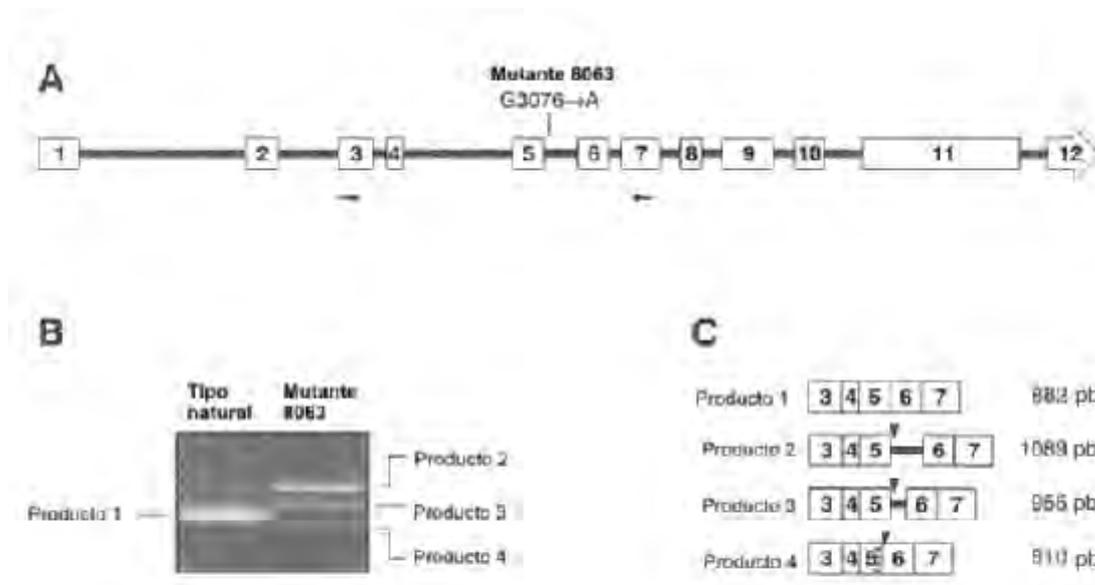
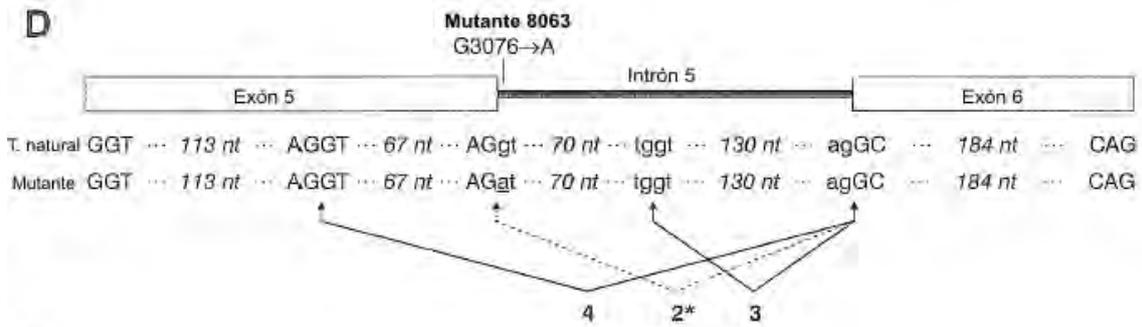


FIG. 12



E

	Sitio de ensamblaje 5'				Sitio de ensamblaje 3'			
	-2	-1	:	1 2	-2	-1	:	1 2
<i>Composición básica en porcentaje</i>								
G	9	79		100	0	0		0 100 62 24
A	64	7		0	0		100	0 14 18
C	14	8		0	0		0	0 15 18
T	12	6		0	100		0	0 9 39
Consenso	A	G	:	G	T		A	G : G T
Intrón 5, Mutante 8063	A/T	G	:	G	T		A	G : G C

