

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.01.22	(73) Titular(es): CARLSBERG A/S NY CARLSBERG VEJ 100 DK-1799 COPENHAGUE V HEINEKEN TECHNICAL SERVICES B.V. BRASSERIES KRONENBOURG SOCIÉTÉ DITE : S.A.	DK NL NL FR
(30) Prioridade(s): 2000.12.29 US 751687 2000.12.29 WO PCT/IB00/020		
(43) Data de publicação do pedido: 2003.09.24	(72) Inventor(es): VARENA CAMERON-MILLS ANNA CHRISTIANA DOUMA ALBERT DODERER BIRGITTE SKADHAUGE LENE MOLSKOV BECH	DK NL NL DK NL
(45) Data e BPI da concessão: 2011.11.02 028/2012	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **CEVADA COM NÍVEL BAIXO DE LIPOXIGENASE-1**

(57) Resumo:

SÃO FORNECIDAS PLANTAS DE CEVADA CONTENDO ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPOXIGENASE-1 REDUZIDA, POR EXEMPLO, PLANTAS DE CEVADA EXPRESSANDO A PROTEÍNA MUTANTE LOX-1. AS PLANTAS DE CEVADA DA INVENÇÃO SÃO ÚTEIS NA PRODUÇÃO DE PRODUTOS VEGETAIS TAIS COMO O MALTE E AS BEBIDAS FERMENTADAS, CONTENDO ESTABILIDADE AUMENTADA E UM POTENCIAL REDUZIDO PARA O T2N.

RESUMO

"CEVADA COM NÍVEL BAIXO DE LIPOXIGENASE-1"

São fornecidas plantas de cevada contendo atividade enzimática da lipoxigenase-1 reduzida, por exemplo, plantas de cevada expressando a proteína mutante LOX-1. As plantas de cevada da invenção são úteis na produção de produtos vegetais tais como o malte e as bebidas fermentadas, contendo estabilidade aumentada e um potencial reduzido para o T2N.

DESCRIÇÃO

"CEVADA COM NÍVEL BAIXO DE LIPOXIGENASE-1"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção enquadra-se no campo da biotecnologia vegetal. Mais especificamente, a invenção refere-se a um gene mutante lipoxigenase 1 de cevada (*lox-1*) que codifica para uma enzima com atividade de formação do ácido 9-hidroperoxioctadecanóico seriamente reduzida.

A invenção também se refere ao uso de culturas homozigóticas de cevada para o *lox-1* em processos de fermentação para reduzir a formação de sabores alterados nos produtos fermentados, tais como a cerveja, durante o armazenamento.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As lipoxigenases são uma família de enzimas (EC 1.13.11.12) que catalisam a dioxidação de ácidos gordos poli-insaturados livres e esterificados contendo uma configuração 1(Z), 4(Z)-pentadieno. Os produtos de reações catalisadas pela lipoxigenase têm sido suspeitos de serem os principais responsáveis pelo aparecimento de sabores stale em grãos/sementes de plantas e em produtos alimentares derivados de grãos/sementes (Robinson *et al*, 1995, Food Chem, 54:33-43). As lipoxigenases têm sido implicadas na produção de aldeídos voláteis de hexanal gerados durante o processamento de soja, que têm um aroma indesejável, limitando o uso de proteínas de soja nos produtos alimentares. Acredita-se que três isoenzimas de lipoxigenase expressos nas sementes de soja contribuem para a oxidação lipídica e para a formação de hexanal. Os mutantes de soja que carecem de um ou mais destes

isoenzimas foram gerados com o objetivo de reduzir a formação de hexanal e melhorar a estabilidade do seu sabor. O sucesso desta abordagem foi avaliada por Hildebrand *et al.*, 1990, J. Agric. Food Chem. 38: 1934-1936. Os mutantes que carecem de lipoxigenase 3 de soja produziram níveis mais elevados de hexanal, sugerindo que este isoenzima desvia 13 hidroxiperoxi-octadecanóides, produzidos por oxidação lipídica, na direção de produtos não-voláteis. O desempenho no campo de linhas de soja triplamente-nulas, carecendo de todas as três lipoxigenases de sementes demonstrou que estas enzimas não são essenciais para as características normais agronômicas e das sementes (Narvel *et al.*, 1998, Crop Sci. 38: 926-928).

As lipoxigenases também foram implicadas na geração de sabores alterados no arroz, que podem ocorrer durante o armazenamento dos grãos. A libertação de ácidos gordos livres pode ser detetada em grãos armazenados, o que é indicativo do metabolismo das reservas de triglicéridos. Verificou-se que a variedade de arroz Daw Dam acumulou níveis mais reduzidos de pentanais e hexanais conferindo uma estabilidade melhor do sabor aquando do armazenamento (Susuki *et al.*, 1999, J. Agric. Food Chem, 47: 1119-1124). Este fenótipo desejável foi atribuído à ausência da lipoxigenase-3 do arroz, que oxida cadeias acilo de lípidos insaturados para formar isómeros posicionais 9-hidroxiperoxi-octadecanóicos.

É reconhecido que a via da lipoxigenase é complexa, com muitas ramificações e o seu papel em numerosos aspetos do crescimento da planta e fisiologia não é totalmente compreendido. As modificações da via lipoxigenase que alteram a atividade da 9 hidroperoxidação em culturas de sementes são propostas para regular a sua suscetibilidade à

contaminação de micotoxinas por *Aspergillus* spp. (WO 9726364), o que é consistente com o envolvimento desta via na resistência a patógenos de plantas, mas não está relacionado com os objetivos da invenção aqui descrita.

Entre os vários aromas voláteis que contribuem para o sabor da cerveja, os aldeídos superiores insaturados com uma cadeia de 6-12 carbonos têm limiares de sabor organoléticos particularmente baixos (Meilgaard 1975, MBAA Tech. Quart. 12. 151-168). O *trans*-2-nonenal, que é membro deste grupo, tem ambos um limiar de sabor extremamente reduzido de 0,11 ppb e contribui para um sabor desagradável "papelão" semelhante a palha, da cerveja. A característica off-flavor causada pelo *trans*-2-nonenal é uma característica comum em cervejas armazenadas durante 1-3 meses ou mais e é particularmente prejudicial para o sabor de cerveja lager, que é fermentada com maltes leves e tem um sabor delicado. Há muito tempo que o sulfito é conhecido por melhorar a estabilidade do sabor da cerveja, não só pela ligação ao oxigénio e atuando como um anti-oxidante, mas também através da formação de compostos voláteis de adição de bissulfito com aldeídos e cetonas presentes na cerveja. As duas principais fontes de sulfito na cerveja são o sulfito produzido pela levedura durante a fermentação através da via de assimilação do enxofre e o sulfito adicionado à cerveja antes de ser embalado. As condições de fermentação que potenciam a produção de sulfito pelas leveduras e sua secreção permitem a formação de aductos de sulfito-carbonilo a partir de carbonilos presentes no mosto e previnem o seu posterior metabolismo pela levedura (Dufour 1991, Proc.Eur. Brew. Conv. Congr., Lisbon, pp 209-216). Deste modo, os carbonilos tais como o acetaldeído e o diacetilo podem ser transferidos para a cerveja. A capacidade do sulfito para prevenir o aparecimento do

composto carbonilo *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja foi demonstrada através da fermentação de cerveja com uma estirpe de levedura bloqueada na via de assimilação de enxofre (Johannesen et al. 1999, Proc.Eur. Brew. Conv. Congr., Nice, pp.655-662). Após o engarrafamento, a cerveja foi sujeita a um envelhecimento forçado, por armazenamento a 37 ° C durante 7 dias, após o que os níveis de *trans*-2-nonenal foram verificados como estando muito acima do limiar de sabor. Se 10 ppm de sulfito forem adicionados à cerveja de baixo sulfito pouco antes de iniciar o engarrafamento, o aparecimento do *trans*-2-nonenal durante o envelhecimento forçado foi significativamente reduzido. A reação entre os compostos sulfito e carbonilo é reversível e ocorre sob controlo termodinâmico e cinético. As constantes de equilíbrio aparentes para os compostos bissulfito estão compreendidos entre 10^{-6} M para compostos carbonilo, tais como o acetaldeído, hexanal, e decanal, para 10^{-3} para diacetil e piruvato (Dufour 1991, supra). Durante o armazenamento de cerveja, as trocas gasosas através da embalagem permitem a entrada de oxigénio na cerveja e o sulfito é perdido, de tal forma que os aductos de bissulfito mais fracos vão dissociar, permitindo que os carbonilos livres apareçam na cerveja. Enquanto o sulfito, inquestionavelmente, realça a estabilidade do sabor da cerveja, particularmente a curto prazo, a retenção na cerveja embalada é fortemente dependente das trocas gasosas através da embalagem e da temperatura. Numa cerveja concluída os níveis naturais de sulfito produzido durante a fermentação são variáveis e a adição de sulfito antes do engarrafamento não é uma prática universalmente aceite. Por estas razões o sulfito por si só não fornece um método fiável para melhorar a longo prazo a estabilidade do sabor da cerveja nas condições de

armazenamento da cerveja diferentes das utilizadas em todo o mundo.

É geralmente aceite que o *trans*-2-nonenal encontrado na cerveja resulta da oxidação de ácidos gordos poli-insaturados derivados de lípidos dos grãos de cevada, onde o ácido gordo com cadeia de 18 carbonos, o ácido linoléico [classificado como um ácido gordo poli-insaturado 18:2, n-6 (Broun, Gettner e Sommerville 1999, Annu. Rev. Nutr. 19: 197-216)] é o mais abundante.

No entanto, há pouco consenso na bibliografia quanto ao mecanismo pelo qual o *trans*-2-nonenal é formado. A presença de vias enzimáticas que levam à formação do *trans*-2-nonenal a partir de ácidos gordos poli-insaturados foi proposta, mas as vias enzimáticas individuais nunca foram demonstradas experimentalmente em grãos de cevada ou durante o processo de maltagem (Gardner 1988, Adv. Cereal Sci. Technol. 9: 161-215). O conceito de utilização da tecnologia de genes anti-sense ou de co-supressão genética para reduzir os níveis da lipoxigenase-1 em grãos de cevada, e, assim, controlar a 9 hidroperoxidação e reduzir os níveis de aldeído e de álcool no grão de cevada acabado, foi proposto como um meio para controlar a formação de off flavor, mas os resultados de tal abordagem não são descritos (McElroy e Jacobsen, 1995, Bio / Technology 13: 245-249).

Foi desenvolvido um teste de força como um método para avaliar o potencial do *trans*-2-nonenal de uma cerveja, em que a formação do *trans*-2-nonenal em mosto ou cerveja é induzida pela submissão de amostras a temperaturas elevadas em pH reduzido, (100 °C, em pH 4,0 durante 2 horas). As tentativas de correlacionar o potencial *trans*-2-nonenal no

mosto e da cerveja terminada com o nível total de atividade das lipoxigenases no malte seco indicaram que a lipoxigenase pode contribuir para o aparecimento de *trans*-2-nonenal em cerveja envelhecida (Drost *et al.*, 1990, J. Am. Soc. Brew. Chem. 48: 124-131). As conclusões que podem ser extraídas deste estudo, no entanto, são severamente limitadas pelo fato da atividade da lipoxigenase no malte de cevada ser regulada no final do processo de maltagem pelo grau de inativação enzimática durante a secagem kiln. Assim, apenas o efeito da atividade de lipoxigenase residual de malte sobre o *trans*-2-nonenal potencial no mosto derivado e na cerveja acabada foi examinado. O estudo falhou na avaliação das lipoxigenases que catalisam o primeiro passo da via da lipoxigenase enzimática no grão de cevada durante o desenvolvimento e maltagem e o seu papel como determinantes dos níveis do *trans*-2-nonenal encontrado na cerveja. De fato, a ausência de culturas de cevada deficiente em um ou mais isoenzimas da lipoxigenase tornou impossível fornecer evidências convincentes para o papel da via das lipoxigenases em malte de cevada no controle da formação do *trans*-2-nonenal. Tais experiências são necessárias para avaliar a contribuição da via enzimática, em comparação com a via química/auto-oxidativa, para a formação do *trans*-2-nonenal na cerveja. O processo de fermentação envolve um passo com temperatura de ebulição elevada do mosto onde a ocorrência destas reações não enzimáticas é proposta (Noël *et al.*, 1999, J. Agric. Food Chem. 47: 4323-4326).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção proporciona uma planta de cevada contendo atividade da lipoxigenase-1 grandemente reduzida. Numa forma de realização, as plantas de cevada da invenção contêm um gene *lox-1* mutante que expressa níveis muito reduzidos da

isoenzima lipoxigenase-1 , em que a referida proteína mutada LOX-1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 12, em que o Xaa é ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, triptofano, asparagina ou glutamina.

Tal como aqui apresentado, o malte e o mosto produzidos a partir da cevada com lipoxigenase reduzida da invenção são úteis para produzir cerveja com estabilidade do sabor significativamente melhorada e níveis reduzidos do *trans*-2-nonenal, especialmente sob condições conhecidas por promover o aparecimento de T2N. A invenção demonstra uma correlação entre a atividade de lipoxigenase-1 do malte de cevada para produzir ácidos 9-hidroxiperoxi-octadecadienóicos (9-HPOD) e a presença do *trans*-2-nonenal na cerveja. O uso de cevada homozigótica para o gene *lox-1* mutante no processo de fermentação melhora a estabilidade do sabor da cerveja, tanto durante o armazenamento como na exposição a temperaturas de armazenamento elevadas. Estas propriedades melhoram a qualidade da a cerveja e são úteis para prolongar a sua validade e reduzir a necessidade de arrefecer a cerveja durante o transporte e armazenamento.

A invenção fornece plantas e porções de cevada tendo assim atividade de lipoxigenase-1 reduzida, expressando proteína mutante LOX-1 como aqui descritos. Os métodos para a produção de plantas de cevada, porções de plantas, produtos de plantas e, particularmente de malte e mosto produzidos a partir da plantas de cevada da invenção são aqui descritas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é um gráfico que apresenta o efeito do ácido nordi-hidroguaiarético inibidor (NDGA) nas lipoxigenase 1 e 2 purificadas por imuno-afinidade a partir de embriões de grão de cevada com 3 dias de germinação.

A Figura 2 é um gráfico que apresenta o peso fresco de grãos em desenvolvimento da Linhagem G e Vintage cv com 5 dias após o florescimento até à plena maturidade (FM). Cada determinação é o peso médio de grãos singulares de 6 espigões.

A Figura 3 é um gráfico que apresenta o peso seco de grãos em desenvolvimento da Linhagem G e Vintage cv a partir de 5 dias após o florescimento até à plena maturidade (FM). Cada determinação é o peso médio de um grão de 3 amostras de 5 grãos.

A Figura 4 é um gráfico que mostra a atividade da lipoxigenase total nos grãos em desenvolvimento da Linhagem G e Vintage cv desde 5 dias após o florescimento até à plena maturidade (FM).

A Figura 5 é um gráfico que mostra os produtos 9 - e 13-HPOD da oxidação do ácido linoléico pela atividade da lipoxigenase em grãos de Linhagem G em desenvolvimento.

A Figura 6 é um gráfico que mostra a atividade da lipoxigenase total em embriões de grãos em germinação da Linhagem G e Vintage cv expressa como P mol/min/10 embriões (U/10 embriões).

A Figura 7 é um gráfico que mostra os produtos 9 - HPOD e 13-HPOD da oxidação do ácido linoléico pela atividade da

lipoxigenase em embriões de grãos em germinação da Linhagem G e Vintage cv, mostrando os níveis de 9 - HPOD e 13-HPOD.

A Figura 8 é um Western blot que mostra a imunodeteção da lipoxigenase 1 em embriões de grãos em desenvolvimento da Linhagem G e Vintage cv [wt] desde 5 dias após o florescimento até à plena maturidade(FM).

A Figura 9 é um Western blot mostrando a imunodeteção da lipoxigenase 1 em embriões de grãos da Linhagem G e Vintage cv

[estirpe nativa] germinadas durante 0-6 dias.

A Figura 10 é um Northern blot sondado com a região 3 'não transcrita do cDNA do *lox-1* e apresentando transcritos de lipoxigenase 1 detetados nos grãos em desenvolvimento da Linhagem G e Vintage cv [estirpe nativa] desde 5 dias após o florescimento até à plena maturidade(FM).

A Figura 11 é um Northern blot sondado com a região 3 'não transcrita do cDNA do *lox-1* e apresentando transcritos da lipoxigenase 1 detetados em embriões de grãos da Linhagem G e Vintage cv [pt] germinadas durante 0-6 dias.

As Figuras 12A-12G são um alinhamento de sequências de nucleótidos da região promotora e transcrita do alelo Vintage cv (WT) e do alelo Linhagem G (LG) da estirpe nativa do *lox-1*. O local de início da transcrição (+1), o codão de início ATG (+69) e o codão stop da tradução (+4231) nas sequências de gene encontram-se sublinhados. As mutações nucleotídicas identificadas no alelo da Linhagem G são apresentadas em negrito e itálico e indicadas com um asterisco.

A Figura 13 é uma apresentação esquemática do gene *lox-1* de Vintage cv (estirpe nativa) e o gene mutante *lox-1* da Linhagem G. O transcrito desde +1 a +4375 é composto por 7 exões (caixas pontilhadas) e 6 intrões (caixas brancas). São indicadas duas mutações no gene *lox-1*.

A Figura 14 é um desenho esquemático de cassetes do gene para a expressão transiente do cDNA do *lox-1* de estirpe nativa e do gene *lox-1* e do gene mutante *lox-1* da linha G. As sequências codificantes da lipoxigenase foram clonadas entre o promotor de ubiquitina maíze constitutivo com o intrão 1 (Ubi-1) e o terminador nos.

A Figura 15 é um gráfico de barras que mostra a atividade da lipoxigenase 1 em protoplastos de aleurona de cevada transfetados com cassetes do gene contendo o cDNA do *lox-1* estirpe nativa; o gene *lox-1* mutante a partir da linha G; o gene *lox-1* WT; e um gene repórter GUS de controle. A atividade da lipoxigenase em extratos de protoplastos transfetados foi testada em placas de microtitulação pela oxidação de KI e quantificada espectralmente. A atividade de lipoxigenase 1 foi expressa em unidades por µg de proteína no extrato e é apresentada como a média de três medições de dois ensaios replicados.

A Figura 16 é um alinhamento de sequências demonstrando que um RFLP entre o gene *lox-1* de estirpe nativa e o gene *lox-1* mutante é devido a uma mutação pontual no nucleótido 2347, criando um local de restrição adicional AatII.

A Figura 17 é uma apresentação esquemática dos fragmentos *lox-1* de PCR amplificados e clivados na reação em cadeia da polimerase- ensaio de local polimórfico amplificado de clivagem (PCR-CAPS). As posições dos iniciadores PCR são

indicadas por setas e os locais AatII são mostrados acima do gene (posição na sequência). As regiões exão e intrão dentro do produto PCR são distinguidas por caixas pontilhadas e brancas, respectivamente e os tamanhos dos fragmentos da digestão com AatII são dados.

A Figura 18 é um gel de agarose eletroforético mostrando fragmentos da PCR do *lox-1* (652 pb) amplificados no primeiro passo do ensaio PCR-CAPS da Linhagem G e do ADN genómico Vintage cv.

A Figura 19 é um gel de agarose eletroforético mostrando o RFLP detetado por PCR-CAPS no gene *lox-1* de estirpe nativa e mutante. Os fragmentos da digestão por AatII do gene mutante incluem um único fragmento de restrição com 313 pb, indicado por um asterisco.

A Figura 20 é uma tabela mostrando um programa de back-crossing para o único par de genes recessivo *ll* (carácter lipoxigenase baixa) da Linhagem G para Alexis cv. O genótipo *LL* são plantas expressando atividade lipoxigenase estirpe nativa (alelo dominante), o genótipo *ll* são plantas expressando a lipoxigenase baixa (alelo recessivo). As plantas *Ll* são plantas heterozigóticas que contêm ambos os alelos lipoxigenase de estirpe nativa e lipoxigenase baixa. Uma vez que a característica de lipoxigenase baixa é uma característica recessiva, as plantas *Ll* apresentam atividade de lipoxigenase estirpe nativa. Após cada ronda de back-crossing (incluindo a auto-polinização), é esperado que a progenia *ll* represente 25% da progenia. As frequências observadas da atividade de lipoxigenase baixa são indicadas.

A percentagem calculada dos antecedentes genéticos Alexis cv contendo o alelo homozigótico de lipoxigenase baixa é indicado como % Alexis.

A Figura 21 é um gel de agarose eletroforético apresentando a detecção por PCR-CAPS do gene *lox-1* mutante na progenia 11 do programa Linhagem G - Alexis back-cross. O ensaio PCR-CAPS do ADN genómico da Linhagem G (Faixa 2), Vintage cv (Faixa 3) progenia 11 de 3^a (Faixa 4) e 4^a back-cross (Faixas 5-9). Graduação ADN (Faixa 1). Controlo, linha *lox* altamente backcrossed (faixa 10).

As Figuras 22A 22B são um alinhamento comparativo das sequências de aminoácidos de lipoxigenases de soja LOX-1 (Gm1), LOX-2 (Gm2), LOX-3 (Gm3) e lipoxigenases de cevada LOX-1 (Hv1) e LOX-2 (Hv2).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os materiais vegetais, produtos vegetais e métodos são fornecidos para a produção de uma bebida, tal como a cerveja, a referida bebida contendo um teor reduzido do composto de alteração de sabor *trans*-2-nonenal, de tal forma que a estabilidade do sabor da bebida, por exemplo, a cerveja, durante o armazenamento e exposição a temperaturas elevadas é melhorado, relativamente a uma bebida de controlo. Mais particularmente, a invenção fornece plantas de cevada, cujo desenvolvimento e germinação de grãos produzem níveis de atividade muito reduzidos da enzima lipoxigenase-1, denotada LOX-1, que, por exemplo, quando usada num processo de fermentação de cerveja, resulta numa cerveja tendo reduzido os níveis de *trans*-2-nonenal, em comparação com uma planta de cevada controlo.

Os métodos utilizados para gerar, caracterizar e validar uma planta de cevada tendo atividade LOX-1 muito reduzida, e utilização deste tipo de cevada para a produção de cerveja com sabor estável são descritos abaixo.

1. Definições

Tal como usado aqui, os seguintes termos têm as definições indicadas:

"Porção Vegetal" significa uma unidade ou uma parte específica de uma planta, como o caule, folhas, raízes, flores, sementes, grãos, frutos ou rebentos.

"LOX-1" significa proteína lipoxigenase-1 ; "*lox-1*" significa o gene que codifica para a LOX-1.

A "cevada mutante *lox-1*" significa um gene de cevada mutagenizado que codifica para um polipéptido de lipoxigenase 1 mutante.

O "controle não-mutado" significa uma planta, ácido nucleico, gene, polipéptido, porção de planta ou produto vegetal contendo o gene ou a proteína de estirpe nativa.

"Heteróloga" significa uma sequência não-nativa, por exemplo, uma sequência derivada de outra espécie, ou uma sequência concebida recombinantemente ou sintética que difere da sequência nativa.