FIG. 12

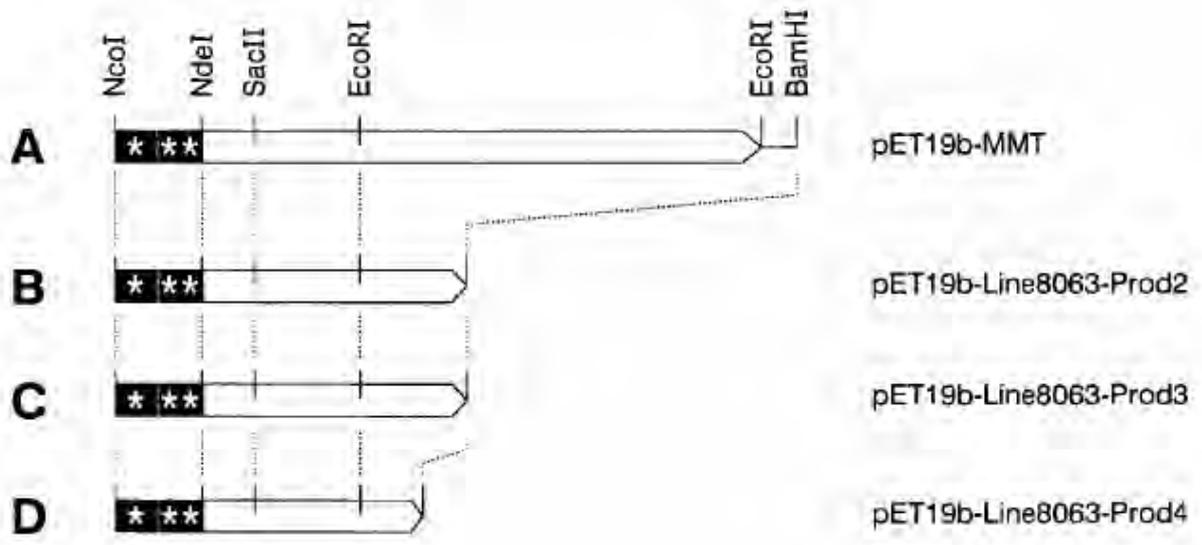


FIG. 13

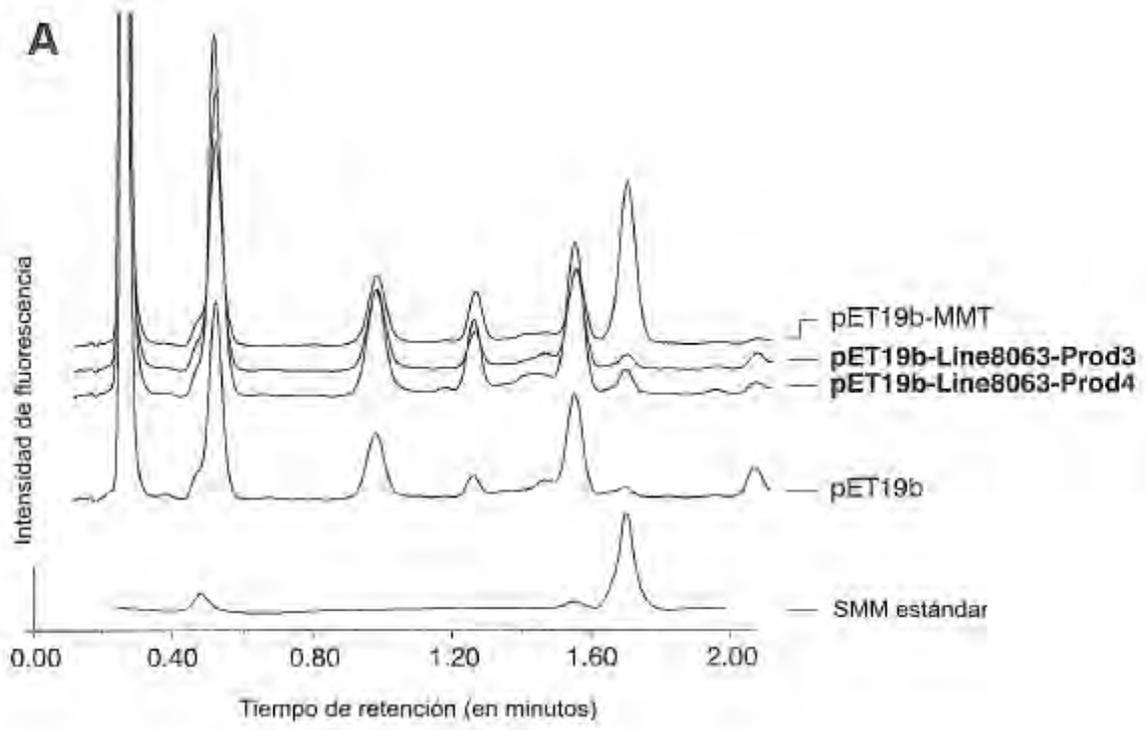