"Produto vegetal" significa um produto resultante do processamento de uma planta ou porção de planta e inclui, por exemplo, malte e mosto.

"O aminoácido ácido" significa ácido aspártico ou glutâmico.

"Aminoácido básico" significa histidina, lisina, ou arginina.

"O aminoácido polar" significa treonina, serina, tirosina, triptofano, asparagina, ou glutamina.

"As características organoléticas" significam propriedades que apelam aos olfato e paladar, que são analisadas, por exemplo, por um painel treinado para degustação.

"Produto fermentado" significa um produto preparado por maceração, ebulição e fermentação, por exemplo, a cerveja. O "*trans*-2-nonenal" reduzido significa menos de cerca de 50%, quando em comparação com as condições (controle) originais.

2. Atividade de lipoxigenase

As enzimas lipoxigenase catalisam a oxidação de ácidos gordos poli-insaturados. Na cevada, as isoenzimas LOX-1 e LOX-2 são conhecidas. A LOX-1 catalisa primariamente a 9-hidroperoxidação, enquanto que a LOX-2 catalisa primariamente a 13-hidroperoxidação de ácidos gordos poli-insaturados octadecanóicos. Os dados apresentados nos exemplos abaixo demonstram uma correlação entre a atividade da 9 hidroperoxidação na LOX-1 de cevada e a presença do *trans*-2-nonenal na cerveja. De um modo concordante, a cevada ter reduzido a atividade LOX-1 é útil para produzir cerveja com um grau de *trans*-2-nonenal reduzido e/ou potencial em comparação com um controle.

3. Produção de cevada com lipoxigenase baixa

Podem ser usadas várias abordagens genéticas conhecidas para produzir as plantas da invenção, isto é, para reduzir

o nível de atividade da enzima lipoxigenase 1, expresso numa planta de cevada, de forma estável e hereditária. Estas abordagens incluem, mas não restringem a, tecnologia antisense e mutagênese, tais como a mutagênese induzida quimicamente e por radiação, assim como mutagênese dirigida ao local.

Transformação da cevada. A cevada pode ser transformada com várias moléculas de ácido nucleico concebido para manipular a expressão do gene *lox-1* ou alterar a arquitetura do gene *lox-1*. Vários métodos, por exemplo, a transferência de *Agrobacterium tumefaciens* mediada (Tingay *et al*, 1997, Plant J., 11: 1369-1376), bombardeamento de partículas (Wan e Lemaux, 1994, Planta Physiol, 104:. 37-48, ou recolha de ADN mediada por polietilenoglicol (PEG) (Funatsuki e Kihara, 1995, Theor. Appl. Genet., 91:707-712), podem ser usados para introduzir com sucesso ácidos nucleicos numa célula de cevada, por exemplo num protoplasto, calo ou num embrião.

Vários promotores podem ser usados para dirigir a expressão do gene de interesse. Para a expressão de vetores contendo *lox-1*, incluindo sequências antisense, a região promotora do *lox-1* nativo pode ser usada. A sequência promotora do *lox-1* está contida nos nucleótidos 2602-3511, que incluem a 5' UTR do EMBL nº de acesso U83904. Alternativamente, os promotores que dirigem a expressão do gene de interesse constitutivamente, por exemplo, o promotor ubiquitina de milho Ubi.1, podem ser usados (Wan e Lemaux, Supra; Kjærulff *et al*, em P. Mathis, Ed, 1995, Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. II, 151-154). Os vetores de expressão também podem conter uma região de terminação da transcrição, por exemplo, o terminador 3' do gene nopalina sintase (3'-nos) (Bevan, *et al*, 1983, Nucl. Acids Res, 11:.

369-385) foi fundido com genes expressos em cevada transgênica (Wan e Lemaux, Supra; Funatsuki e Kihara, Supra).

Os vetores de expressão também podem conter um gene que permite a seleção de células transformadas quando o vetor foi integrado com sucesso na célula. Estes genes podem codificar para os genes de resistência a antibióticos ou herbicidas, por exemplo, o gene da neomicina-fosfotransferase (npt) ou da fosfinotricina acetiltransferase (bar). Quando expressos, tais genes de resistência permitem o crescimento da célula transformada em meios contendo neomicina - ou bialafos, respectivamente (Ver, por exemplo, Wan e Lemaux, Supra; Funatsuki e Kihara, Supra; Kjærulff *et al*, em P. Mathis, Supra).

Após a transformação, as células podem ser cultivadas em meios seletivos durante um período de tempo e então cultivadas para permitir a formação de rebentos, seguido por sistemas de raízes e depois plântulas. Um procedimento de transformação da cevada bem sucedido foi desenvolvido por Funatsuki e Kihara, (Supra), onde a transformação de protoplastos de cevada por PEG com vetores de expressão contendo neomicina fosfotransferase e a subsequente seleção em neomicina originou plantas férteis contendo o transgene. O transgene foi demonstrado integrar-se no genoma e a maioria das plantas transgênicas expressaram a proteína codificada pelo transgene. Estas plantas transgênicas também foram capazes de transmitir e expressar os seguintes cruzamentos transgênicos.

É entendido que uma variedade de métodos de transformação, vetores de expressão, promotores, marcadores seletivos e

semelhantes são conhecidos e úteis para a transformação da cevada.

Mutagénesse da Cevada O gene *lox-1* pode ser alvo de mutagénesse específica do local usando oligonucleótidos ARN / ADN quiméricos. Estes oligonucleótidos quiméricos de ARN / ADN demonstraram introduzir com sucesso mutações em células de plantas (Zhu *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8768-8773, e Beetham *et al.*, 1999, Proc.. Natl. Acad. Sci. 96:8774-8778) e células de mamíferos (Yoon *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:2071-2076) em locais desejados. Os oligonucleótidos de ARN /ADN quiméricos podem ser transformados em protoplastos de cevada ou células de interesse numa variedade de maneiras, por exemplo usando os métodos de transformação mediados por PEG ou mediados por bombardeamento de partículas descrito acima. Os protoplastos individuais ou células podem então ser regenerados por cultura de tecidos para plantas totalmente férteis e o evento mutacional pode ser confirmado e seguido, por exemplo, usando uma abordagem baseada em PCR, conforme descrito nos exemplos abaixo.

Esta mutagénesse dirigida ao local pode ser aplicada a resíduos específicos mutados no gene *lox-1*. O gene *lox-1* pode ser mutado em uma ou mais posições de nucleótidos na região promotora para subregular ou abolir a transcrição do *lox-1*. A mutagénesse específica também pode ser aplicada para introduzir alterações na região codificante do *lox-1* que, por exemplo, reduzam a atividade enzimática. Tais mutações incluem, mas não se limitam a, inserções, deleções e substituições resultando numa estrutura, truncagem da proteína LOX-1 e/ou alteração da natureza neutra e hidrófoba da cavidade do substrato enzimático.

Expressão Antisense A redução na expressão do *lox-1* também pode ser conseguida pela expressão de um constructo antisense *lox-1* nas células de cevada. Os métodos para a expressão dos constructos antisense em cevada para reduzir a expressão de uma proteína-alvo foram descritos, por exemplo, em Gilpin, MJ *et al*, 1998, In: Photosynthesis: Mechanisms and Effects, G. Garab, ed., vol. IV, 2983-2986; Kjærulff *et al*, 1995, In: Photosynthesis: from Light to Biosphere. P. Mathis, Ed., Vol. II, 151-154.

As células de cevada podem ser transformadas com um constructo de expressão contendo uma sequência de ácido nucleico antisense. O constructo de expressão produz uma molécula de ARN antisense capaz de ligar especificamente a pelo menos uma porção de mRNA produzido a partir do gene *lox-1* tipo nativo, através do emparelhamento de bases complementares e capaz de disromper o splicing do pré-mRNA ou a tradução deste mRNA. Um promotor específico constitutivo ou de tecido/temporal, por exemplo, o promotor *lox-1* de cevada descrito acima, pode dirigir a expressão da sequência de ácidos nucleicos antisense.

Mutagénesse química. O produto mutagénico químico de azida de sódio (NaN_3) tem sido comumente usado para mutagénesse da cevada e é conhecido por induzir mutações estáveis na sequência de ADN (ácido desoxirribonucleico) do genoma de cevada (Olsen *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 90: 8.043-8.047). Outros agentes mutagénicos químicos, por exemplo, o etilmetanossulfonato (EMS), azidoglicerol (AG, 3-azido-1,2-propanodiol), metilnitrosuréia (MNU), e hidrazida maleica (MH) também pode ser usados para induzir mutações no ADN (Rank, J. *et al.* 1997, Mutat. Res. 390:121-7), tal como pode a radiação UV.

Tal como mostrado nos exemplos abaixo, os grãos das culturas de cevada (cv) Vintage e Caruso foram tratados com azida de sódio e propagadas por auto-fertilização até à 3^a geração (M3).

4. Identificação e Seleção de Cevada com Baixo Nível de Lipoxigenase

A identificação e seleção de plantas de cevada com atividade reduzida do isoenzima lipoxigenase nos grãos pode ser conseguida, por exemplo, por análise da atividade da lipoxigenase. Os ensaios enzimáticos podem ser usados para determinar a atividade das duas principais lipoxigenases conhecidas por estarem presentes quer nos grãos maduros ou germinantes, LOX-1 e LOX-2. Tais ensaios devem distinguir a atividade da LOX-1 da da LOX-2. Um ensaio seletivo de LOX-1 e LOX-2 é baseado na oxidação de um ácido gordo poli-insaturado pela lipoxigenase e deteção espectralométrica do produto hidroperóxido de tal oxidação. A especificidade deste ensaio para a LOX-1 aproveita a insensibilidade comparativa da LOX-1 a um inibidor, por exemplo, NDGA, em relação a LOX-2. O ensaio seletivo também pode ser conseguido usando imunoprecipitação para remover seletivamente a LOX-1 ou a LOX-2 do ensaio. Anticorpos específicos anti-LOX-1 e anti-LOX-2, por exemplo, anticorpos monoclonais, podem ser preparados a partir de LOX-1 ou LOX-2 purificadas, conforme descrito em Holtman et. al, 1996, Supra.

Estes métodos de ensaio podem ser adaptados aos procedimentos de ensaio em placas de microtitulação, ou outros formatos de ensaio conhecidos, repetitivos, de rendimento elevado, permitindo a avaliação rápida de muitas amostras. Estes ensaios podem ser validados para analisar pedaços de folha de grão germinante de um modo não-

destrutivo, de tal forma que as plântulas selecionadas na análise podem ser adicionalmente propagadas.

A perda de atividade da LOX-1 em mutantes putativos pode ser confirmada através de ensaio da atividade enzimática. Por exemplo, extratos de grão podem ser incubados com ácido linoléico e os produtos de oxidação do ácido linoleico analisados, por exemplo, por HPLC de fase inversa. As quantidades relativas de 9-HPOD e 13 -HPOD formados a partir do ácido linoléico fornecem uma medida da atividade LOX-1, cujo principal produto é o 9-HPOD.

Tal como mostrado nos exemplos abaixo, aproximadamente 20.000 grãos da geração M3 de cv Vintage e cv Caruso mutagenizados foram analisados relativamente à atividade LOX-1 e LOX-2 pelo ensaio de oxidação na presença de um inibidor e também por ensaios de imunoprecipitação. Usando esses métodos de análise, foi encontrado um mutante cv Vintage com uma grande redução na atividade LOX-1 e foi designado linha G. O fenótipo mutante foi herdado nas gerações M4 e M5.

As sementes produzidas a partir da cevada de Linhagem G foram depositadas em 4 de Janeiro de 2001 no National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB243RY, Escócia, Reino Unido, sob a termos do Tratado de Budapeste, com o número de Acesso: NCIMB 41078.

5. Sequências genéticas

Uma descrição precisa da alteração genotípica que contribui para o fenótipo de baixo nível de lipoxigenase nas plantas de cevada da invenção é útil para identificar plantas contendo esta alteração genética e para atravessar esse

caracter genético em outras culturas de cevada num programa de reprodução. Podem ser usados vários métodos conhecidos, moleculares e bioquímicos, para determinar a base genética para o fenótipo com baixo nível de lipoxigenase.

É geralmente reconhecido que ambas as sequências genéticas de ação *cis*- e ação *trans*- podem determinar a expressão de um determinado gene no genoma e a atividade do produto do gene. Os pontos de controlo da expressão genética incluem a regulação do tempo, especificidade do tecido e taxa de transcrição do gene, a estabilidade do transcrito e a taxa de tradução do transcrito. Tanto o nível da expressão génica como a estabilidade e atividade específica da enzima codificada irão determinar o nível de atividade enzimática detetada num tecido.

As alterações numa sequência genética de plantas podem ser determinadas por sequenciação de ADN de partes relevantes conhecidas do genoma, enquanto a análise Northern fornece uma ferramenta para monitorar os níveis de transcrito estável num determinado tecido da planta. A enzima expressa no tecido da planta pode ser avaliada através da extração da enzima a partir do tecido e da medição da atividade enzimática.

Como mostrado nos exemplos abaixo, a identidade das alterações genéticas que determinam o fenótipo de baixa-lipoxigenase da Linhagem G mutante induzido em cv Vintage foram determinadas da seguinte maneira. O gene estrutural que codifica para a proteína LOX-1, em ambos cv Vintage progenitor e na Linhagem G, foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e as foram sequenciadas sequências promotoras a montante, as quais regulam a

expressão do gene, assim como toda a sequência codificante, compreendendo sequências de intrão e exão.

A comparação das sequências de nucleótidos do gene *lox-1* da Linhagem G e do tipo nativo cv Vintage revelou 2 substituições de nucleótidos em dois exões, dos quais um (na posição + 2347) levou a uma substituição não conservadora de aminoácidos (Glicina 368 → Aspartato) na proteína expressa.

A Figura 22 mostra um alinhamento de lipoxigenases LOX1 de soja (Gm: *Glicina max* L) (Acc.N ° P08170), LOX2 (Acc. N ° P08170), LOX3 (Acc. No. AAB41272) e cevada (hv: *Hordeum vulgare*) lipoxigenases LOX1 (Acc.No. P2 9114) e LOX2 (Acc. No. AAB70865.1). Resíduos de aminoácidos conservados e substituições conservadoras de resíduos carregados são mostradas em negrito. Atribuições de estrutura secundária para a LOX3 de *Glicina max*, de soja onde H = hélices alfa e E = cadeias Beta, são apresentados acima do alinhamento, e os resíduos relevantes para a função enzimática (identificados por um asterisco ou círculo preenchido) são apresentados, como descrito na Skrzypczak-Jankun et.al., 1997, *Proteins* 29:15-31.

Resíduos de aminoácidos que participam em ferro não-heme ligado ou essencial para a catálise (*) em soja LOX3 incluem: H₅₁₈, H₅₂₃, H₇₀₉ [3 átomos de N]; N₇₁₃, I₈₄₇. Os resíduos equivalentes em cevada LOX 1 são H₅₁₇, H₅₂₂, H₇₀₈, N₇₁₂, e I₈₆₂. Resíduos em LOX3 de soja com um papel previsto em catálise (•) são: H₂₆₆, H₅₁₃, H₇₇₆, F₂₆₄, F₂₇₂, F₇₁₄, W₅₁₉, R₅₅₂, R₇₂₆, D₇₆₆, D₇₇₉, K₂₇₈. Os resíduos equivalentes em LOX1 de cevada são: H₂₆₁, H₅₁₂, H₇₇₅, F₂₅₉, F₂₆₇, F₇₁₃, W₅₁₈, R₅₅₁, R₇₂₅, D₇₇₈, e K₂₇₃.

Resíduos de Prolina (P₈₆, 109, 167, 171, 223, 234, 291, 311, 324, 343, 345, 371, 381, 382, 486, 541, 548, 600, 616, 627, 685, 726, 734, 788, 829, 833, 839, 857) e de Glicina (G₄₉, 67, 68, 70, 91, 107, 137, 187, 192, 210, 217, 218, 260, 306, 307, 336, 392, 409, 458, 474, 490, 569, 607, 674, 676, 720, 736, 783, 828, 850, 855) (+) localizados em loops e posições a cobrir a hélice em estruturas secundárias de proteínas, podem facilitar voltas e dobras angulosas no esqueleto peptídico.

O alinhamento de lipoxigenases de plantas relacionadas indicou que a Glicina-368 em LOX-1 de cevada é fortemente conservada. Adicionalmente, este resíduo, que corresponde a Glicina-353 em LOX-1 de soja 1, é um dos 35 resíduos altamente conservados de um total de 58 resíduos que alinham a cavidade II do substrato da enzima, tal como pode ser visto a partir da sua estrutura cristalina. Estes resíduos conservados são destacados (caixas) no alinhamento de sequências de lipoxigenase vegetal apresentadas na Figura 22 (Minor et.al., 1996, Bioquímica 35:10687-10701), e incluem os seguintes resíduos da LOX-1 de cevada: Y₂₂₄, L₂₆₈, W₃₅₅, E₃₆₄, G₃₆₈, V₃₆₉, N₃₇₀, I₃₇₄, L₄₂₄, L₄₉₉, K₅₀₁, A₅₀₂, V₅₀₄, D₅₀₈, S₅₀₉, H₅₁₂, Q₅₁₃, L₅₁₄, H₅₁₇, W₅₁₈, H₅₂₂, I₅₅₆, L₅₅₉, A₅₆₀, L₅₆₄, I₅₆₅, I₅₇₀, T₅₇₄, S₅₈₅, Q₇₁₅, Y₇₁₈, N₇₂₄, R₇₂₅, P₇₂₆, T₇₂₇, I₇₇₂ e I₈₆₂. Todos, menos 7 dos 35 resíduos conservados são neutros ou resíduos hidrófobos. A substituição de um resíduo carregado na posição da Glicina - 368 em cevada ou noutro alinhamento conservado de resíduos neutros ou hidrófobos na cavidade II do substrato, é provável que seja suscetível de perturbar as propriedades estruturais e funcionais da enzima. A G → D 368 na LOX1 da cevada de Linhagem G(♦) está localizada entre a hélice alfa H6 e a cadeia beta E12.

Tal como apresentado na Figura 22, a família lipoxigenase de enzimas partilha um grau elevado de conservação das

sequências, que se reflete na sua estrutura secundária conservada, determinada por vários membros da família de lipoxigenases vegetais, incluindo LOX1 e LOX3 de soja (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1997, *supra*). A LOX1 de cevada partilha 56,9% de identidade de sequências e 67,8% de semelhança de sequências com a LOX3 de soja. Vários resíduos de aminoácidos na isoenzima LOX3 de soja têm sido identificados como ligandos para o ferro não-heme, ou são sugeridos como sendo essenciais para a sua atividade (indicados com * •).

Tendo em vista a elevada conservação da sequência entre a LOX1 de cevada a LOX3 de soja, é razoável prever que os resíduos na sequência LOX1 da cevada que são homólogas aqueles identificados como sendo importantes para a função da LOX3 também podem ser essenciais para a atividade enzimática. Assim, as substituições não conservadoras de aminoácidos em qualquer uma destas posições, incluindo as substituições desses resíduos na LOX1 de cevada correspondentes aos 35 resíduos altamente conservados da LOX3 de soja que alinham na cavidade do substrato e em outras posições essenciais para a atividade enzimática, são susceptíveis de reduzir a atividade da lipoxigenase.

Os resíduos de aminoácidos prolina e glicina são conhecidos por facilitar as voltas num esqueleto peptídico quando são localizados entre os elementos estruturais secundários, que permitem que uma proteína assuma uma estrutura terciária dobrada. Os resíduos de prolina e glicina também são comuns em motivos de cobertura da hélice (Parker e Hefford, 1997, *Protein Eng*, 10:. 487-496, <http://www.expasy.ch>.) A única substituição não conservadora na LOX1 de Linhagem G, onde uma glicina localizada entre dois elementos estruturais previstos foi substituída por aspartato, levou a uma perda

significativa da atividade enzimática. É, portanto, previsto que a mutação no gene LOX-1 causando substituições não-conservadoras de aminoácidos em um ou mais dos resíduos de prolina ou glicina na LOX1 de cevada, localizados em regiões fora dos elementos estruturais poderão, igualmente, prevenir a dobragem da proteína nativa e, conseqüentemente, reduzir a atividade da enzima codificada.

Assim, numa forma de realização, uma planta de cevada mutante útil da invenção com atividade de lipoxigenase 1 reduzida contém uma sequência de ácido nucleico mutada que altera a natureza neutra ou hidrófoba da cavidade do substrato da enzima por inserção de um ou mais aminoácidos acídicos, básicos ou polares. A sequência de ácido nucleico útil [SEQ ID NO:11] codifica para uma proteína LOX-1 de cevada [SEQ ID NO: 12] contendo uma substituição no aminoácido 368 da Glicina para Xaa, em que Xaa é o ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, triptofano, asparagina ou glutamina. Uma sequência específica de aminoácidos da LOX-1 mutante de cevada da invenção é aquela em que o Xaa é ácido aspártico, por exemplo, Linhagem G.

Tal como demonstrado nos exemplos abaixo, as alterações genotípicas na Linhagem G não tiveram influência detetável na expressão do gene *lox-1*, mas a atividade da LOX-1 detetada em grãos maduros e em germinação da Linhagem G foi de aproximadamente 9% da detetada em grãos da linhagem parental, cv Vintage. A fim de fornecer evidências diretas de que a mutação de aminoácidos em LOX-1 da Linhagem G é responsável pelo fenótipo reduzido de LOX-1, a sequência de codificação do *lox-1* de Linhagem G e *lox-1* de cv Vintage foram expressas transitoriamente em protoplastos de aleurona de cevada e a atividade da enzima LOX-1 mutante

foi demonstrada como sendo fortemente reduzida quando em comparação com o tipo nativo da enzima LOX-1.

6. Transferência entre linhagens

A detecção de alterações no carácter genético das plantas de cevada do genótipo da invenção é útil para identificar a presença de um carácter genético específico numa linhagem de cevada e para facilitar a transferência deste carácter entre linhagens num programa de reprodução e melhoramento. Uma variedade de ferramentas moleculares estão disponíveis para a detecção de alterações na sequência genómica. Tais métodos incluem, mas não restringem a, detecção de polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (Gebhardt e Salamini 1992, *Int. Rev. Cytology*, 135: 201-237) e métodos de detecção baseados em PCR quantitativo, tais como a amplificação utilizando iniciadores fluorescentes, *p.ex.*, os sistemas de sonda iniciador TaqMan (Ibrahim *et al.*, 1998, *Anal. Chem* 70, 2013-2017). A escolha do método de detecção dependerá do carácter genético específico, mas deve preferencialmente ser rápido e fornecer dados claramente interpretáveis.

Tal como mostrado nos exemplos abaixo, o ensaio do Local Polimórfico Amplificado por clivagem com PCR (PCR-CAPS) foi fornecido para a detecção do gene lipoxigenase-1 mutante da Linhagem G. A substituição de nucleótidos no gene *lox-1* na Linhagem G na posição +2347 introduziu um local adicional de reconhecimento pela endonuclease de restrição AatII que pode ser detetado pelo ensaio PCR-CAPS. Os métodos de detecção adequados para o *lox-1* não se restringem a este ensaio, mas podem igualmente ser baseados na tecnologia TaqMan, e noutros métodos de detecção conhecidos.