FIG. 14

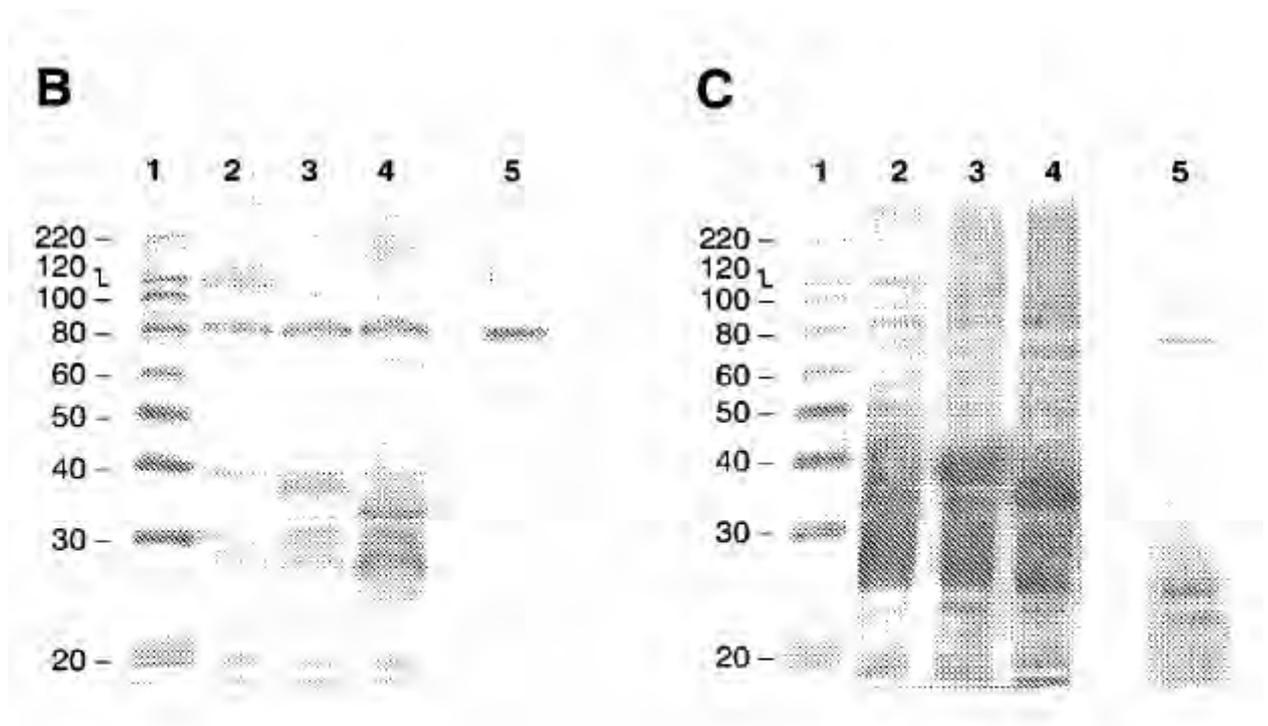


FIG. 14