Também é mostrado nos exemplos abaixo, o ensaio de PCR-CAPS foi aplicado a 4 gerações de material de reprodução e melhoramento de um programa de retrocruzamento, onde o fenótipo de lipoxigenase baixa na Linhagem G foi sistematicamente retrocruzado em cv Alexis. A herança do fenótipo baixa lipoxigenase foi demonstrada como seguindo a herança do gene *lox-1* e os fenótipos foram identificados como recessivos e vistos apenas em linhagens homozigóticas para o gene *lox-1*.

De um modo concordante, a progenia das plantas da invenção inclui linhagens de reprodução e melhoramento, por exemplo, derivadas de um programa de retrocruzamento, que contém o mutante *lox-1* e expressa um fenótipo de lipoxigenase baixa.

7. Fermentação da cerveja

As plantas de cevada da invenção, incluindo partes de plantas, a progenia de plantas, grãos e malte e mosto, tendo baixa atividade de lipoxigenase, são aqui demonstrados como sendo úteis para a produção de uma bebida alcoólica com níveis reduzidos de *trans*-2-nonenal livre durante um período de tempo medido, ou sob condições de elevada temperatura de armazenamento, em comparação com uma bebida controle, produzida a partir da variedade nativa de cevada. Para efeitos destas comparações, o conteúdo em sulfito da cerveja é controlado para 5ppm ou inferior, uma vez que é reconhecido que níveis elevados de sulfito no momento do engarrafamento vai temporariamente retardar o aparecimento de *trans*-2-nonenal livre. Por exemplo, a cerveja produzida a partir de malte derivado da cevada mutada de Linhagem G aqui descrita, possuía propriedades organoléticas estabilizadas durante um período de tempo medido, em comparação com cerveja produzida a partir de malte derivado de um controle, cevada não mutada.

Os ensaios de produção e avaliação de cerveja engarrafada fornecem o melhor método para avaliar a influência dos diferentes ingredientes na qualidade e estabilidade da cerveja terminada. A fim de testar a influência de maltes de cevada diferentes, foram necessários grãos de cevada suficientes para executar os ensaios de maltagem e produção da cerveja à escala piloto e à escala semi-industrial. Durante o período de propagação da cevada, o desempenho em campo da linhagem de cevada pode ser avaliado. As propriedades de maltagem da linhagem de cevada podem ser avaliadas durante a maltagem à escala piloto ou industrial e, de preferência enquadrarem-se nas recomendações de qualidade nacionais de maltagem, *p.ex.*, as recomendações da Convenção Europeia de Fabricação de Cerveja para a qualidade de maltagem (Analytica-EBC/European Brewing Convention, 1998, Publ. Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Alemanha). A seguir à produção à escala piloto ou semi-industrial, a cerveja é embalada em garrafas castanhas e arrefecida a 5° C para um armazenamento ideal. Nesta fase, a cerveja fresca pode ser analisada por painéis de degustação treinados, capazes de detetar sabores específicos de cerveja, incluindo o composto alterador do sabor *trans*-2-nonenal. Adicionalmente, a cerveja é analisada quimicamente no que diz respeito aos componentes principais do sabor, incluindo o alterador do sabor *trans*-2-nonenal. Estes métodos de análise da qualidade da cerveja são, então, repetidos nas condições seguintes de armazenamento diferentes da cerveja, conhecidas por revelar a estabilidade da cerveja no armazenamento a longo prazo, por exemplo, tratamentos de envelhecimento forçado.

Tal como mostrado nos exemplos abaixo, a cevada de Linhagem G foi propagada no campo ao longo de várias temporadas, a

fim de conseguir a maltagem de 10 toneladas desta linhagem numa fábrica de maltagem industrial. As variedades controlo da cevada cv Vintage e cv Nevada, ambas contendo a LOX-1 com fenótipo do tipo nativo, foram submetidas a maltagem sob condições semelhantes. O malte curado da Linhagem G e as culturas de cevada controlo estavam enquadrados nas especificações necessárias para os ensaios semi-industrial de produção de cerveja.

Os ensaios de produção de cerveja foram realizados à escala de 30 hl e a avaliação das cervejas recém engarrafadas, revelou que as cervejas produzidas a partir do malte de ambas Linhagem G e as culturas de controlo tinham um conteúdo em *trans*-2-nonenal abaixo do limiar de sabor e foram considerados satisfatórios por um painel de degustação. Dois tratamentos de envelhecimento forçado, quer por armazenamento a 37 ° C durante 7 dias ou armazenamento durante 6 a 12 semanas a 30° C, foram utilizados para avaliar a estabilidade do sabor da cerveja. O sabor e a estabilidade da cerveja produzida a partir do malte da Linhagem G foram considerados superiores aos do malte controlo, tanto no que diz respeito à avaliação pelo apinell de testes como ao nível do *trans*-2-nonenal livre e a melhoria foi estatisticamente significativa.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Triagem e seleção de Mutantes da Isoenzima Lipoxigenase de Cevada Mutada

1. Mutagénesse da cevada

Os grãos de cevada, *Hordeum vulgare* e cv Vintage e cv Caruso, foram mutados com azida de sódio de acordo com um procedimento publicado (Kleinhofs et al, 1978 Mutation

Research 51:.. 29-35). A mutagênese introduz mutações pontuais no ADN genómico que, por exemplo, pode resultar em alterações dos aminoácidos nas proteínas codificadas. Os grãos M1 mutados foram propagados na estufa através de duas gerações e os grãos M3 recolhidos para triagem. A frequência observada de mutantes com caracteres genéticos únicos na geração M2, de acordo com Kleinhofs *et al.*, 1978, *supra*, são 1,0-2,7 mutantes por 10.000 grãos da geração M2. Uma vez que a maioria das mutações genéticas são recessivas e apenas são detetáveis no estado homozigótico, a população mutada foi analisada na geração M3, onde a proporção esperada de grãos mutantes homozigóticos seria maior. A frequência de mutação de 0,9-2,3 por 10.000 grãos foi esperada no material mutado em M3.

2. Um ensaio não-destrutivo da atividade da lipoxigenase 1 (LOX-1) e lipoxigenase-2 (LOX-2) em grãos M3 mutados

Foi desenvolvido um procedimento rápido de rastreio para a detecção de grãos de cevada mutante com atividade reduzida da LOX-1 com os seguintes critérios: O procedimento de triagem não deve impedir a propagação dos grãos / plântulas; o tecido selecionado de grãos/plântulas deve expressar níveis quantificáveis da atividade da lipoxigenase; o ensaio deve distinguir a atividade da LOX-1 da atividade da LOX-2; e o procedimento do ensaio deve abranger várias amostras.

Os níveis de atividade total de lipoxigenase em tecidos diferentes do grão germinante, nomeadamente o rebento, a raiz e o tecido escutelo do embrião e o endosperma foram analisados da seguinte forma: Extratos de tecido de plântulas de cevada foram preparados por homogeneização do tecido em Tris-HCl gelado 20 mM, pH 7,5, contendo NaN₃ 2 mM e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,5 mM, seguida da

remoção do material insolúvel por centrifugação a 1000 g durante 10 minutos. A atividade da lipoxigenase em 100 µl de extrato foi testada a 25° C, por adição de 2,9 mL de substrato do ácido linoleico 20 mM, preparados por dispersão de 35 µl de ácido linoleico (ácido livre, L-1376, Sigma, EUA) em 5 mL de H₂O contendo Tween 20 1%. A reação foi acompanhada espectrofotometricamente, onde a taxa de aumento da absorvância a 234 nm (A_{234} nm), devida à formação de dienos conjugados no produto hidroperóxido, é proporcional à atividade da enzima presente. Uma unidade da atividade da lipoxigenase é definida como $\Delta A_{234} = 0,001$ por minuto numa reação de 3 mL, equivalente à oxidação de 0,12 µmol do ácido linoleico.

O tecido da folha de grãos germinados durante 4 dias no escuro teve os níveis detetados de atividade da lipoxigenase mais elevados (Holtman *et al*, 1996, Plant Physiology 111: 569-576). As pontas das folhas de plântulas com 4 dias foram, portanto, selecionadas para o ensaio não-destrutivo de rastreio da lipoxigenase. O pH ótimo para a atividade total da lipoxigenase na cevada foi testado entre pH 4,5 e pH 9,0 e verificado como sendo pH 6,5. Portanto, um tampão HEPES 25 mM (pH 6,5) contendo ácido bórico 0,2 M foi selecionado para o ensaio de triagem.

Uma vez que ambas as enzimas LOX-1 e LOX-2 foram imuno-detetadas em rebentos de plântulas com 4 dias (Holtman *et al*. 1996, *supra*), foi usado um ensaio específico da LOX-1 e LOX-2. O inibidor da lipoxigenase, ácido nordi-hidroguaiarético (NDGA), identificado por Eskin *et al*. 1977, Crit. Rev. Food, Science and Nutrition 9: 1-40, foi verificado como sendo um inibidor seletivo das lipoxigenases de cevada. O NDGA a 1×10^{-5} M inibe fortemente a LOX-2 purificada de cevada, enquanto a LOX-1 manteve 47%

da atividade (**Figura 1**). A seletividade deste inibidor foi testada no ensaio com a ponta da folha, por determinação da razão entre o 9-hidroperoxioctadecanóide (9-HPOD) e o 13-hidroperoxioctadecanóide (13-HPOD), que resultam da oxidação do ácido linoléico pela LOX-1 e pela LOX-2, respectivamente. No ensaio da lipoxigenase em pontas de folhas cv Vintage, a proporção de 13 HPOD formada caiu de 24,5% para 9,5% em adição ao 5 NDGA 1×10^{-5} M.

Um ensaio seletivo para a atividade da LOX-2 nos extratos de ponta de folha foi baseado no uso do anticorpo monoclonal específico para a LOX-1 (5D2) (Holtman *et al.*, 1996, *supra*) para a LOX-1 imunoprecipitada, presente nos extratos. A atividade da lipoxigenase residual detetada nos extratos após a precipitação da LOX-1 proporcionou uma medida da atividade da LOX-2. A eficiência desta imunoprecipitação (descrita abaixo) foi avaliada pela quantificação das LOX-1 e LOX-2 residuais no extrato sobrenadante por um ensaio ELISA, utilizando anticorpos monoclonais específicos contra a LOX-1 (denotado 5D2) e LOX-2 (denotado 5.8) (Holtman *et al.*, 1996, *supra*). A imunoprecipitação da LOX-1 a partir de extratos de pontas de folhas cv Vintage removeu 85% da proteína (LOX-1) e 15% da proteína LOX-2.

A imunoprecipitação foi realizada numa placa de 96 poços com fundo em V, adicionando 5 μ L de Dynabeads (Dynal) revestidas com 5D2 e 75 μ L de tampão [Tris-HCl 20 mM pH 7,5, Soro Bovino Fetal 1% v/v (HyClone)] para 20 μ L de cada extrato de ponta da folha. A placa foi incubada num agitador de placas de titulação (MTS4 IKA, Labor Technik) durante 1 hora, a 4° C. O imunoprecipitado foi sedimentado por centrifugação a 4° C numa centrífuga Sigma 302 K durante 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante (70 μ L) de

cada amostra foi analisado relativamente à atividade da lipoxigenase numa placa de 96 poços de fundo plano, tal como descrito abaixo, mas com a adição de 100 µL de tampão de ensaio (HEPES 25 mM, ácido bórico 0,2 M, pH 6,5).

Os ensaios LOX-1 e LOX-2 foram adaptados para um método de análise com alto rendimento. As pontas das folhas (1 cm) de 8 grãos com 4 dias de germinação foram individualmente homogeneizados em 150 µL de tampão gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) 2 x 30 segundos num homogeneizador multi-poços (Berg *et al*, 1992, Electrophoresis 13:76-81). Após a centrifugação durante 15 minutos a 3000 rpm, 40 µL do sobrenadante de cada extrato foi transferido para uma placa de 96 poços de fundo plano. A cada poço, foram adicionados 170 µL de tampão (HEPES 25 mM, ácido bórico 0,2 M e pH 6,5, NDGA 1×10^{-5}) e 10 µL de substrato (ácido linoleico 20 mM) e, em seguida, incubados durante 20 minutos a 25° C. A reação foi terminada pela adição de 20 µL solução de iodeto de potássio saturada (KI) e incubada durante mais 8 minutos a 25° C. A reação redox entre os hidroperoxidienos e KI origina I₂, que foi monitorizado pelo seu máximo de extinção a 350 nm num leitor de microplacas (Multiskan MCC/340).

3. Identificação de potenciais mutantes da lipoxigenase 1 nos grãos M3 e M4 de cevada mutada

Os grãos da geração M3 de cv Vintage e cv Caruso foram armazenados a 45° C durante 6,5 dias para quebrar a dormência, assegurando uma frequência de germinação de 95%. Os grãos M3 de cv Vintage (9318) e cv Caruso (9633) foram germinados e selecionados para as linhas cuja atividade da LOX-1 foi de 15% ou menos dos grãos do tipo nativo. As linhas mutantes putativas (50 linhagens cv Vintage e 42 linhagens cv Caruso) foram propagadas para a geração M4,

colhidas e os grãos germinados foram re-analisados. O fenótipo mutante LOX-1 foi confirmado numa linhagem cv Vintage e seis linhagens cv Caruso, após a medição da atividade da lipoxigenase em extratos de 5 pontas de folhas de cada linhagem. Quando as atividades LOX-1 e LOX-2 em embriões germinantes destas 7 mutantes putativas foram examinadas, apenas a mutante cv Vintage (denotada Linhagem G) mostrou uma redução significativa na LOX-1. Em grãos quiescentes maduros, a atividade da lipoxigenase presente no embrião é quase exclusivamente atividade LOX-1, devido ao padrão diferencial de expressão das duas isoenzimas (Schmitt e van Mechelen, 1997, Plant Sci. 128:. 141-150). A atividade de lipoxigenase total em extratos de embriões a partir de grãos secos maduros da linhagem G (geração M5) foi de $0,06 \pm 0,04$ U / mg de proteína, em comparação com $0,74 \pm 0,44$ U/mg de proteína em extratos de embrião cv Vintage, conforme determinado pelo ensaio espectrofotométrico da lipoxigenase, descrito na secção 2 do Exemplo 1. A atividade de lipoxigenase residual nos embriões maduros de Linhagem G em ambas as gerações M4 e M5 foi verificada como sendo aproximadamente 9% da linhagem progenitora.

Exemplo 2

A Linhagem G é uma Mutante cv Vintage com um Fenótipo de Baixa Lipoxigenase

As propriedades agronómicas e o fenótipo mutante da Linhagem G foram analisadas em material da geração M5. As análises iniciais foram conduzidas para confirmar que o material M5 analisado era homozigótico para o fenótipo mutante. O fenótipo LOX-1 reduzido na Linhagem G, detetado na geração M3, poderia resultar de uma mutação dominante ou recessiva. Se a linhagem G selecionada na geração M3 fosse heterozigótica para uma mutação dominante, então, as gerações subsequentes iriam apresentar segregação para o

fenótipo. A atividade da lipoxigenase em 26 embriões individuais de Linhagem G de grãos quiescentes da geração M5 foi medida e comparada com a de embriões cv Vintage do tipo nativo. A atividade de lipoxigenase em todos os embriões da Linhagem G foi muito reduzida, com uma média de $0,06 \pm 0,04$ U de lipoxigenase por mg de proteína, em comparação com $0,74 \pm 0,44$ U lipoxigenase por mg de proteína em embriões cv Vintage do tipo nativo. Estes dados confirmaram que a Linhagem G na geração M5 era homozigótica para a característica nível de lipoxigenase baixo.

1. A linhagem G tem uma fisiologia de crescimento da planta do tipo nativo e desenvolvimento dos grãos.

Os grãos da linhagem G e cv Vintage foram germinados e cultivados numa câmara climatizada sob 16 horas de luz a 15° C e 8 horas às escuras a 12° C e uma humidade relativa de 80%. As características de crescimento das plantas de Linhagem G e cv Vintage foram semelhantes em relação à altura da planta, número de rebentos por planta, o início do florescimento e o número de grãos por espiga. O peso fresco (**Figura 2**) e peso seco (**Figura 3**) dos grãos de Linhagem G e do tipo nativo cv Vintage durante o desenvolvimento de 5 dias após o florescimento (DAF) até a plena maturidade, aproximadamente 90 DAF, foram muito semelhantes.

2. Grão de Linhagem G têm um fenótipo de baixo nível de lipoxigenase ao longo do desenvolvimento

A atividade da lipoxigenase foi medida em extratos de grãos em desenvolvimento de cevada da Linhagem G (geração M5) e do tipo nativo cv Vintage. Os grãos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl gelado 20 mM, pH 7,5 contendo Nonidet P-40 0,1% (v/v), um detergente não iónico que aumenta a extração de lipoxigenase, e centrifugados a 15.000 g durante 20

minutos para remover o material insolúvel. A atividade da lipoxigenase nos extratos foi medida polarograficamente em 200 μ L de tampão saturado com oxigénio (ácido bórico 0,2 M, HEPES 25 mM, pH 6,5) contendo ácido linoleico 1,2 mM a 25° C, usando um elétrodo do tipo Clark para medir o consumo de oxigénio. A atividade da lipoxigenase aumentou durante os primeiros 20 dias do desenvolvimento dos grãos em ambos os grãos de Linhagem G e do tipo nativo, mas apenas na Linhagem G ocorreu a queda do nível de atividade durante a maturação dos grãos (**Figura 4**).

As quantidades relativas do 9-HPOD e do 13-HPOD formados durante a oxidação do ácido linoleico fornece uma medida dos níveis de atividade da LOX-1 e LOX-2 nos extratos dos grãos. Neste caso o Nonidet P-40 foi omitido do tampão de extração dos grãos para evitar a co-extração de enzimas consumidoras hidróperóxido. Os extratos (100 μ L), misturados com 10 mL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5 contendo 200 μ M de ácido linoléico, foram incubados durante 20 minutos. A reação foi terminada pelo ajuste do pH para 3,5 e por adição de um padrão interno. Os hidróperóxidos formados no ensaio foram ligados a uma coluna de fase sólida octadecilo (Bakerbond, Baker) e eluídos com metanol. O 9-HPOD e o 13-HPOD foram então separados por HPLC de fase inversa numa coluna C-18 com um solvente de eluição isocrático (tetraidrofurano:Metanol:H₂O:ácido acético; 25:30:44,9:0,1 (v/v) ajustado para pH 5,5 com amónia concentrada) a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/minuto, tal como descrito por Aarle *et al*, 1991, FEBS Letters 280:.. 159-162. Os hidróperóxidos foram detetados a 234 nm e os picos HPOD foram corrigidos contra o padrão interno, prostaglandina B2.

A **Figura 5** mostra que o 13-HPOD foi o principal produto da atividade da lipoxigenase presente nos grãos durante o primeiro 20 DAF, enquanto o 9-HPOD foi formado por lipoxigenases ativas durante a maturação dos grãos. Embora ambos os extratos de grãos da Linhagem G e do tipo nativo partilhem um perfil similar de atividade de síntese do 13-HPOD, a Linhagem G não evidenciou o aumento do tipo nativo na atividade de síntese do 9-HPOD. Estes dados são consistentes com uma perda de atividade da LOX-1 em grãos de cevada da Linhagem G em maturação.

3. Grãos de linhagem G têm um fenótipo de baixa-lipoxigenase na germinação

A atividade total da lipoxigenase em extratos de embriões de grãos germinados a 15° C foi testada como descrito no Exemplo 1. A atividade da lipoxigenase presente nos grãos do tipo nativo quiescentes diminuiu durante os primeiros 4 dias de germinação e depois aumentou (**Figura 6**). Na linhagem G, a atividade da lipoxigenase em grãos quiescentes foi muito baixa, mas aumentou após 4 dias.

A análise dos HPODs formados pela atividade de lipoxigenase em embriões germinantes mostrou que o 9-HPOD foi o principal produto de lipoxigenases presentes em grãos do tipo nativo, quiescentes (**Figura 7**). O nível de formação do 9-HPOD caiu com o declínio na atividade da lipoxigenase nos extratos. O aumento na atividade da lipoxigenase após 4 dias foi acompanhado da formação de ambos os 9-HPOD e o 13-HPOD. A atividade reduzida da lipoxigenase em grãos de Linhagem G quiescentes foi associado à ausência de formação do HPOD, enquanto o aumento na atividade depois de 4 dias, produziu principalmente o 13-HPOD. Estes dados fornecem evidências de que a atividade da LOX-1 que leva à formação do 9-HPOD é muito reduzida nos embriões de ambos os grãos

de cevada de Linhagem G em desenvolvimento, quiescentes e em germinação, enquanto a atividade da LOX-2 que leva à formação do 13-HPOD é inalterada na Linhagem G.

Exemplo 3

A linhagem G tem um Gene Mutante para a Lipoxigenase 1 (*lox-1*) Causando um Fenótipo com Lipoxigenase Baixa

A base molecular para o fenótipo com LOX-1 reduzida da Linhagem G foi investigada, a fim de fornecer uma descrição completa do mutante. As seguintes análises foram realizadas para fornecer uma caracterização completa do fenótipo:

1. A lipoxigenase-1 é sintetizada nos grãos da Linhagem G em desenvolvimento e em germinação

A análise de Western blot de extratos de embriões de grãos de cevada em desenvolvimento e germinação foi realizada em paralelo com a medição da atividade da lipoxigenase, tal como descrito no Exemplo 2. Os extratos brutos foram separados por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli, 1970, *Nature* 227:680-685. As proteínas separadas foram transferidas para nitrocelulose por *blotting* semi-seco, de acordo com Towbin *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 76: 4350-4354. O *blot* foi sujeito a uma sonda com o anticorpo monoclonal específico para a LOX-1, 5D2, tal como descrito por Holtman *et al.*, 1996, *Plant Physiology* 111: 569-576, numa diluição de 500x, seguido de incubação com anticorpo de cabra anti-rato acoplado a fosfatase alcalina e detetado com os substratos da fosfatase alcalina azul nitroso de tetrazólio e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, como descrito por Holtman *et al.*, 1996, *Plant Physiol.* 111: 569-576. As análises *Western* revelaram que a proteína LOX-1 foi detetada em grãos em desenvolvimento a partir de 10 DAF em embriões cv Vintage e nível aumentou durante a maturação

dos grãos (**Figura 8**). A proteína também estava presente no embrião de cv Vintage de grãos quiescentes, mas diminuiu lentamente durante a germinação (**Figura 9**). Apesar da LOX-1 ser reconhecida em extratos de embriões de Linhagem G e migrar no SDS-PAGE como uma proteína de tamanho semelhante à cv Vintage LOX-1, os níveis imunodetetáveis da proteína na Linhagem G foram ligeiramente menores do que em cv Vintage.