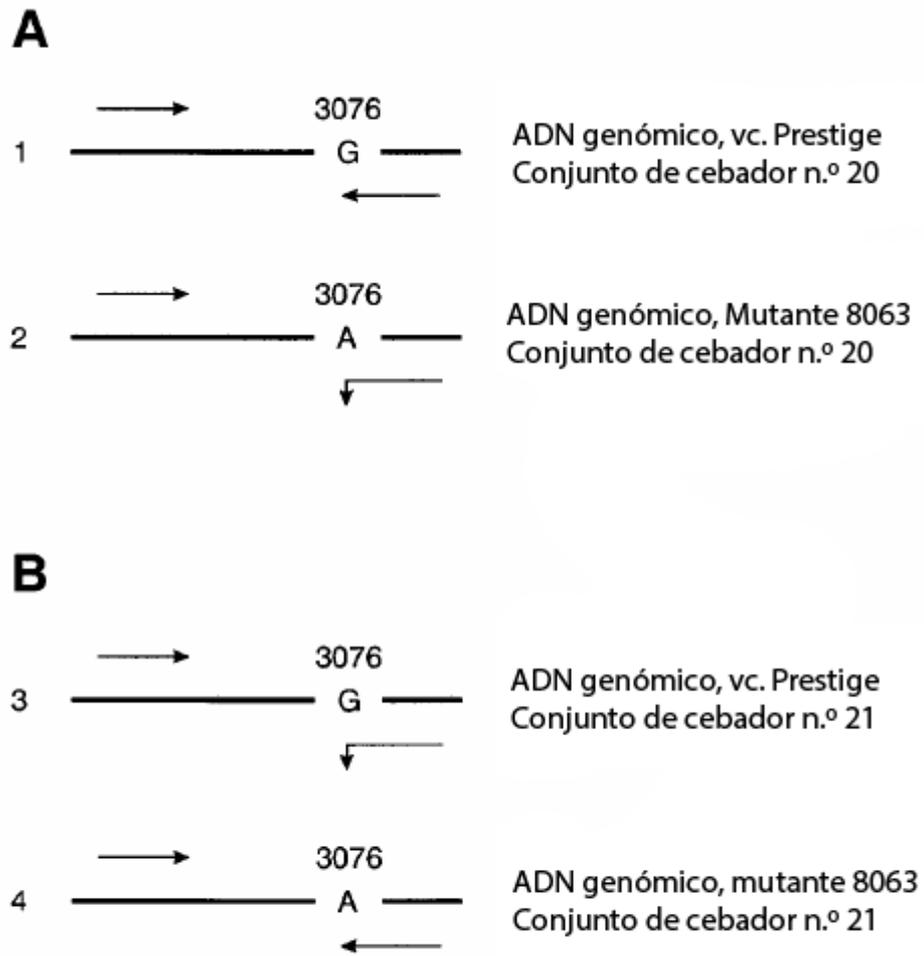


FIG. 15

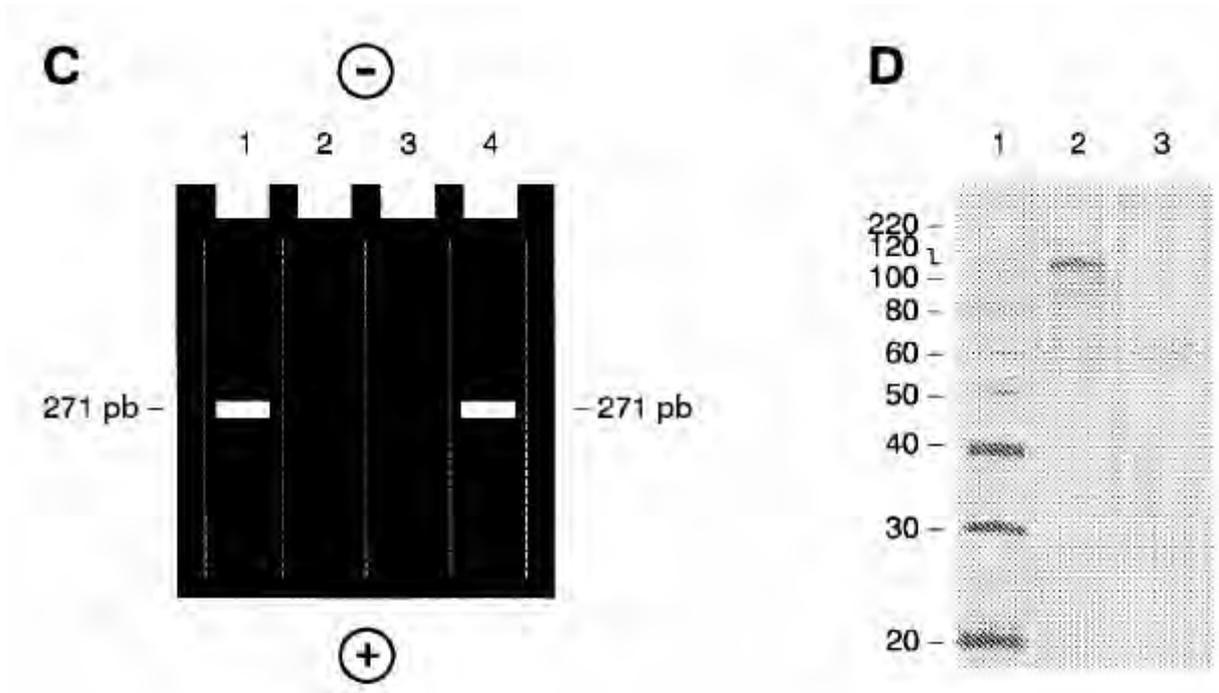