2. O gene *lox-1* é expresso nos grãos em desenvolvimento e germinativos da Linhagem G

O ARN total foi isolado a partir de embriões de grãos de cevada em desenvolvimento e germinação, de acordo com o procedimento de Hensgens e van Os-Ruygrok, 1989, Rice Genet. Newslett. 6: 163-168, em paralelo com a medição da atividade da lipoxigenase, descrita no Exemplo 2. As amostras de ARN (7,5 µg) foram separadas em geis de agarose desnaturantes e submetidas a *Northern blot*, como descrito por Sambrook *et al.*, 1989 em Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY. Os blots foram hibridados com uma sonda marcada com ³²P gerada a partir da região 3' não traduzida da cevada, os nucleótidos 2659-2801 [SEQ ID NO: 1], do cADN do *lox 1* (EMBL N° Acesso. L35931) tal como descrito por Holtman *et al.*, 1996 Physiol Plant. 111: 569-576, usando o *Amersham Random Prime Kit*.

As transcrições *Lox-1* que codificam para a LOX-1 foram detetadas em embriões de grãos em desenvolvimento e amadurecimento cv Vintage e de Linhagem G a partir de 30 DAF (**Figura 10**). O nível de transcritos do *lox-1* aumentou durante a germinação em ambos os embriões cv Vintage e Linhagem G, indicando a expressão *de novo* do gene *lox-1* (**Figura 11**). Como os níveis detetáveis de transcritos do

foram semelhantes nos embriões de Linhagem G e embriões cv Vintage, nem a transcrição reduzida do *lox-1* nem a estabilidade do transcrito podem ser responsáveis pelo fenótipo de baixa lipoxigenase da linhagem G.

3. O gene *lox-1* da Linhagem G codifica para uma forma mutante da lipoxigenase-1

As sequências de nucleótidos do gene *lox-1* da Linhagem G e Vintage cv foram analisadas e comparadas, a fim de determinar a base molecular para o fenótipo de baixa LOX-1 da Linhagem G, que se caracteriza por transcrição normal do gene *lox-1*, mas por uma acumulação e atividade reduzida da enzima lipoxigenase expressa nos grãos.

O ADN genómico de Linhagem G e do tipo nativo cv Vintage foi isolado a partir do tecido foliar de plântulas de acordo com um método descrito por Pitch e Schubert 1993, Nucleic Acids. Res 21: 3328. O gene *lox-1* nas preparações de ADN genómico foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores baseados na sequência do gene *lox-1* da cevada (van Mechelen *et al.* 1995, BBA 1254: 221-225; Rouster *et al.*, 1997, Plant J. 11: 513-523). A posição e a sequência dos oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar o promotor *lox-1* e as regiões codificantes, indicadas na **Figura 12** foram as seguintes:

Iniciador direto 5'-GAA AAG GGA CTT AGA CGC GGT TGC-3 '[SEQ ID NO: 2] e iniciador inverso 5'-TAT AGG CTT ATC GTT CTT GGC TCC CTC CTC TCG-3 '[SEQ ID NO: 3] foram usados para amplificar o domínio promotor *lox-1* por PCR (-361 a +68) do *lox-1* de Linhagem G e cv Vintage.

Iniciador direto 5'-ACT GAA TGT CAG GCT AAA GGT G-3 '[SEQ ID NO: 4] e iniciador inverso 5'-GGC ATT AAG AGC AAC TGC TGA-3 '[SEQ ID NO: 5] foram usados para amplificar por PCR a região codificante do *lox-1* da Linhagem G.

Iniciador direto 5'-CAA GAT GCA GCT GCT TAT GGG AG-3 '[SEQ ID NO: 6] e iniciador inverso 5'-TGG CGA TTT AAA TTA GAT GAT GGA GCT GT-3 '[SEQ ID NO: 7] amplificaram por PCR a região codificante do *lox-1* cv Vintage.

As reações de PCR consistiram em 250 ng de ADN genómico em 50 µL de volume contendo 50 pmol de iniciadores e 2 U Pfu de ADN polimerase (Promega) de acordo com as instruções dos fornecedores de enzimas. As amplificações por PCR foram realizadas num *Robocycler Stratagene*: 1 minuto a 94° C, 1 ciclo; 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 62° C e 5 minutos a 72° C, 30 ciclos; 10 minutos a 72° C, 1 ciclo. Os produtos da PCR foram separados em geis de agarose 1,2%. Os fragmentos de ADN, correspondentes em comprimento à região amplificada, foram purificados usando o kit de extração de Gel Qiax (Qiagen) e clonado no plasmídeo pcDNA2.1 (Invitrogen). A sequência de nucleótidos em ambas as cadeias do promotor *lox-1* clonado e regiões codificantes foi determinada usando a reação de terminação de cadeia didesoxinucleótido com iniciadores oligonucleótidos específicos e analisada num ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems). As comparações de sequência foram realizadas utilizando o pacote de software de análise de sequência DNA STAR (DNA STAR Inc., EUA).

A região promotora e a estrutura intrão-exão da região codificante do *lox-1* da cevada são apresentadas na **Figura 13**, e foram deduzidas a partir de uma comparação da sequência de nucleótidos do *lox-1* genómico do tipo nativo e

sequências de cADN (**Figura 12**). A região sequenciada da região promotora do *lox-1* de -363 a +68, (numeradas em relação ao local de início da transcrição; van Mechelen *et al*, 1995, BBA 1254:. 221-225), é suficiente para dirigir a expressão dos genes específica para os embriões e temporalmente regulada, característica do gene nativo (Rouster *et al*, 1998, Plant J 15: 435-440). O promotor e a região transcrita do tipo nativo do gene *lox-1* [SEQ ID NO: 8] é 4663 nt de comprimento e contém 6 intrões de entre 82 nt e 634 nt de comprimento, que estão ausentes do respectivo cADN [SEQ ID NO: 10] e devem, portanto, ser removidos durante o splicing do transcrito de ARN.

A comparação da sequência de nucleótidos do *lox-1* da Linhagem G com a do tipo nativo (**Figura 12**) mostrou que o alelo do *lox-1* da Linhagem G tem duas mutações pontuais. Uma delas é uma substituição silenciosa C → T na posição 221 no exão 1 e a segunda é uma substituição G → A na posição 2347 no exão 3 (**Figura 13**). O gene *lox-1* do tipo nativo de cevada codifica para uma proteína de 862 resíduos de ácido amino [SEQ ID NO: 9], enquanto que a mutação na posição 2347 no alelo do *lox-1* da Linhagem G causa a substituição de um aminoácido glicina por ácido aspártico no resíduo 368 da proteína codificada.

O alinhamento de lipoxigenases de plantas relacionadas indicou que a glicina-368 em LOX-1 de cevada é fortemente conservada. Além disso, este resíduo, que corresponde a glicina-353 na LOX-1 de soja, é um dos 51 resíduos neutros ou hidrófobos que se alinham na cavidade do substrato da enzima, como pode ser visto a partir de sua estrutura cristalina (Minor *et al.*, 1996, Biochemistry 35: 10.687-10.701) e é apresentado na (Figura 22). A inserção de um resíduo de ácidoamino carregado nesta posição é, portanto,

susceptível de perturbar as propriedades estruturais e funcionais da enzima.

4. A proteína LOX-1 mutante codificada pelo alelo *lox-1* de Linhagem G tem atividade enzimática baixa e é responsável pelo fenótipo de lipoxigenase baixa da linhagem G.

A mutagénese por azida de sódio de grãos cv Vintage, que induziu o alelo *lox-1* mutado na Linhagem G, pode ter induzido mutações adicionais no genoma da Linhagem G. Foram assumidas duas abordagens experimentais para demonstrar que o alelo *lox-1* mutante na linhagem G é responsável pelo seu fenótipo de lipoxigenase baixa, ao invés de outras mutações no genoma. A atividade enzimática da LOX-1 codificada pelo alelo *lox-1* mutante e do tipo nativo, foi determinada a fim de provar que a substituição glicina → ácido aspártico na enzima mutante provoca a redução da estabilidade e da atividade.

Os dois genes *lox-1* genes foram transitoriamente expressos em protoplastos de aleurona isolados a partir de grãos maduros embebidos, pois o nível de expressão da lipoxigenase endógena esperado nestas células era inferior aos limites de detecção. Nenhum dos genes identificados de lipoxigenase de cevada, que são expressos em cevada germinante, são detetados no tecido de aleurona (Van Mechelen *et al.*, 1999 *supra*). A fim de direcionar a expressão transitória do gene *lox-1* em protoplastos de aleurona, as suas regiões codificadoras foram traducionalmente fundidas com um promotor constitutivo conhecido por ser ativo nestes protoplastos.

As regiões de codificação do gene *lox-1* mutante (posições na sequência +1 a +4350) e do tipo nativo (posições na sequência +69 a +4230) e o cDNA do *lox-1* do tipo nativo

(posições na sequência +69 a +2654) cada um clonado no plasmídeo pcDNA2.1 (ver secção 3), foram excisadas por digestão dos locais KpnI e EcoRV num vetor poliligante. As regiões de codificação foram clonadas no plasmídeo pUBARN (Jensen *et al.*, 1998, Hereditas 129:. 215-225) entre o promotor Ubi de ubiquitina de milho constitutivamente ativo (tal como descrito na Patente dos EUA N° 005510474A) e do terminador Nos, no lugar do gene bar que codifica para a fosfinotricina acetil transferase **(Figura 14)**.

Os protoplastos foram isolados a partir do tecido de aleurona de *Hordeum vulgare* embebidos cv Himalaya de acordo com o protocolo de Skriver *et al.* 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88:7266-7270. As alíquotas de 2×10^5 protoplastos foram transfetadas a 0° C com ~100 µg de ADN plasmídico (quantidades equimolares de cada plasmídeo) por captação de ADN mediada por polietileno glicol (PEG) (Lee *et al.*, 1997, Plant Mol. Biol. 13: 21-29) e depois incubadas em meio de cultura de protoplastos de aleurona a 25° C e descrita anteriormente (Skriver *et al.*, 1991 supra). Após incubação durante 48 horas, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os protoplastos foram ressuspensos e homogeneizados em 300 µL de tampão de ensaio de lipoxigenase (ácido bórico 0,2 mM, HEPES 25 mM, pH 6,5). Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 **g** durante 5 minutos para sedimentar o material insolúvel e os sobrenadantes (10 µL) foram posteriormente analisados para a atividade total da lipoxigenase usando o teste rápido de rastreio descrito no Exemplo 1, secção 1, mas com omissão do inibidor NDGA. O conteúdo em proteína dos extratos de protoplastos foi medido por um ensaio de Bradford de ligação ao corante (Bradford 1976, Anal. Biochem, 72:. 248) fornecido pela Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia,

EUA e a atividade das lipoxigenases foi expressa por mg de proteína no extrato.

Os protoplastos transfetados com o plasmídeo de controle, pUBI-GUS, onde o promotor da ubiquitina-1 de milho dirige a expressão do gene repórter β -glucuronidase, não deu nenhuma atividade de lipoxigenase detetável. A expressão transitória do gene *lox-1* do tipo nativo e cADN em protoplastos deram ambos níveis elevados de atividade da lipoxigenase nos extratos de protoplastos (**Figura 15**). A expressão maior do cADN do tipo nativo do *lox-1* em comparação com a sequência genômica pode ser devida a uma frequência de transfecção maior para o plasmídeo de expressão do cADN do *lox-1* (4929 pb versus o constructo do gene *lox-1* de 6505 bp). A expressão transitória do gene mutante *lox-1* deu níveis baixos da atividade das lipoxigenases, ~ 10% da atividade de lipoxigenase do tipo nativo. Estes dados demonstram claramente que o gene *lox-1* mutante na Linhagem G codifica para uma lipoxigenase com atividade muito reduzida, o que contribui para o fenótipo de lipoxigenase baixa.