FIG. 15

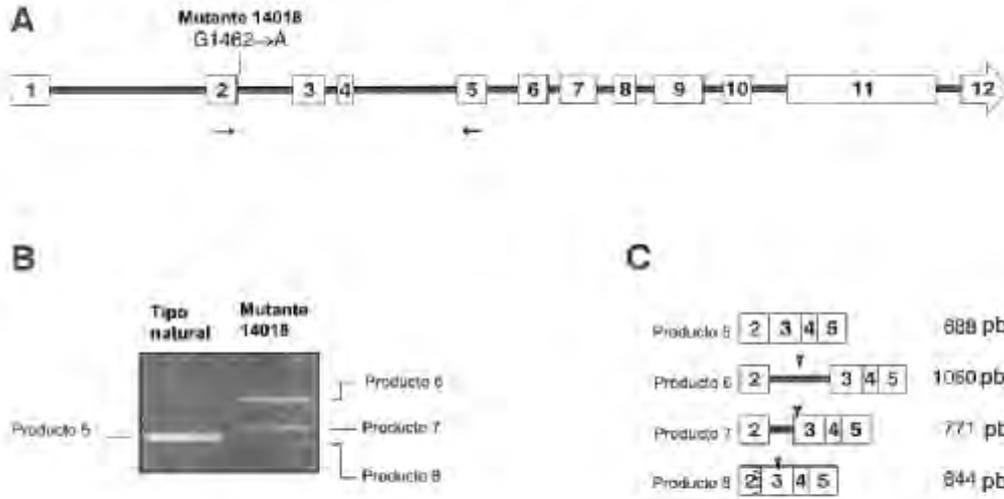


FIG. 16

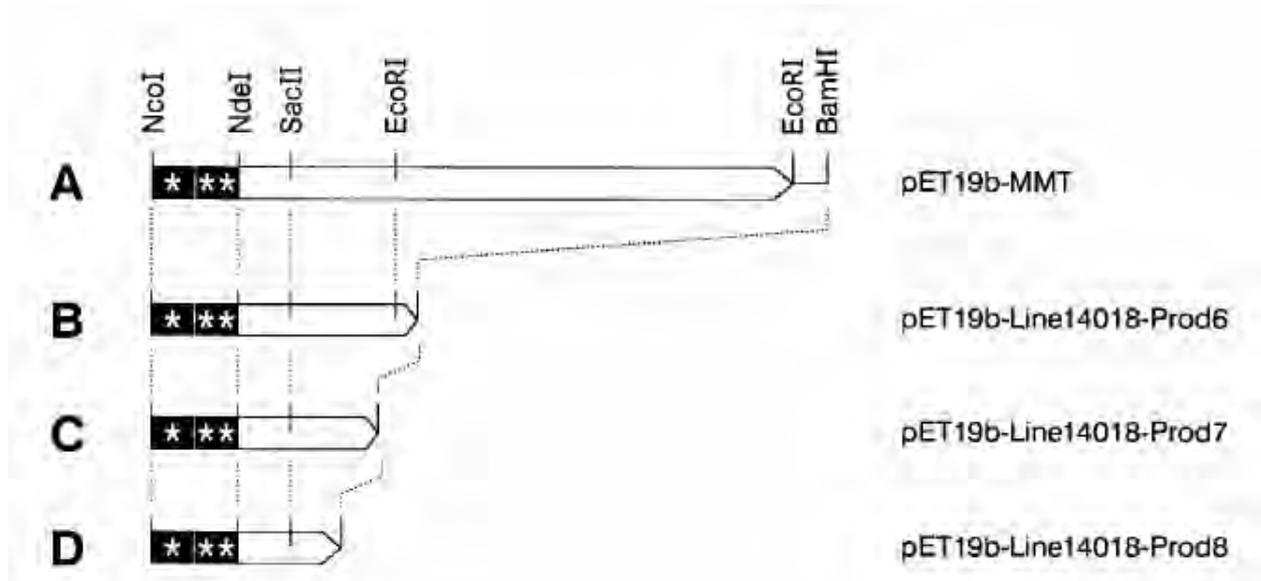


FIG. 17

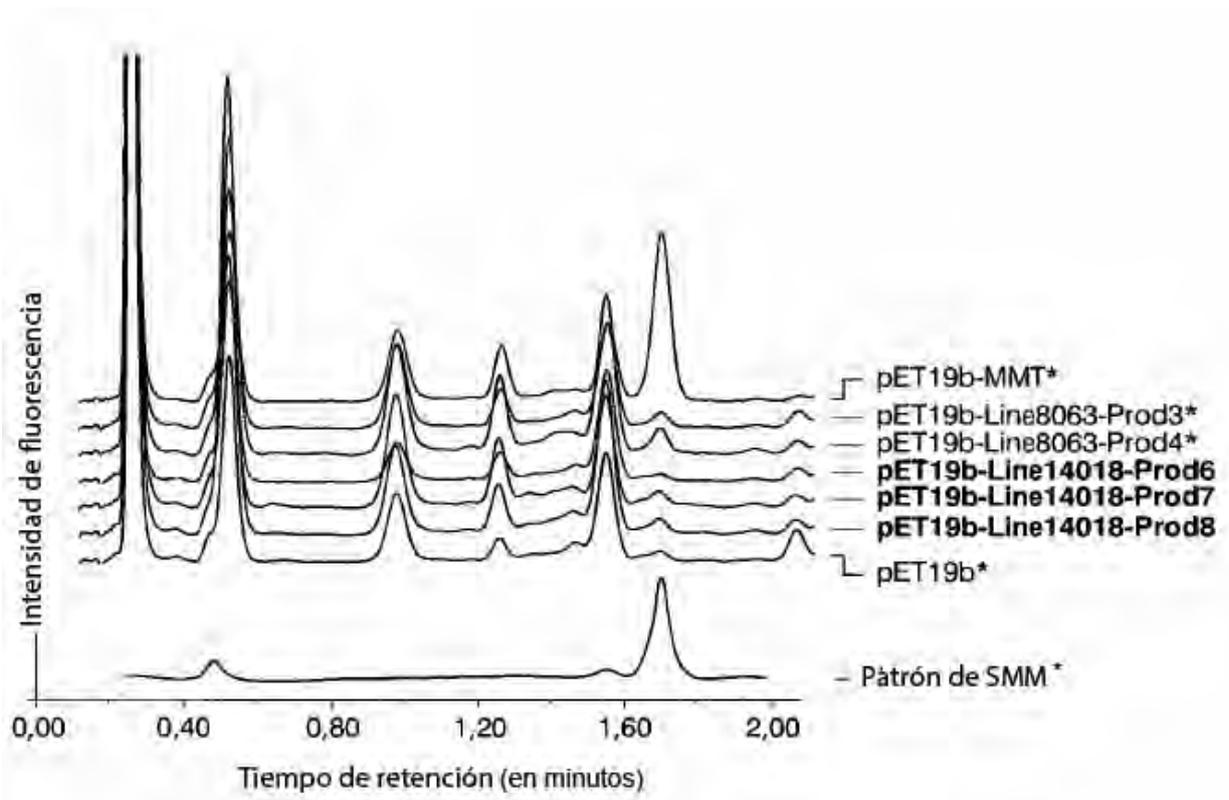


FIG. 18

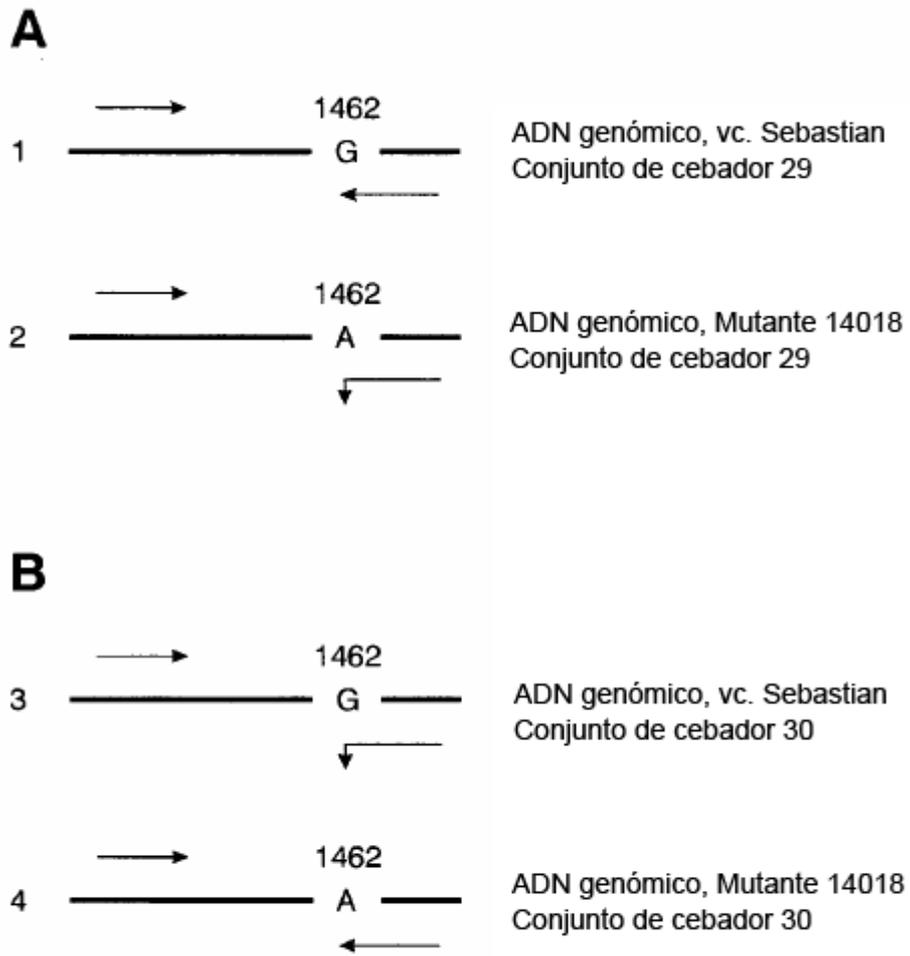


FIG. 19

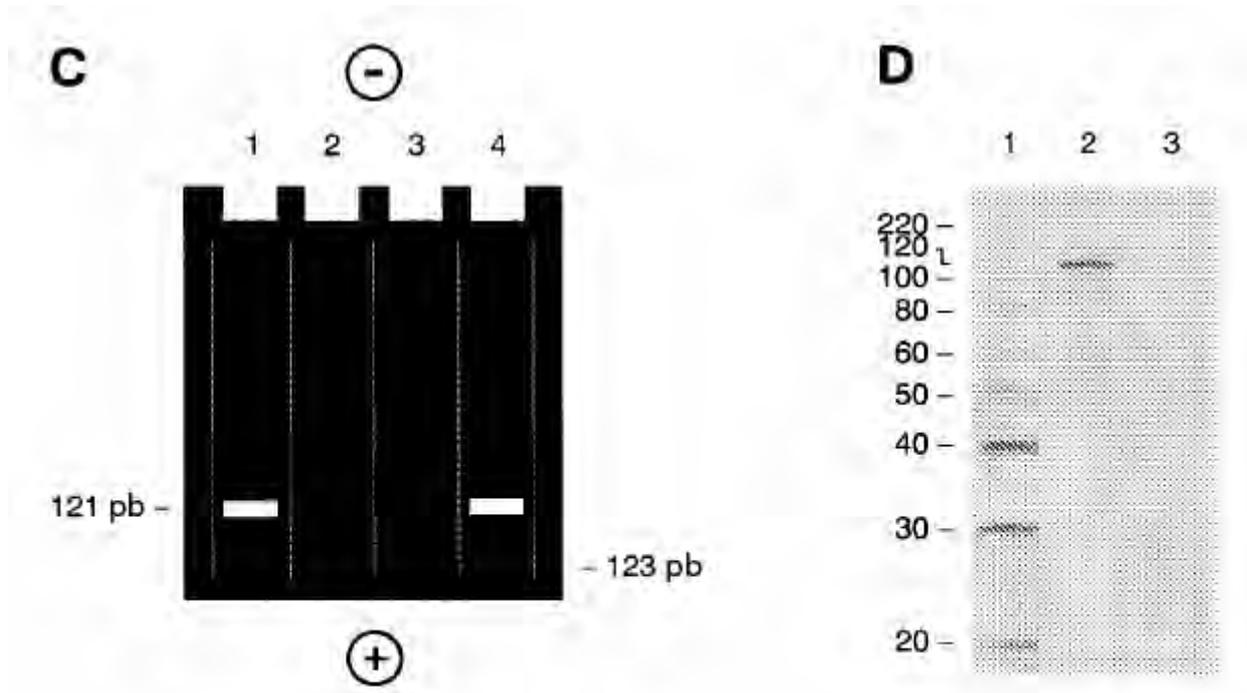


FIG. 19