Exemplo 4

Ensaio do Local Polimórfico Amplificado por Clivagem-PCR (PCR-CAPS): Um Método Usado para Identificação do Gene *lox-1* Mutante

Um método analítico que permite a identificação do gene *lox-1* mutante da Linhagem G em qualquer base genética foi desenvolvido com base no ensaio de PCR-CAPS. O ensaio envolve a amplificação por PCR de fragmentos de ADN genômico, seguida por digestão das sequências amplificadas com uma endonuclease de restrição específica para expor um polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP).

A sequência de codificação do gene *lox-1* mutante abriga duas mutações pontuais (ver Exemplo 3), onde a mutação na posição 2347 (**Figura 12**) introduz um local de clivagem para a endonuclease de restrição Aat II, não encontrado no gene *lox-1* do tipo nativo (**Figura 16**). O ensaio de PCR-CAPS seguinte, com base no polimorfismo criado pela presença deste local de restrição no gene *lox-1*, mostra discriminar entre um gene *lox-1* do tipo nativo e um gene mutado *lox-1*.

O ADN genómico foi isolado a partir de folhas jovens de plântulas M6 de *Hordeum vulgare*, L. cv Vintage e Linhagem G de acordo com o procedimento de Pitch e Schubert (1993, supra). A sequência de ADN que engloba a posição 2347 (local de mutação do gene *lox-1* de Linhagem G) foi amplificada por PCR, utilizando iniciadores específicos para o gene *lox-1* [SEQ ID NO: 8]. Os fragmentos de ADN amplificado pelo iniciador direto selecionado 5'-CGCTACGACGTCTACAACGA-3' [SEQ ID NO: 13] e iniciador inverso 5'-CAGACTACTTTTTGGCGGGA-3' [SEQ ID NO: 14] são apresentados na **Figura 17**. As reações de PCR foram realizadas com 250 ng de ADN genómico num volume de 50 µL contendo 50 pmol de cada iniciador e 1 unidade de Taq ADN polimerase (Promega) de acordo com as instruções dos fornecedores. As amplificações por PCR foram realizadas num Robocycler Stratagene como se segue: 1 minuto a 94° C, 1 ciclo; 1 minuto a 94° C, 1,5 minutos a 60° C e 2 minutos a 72° C, 30 ciclos; 10 minutos a 72° C, 1 ciclo. Os fragmentos amplificados do mutante e do gene *lox-1* do tipo nativo foram ~ 650 pb (**Figura 18**), correspondendo ao tamanho esperado (**Figura 17**). Os produtos de PCR, purificados numa coluna de rotação (Qiagen), foram digeridos com 25 unidades de endonuclease de restrição Aat II durante 24 horas a 37° C e analisadas num gel de agarose 1,2%.

A digestão do *lox-1* do tipo nativo num produto PCR produziu fragmentos de ADN de 10, 179 e 462 pb e os fragmentos do produto da PCR mutante *lox-1* foram 10, 149, 179 e 313 pb, onde os fragmentos de ADN adicionais foram devidos à digestão parcial do produto *lox-1* da PCR (**Figura 19**). O padrão de fragmentos corresponde ao RFLP esperado resultante desta mutação, onde o fragmento de 313 pb é exclusivo para o mutante *lox-1*. Este ensaio PCR-CAPS proporciona uma ferramenta reprodutível e específica para a identificação do alelo *lox-1* em cevada e pode, assim, ser explorada em programas de reprodução e melhoramento da cevada, que visam introduzir este gene em variedades de cevada novas.

Exemplo 5

Retrocruzamento do Fenótipo de Lipoxigenase Baixa da Linhagem G com cv Alexis Demonstra uma ligação genética ao Gene *lox-1* Mutante

O retrocruzamento repetido foi usado para transferir o fenótipo de lipoxigenase baixa de linhagem G numa progenitora recorrente (neste caso, a cv Alexis). O programa de retrocruzamento apresentado na **Figura 20**, combinado com a seleção para o fenótipo de lipoxigenase baixa, progressivamente substitui o genoma da Linhagem G pelo genoma progenitor recorrente. Além disso, outras mutações introduzidas no genoma da Linhagem G durante o tratamento de mutagénese com azida de sódio serão eliminadas. No primeiro retrocruzamento da Linhagem G homozigótica para a lipoxigenase baixa (genótipo denotado ll) para cv Alexis (genótipo denotado LL) as linhagens de progenia serão heterozigóticas (genótipo denotado Ll). Um fenótipo de lipoxigenase baixa devido a uma mutação recessiva não será detetável em linhagens heterozigóticas

para a mutação. As progenias são auto-polinizáveis e dão origem a uma população mendeliana normal de segregação, nomeadamente, 1LL: 2 Ll: 1 ll. O genótipo homozigótico de baixa *lox ll* resultante do primeiro retrocruzamento dará origem a uma base genética de 50% cv Alexis. Depois de dez retrocruzamentos, a base progenitora recorrente será de aproximadamente 99,9%.

As *Hordeum vulgare*, L. cv Alexis e a Linhagem G foram propagadas numa estufa através do programa de retrocruzamento. Os grãos das progenias retrocruzadas foram germinados em placas de Petri com papéis de filtro embebidos em 4 mL de H₂O, durante 3 dias a 22° C no escuro. As linhagens de baixa-lipoxigenase foram triadas por medição da atividade total da lipoxigenase em extratos do coleóptilo (7 mm superiores) a partir das plântulas germinantes, como descrito no Exemplo 1. As progenias do 3° e 4° retrocruzamento também foram analisadas relativamente à herança do gene *lox-1* mutante utilizando o ensaio de PCR-CAPS descrito no Exemplo 4.

A frequência esperada do fenótipo de lipoxigenase baixa na progenia segregante das quatro gerações do retrocruzamento foi de 25% para uma mutação recessiva. A frequência observada da atividade da lipoxigenase baixa na progenia (24 grãos) das quatro gerações do retrocruzamento está de acordo com a frequência esperada (**Figura 20**). Quando a 3ª e a 4ª progenia do retrocruzamento contendo o genótipo homozigótico de baixa *lox ll* foram analisadas com o ensaio de PCR-CAPS, foram todos verificados como tendo o fragmento de diagnóstico com 313 pb, enquanto a progenia contendo a atividade de lipoxigenase do tipo nativo carecia deste fragmento (**Figura 21**).

O programa de retrocruzamento demonstra que o alelo *lox-1* mutante pode ser transferido para uma nova base genética de fundo e é herdado de forma recessiva monofatorial seguindo a segregação Mendeliana. Uma vez que o progenitor recorrente de base é 93,8% na 4ª progenia de retrocruzamento, a co-herança do gene *lox-1* mutante e o fenótipo de lipoxigenase baixa fornece a confirmação da sua ligação genética.

Exemplo 6

Cerveja fabricada a partir do Malte de Cevada da Linhagem G Acumula Menos *trans*-2-nonenal Durante o armazenamento, Originando uma Melhoria na Estabilidade do Sabor

As *Hordeum vulgare* L cv Vintage e Linhagem G foram propagadas no campo durante várias temporadas, a fim de fornecer grãos suficientes para maltagem industrial. A escala industrial seguinte e ensaios de produção de cerveja, bem como as análises da cerveja terminada foram realizados para demonstrar o valor da cevada de Linhagem G com lipoxigenase baixa para a melhoria na estabilidade do sabor.

1. Maltagem industrial e secagem da Linhagem G e cv Vintage

A maltagem foi realizada numa escala de 10 toneladas numa fábrica de maltagem, em dois ensaios como se segue:

Ensaio 1: Grãos de Cevada de Linhagem G (Colheita de 1996)

Condições de Maceração: 8 horas de imersão; 14 horas de secagem; 8 horas de imersão; 10 horas de secagem; 4 horas de imersão em água de maceração a 16° C. Condições de Maltagem: 12 horas a 18° C; 24 horas a 16° C; 24 horas a 14° C; 60 horas a 12° C. Condições de Secagem: 12 horas a 60° C; 3 horas a 68° C, 4 horas a 74° C; 3 horas a 80° C.

Ensaio 2: cv Vintage e Linhagem G (Colheita de 1996/1997)

Condições de Maceração: 8 horas de imersão; 10 horas de secagem; 6 horas de imersão; 15 horas de secagem; 4 horas de imersão em água de maceração a 15° C. Condições de Maltagem: 5 dias, com entrada de ar a 15° C e pulverização para manter o nível de humidade. Condições de Secagem: 10 horas a 50° C; 2 horas a 60° C, 2,5 horas a 80° C.

Análises de maltagem de 2 amostras do malte da Linhagem G do Ensaio 1 comparadas com as do malte de controlo, cv Nevada (Tabela 1) e do Ensaio 2 comparadas com as da cv Vintage (Tabela 2) confirmaram que o malte da Linhagem G é adequado para ensaios de produção de cerveja.

TABELA 1

ENSAIO DE MALTAGEM 1				
Variedade de Cevada		Cv Nevada	Linhagem G	Linhagem G
Ano da Colheita		1996	1996	1996
Análises do Malte				
Conteúdo em humidade	%	4,7	4,3	4,4
Extrato fino	%ai.	76,9	76,1	75,3
Extrato fino d.m.	%dm.	81,4	79,5	78,7
Tempo de sacarificação	Min	<10	<10	<10
Pó diastático	%WK	252	373	365
Cor	EBC	2,8	4,4	3,8
pH		6,16	5,97	5,99
Turbidez	EBC	9,0	2,5	2,4
Proteína total d.m.	%	10,35	10,74	12,03
Azoto solúvel	Mg/L	647	787	765
Sol. Proteína % malte d.m.	%d.m.	3,7	4,4	4,3
Kolbach		35,3	40,8	35,4
Azoto aminado Livre	Mg/L	97	125	118
Friabilidade	%	89,5	85,6	89,5
Grãos não modificados inteiros	%	1,1	0,6	0,5
Grãos não modificados parciais	%	2,3	1,0	0,6
β -glucana em mosto	mg/L	114	66	36
β -glucana em malte	% p/p	0,24	0,11	0,05
S-metilmetionina/DMS eq.	μ g/g	2,4	6,4	8,4
DMS livre	μ g/g	1,0	6,6	4,7
NDMA	μ g/kg	n.d.	0,3/0,6	0,3/0,3

TABELA 2

ENSAIO DE MALTAGEM 2				
Variedade de Cevada		Vintage	Linhagem G	Linhagem G
Ano da Colheita		1996	1996	1996
Conteúdo em humidade	%	4,1	4,1	4,3
Extrato fino	%ai.	77,0	75,6	77,5
Extrato fino d.m.	%dm.	80,3	78,8	80,9
Diferença fino/grosseiro	%dm.	0,7	1,6	1,7
Tempo de sacarificação	min	-	-	<10
Pó diastático	%WK	343	342	268
Cor	EBC	2,5	2,8	3,4
pH		6,05	6,01	6,12
Turbidez	EBC	1,5	1,3	2,5
Proteína total d.m.	%	10,98	12,22	9,82
Azoto solúvel	mg/L	696	741	610
Sol. Proteína % malte d.m.	%d.m.	3,9	4,1	3,4
Kolbach		35,2	33,7	34,6
Azoto aminado Livre	mg/L	110	117	100
Friabilidade	%	91,3	81,8	89,5
Grãos não modificados inteiros	%	0,7	1,1	1,3
Grãos não modificados parciais	%	1,0	2,7	2,7
β -glucana em mosto	mg/L	97	172	117
β -glucana em malte	% p/p	-	-	0,3
S-metilmetionina/DMS eq.	μ g/g	-	-	-
DMS livre	μ g/g	-	-	-

2. Produção de cerveja industrial com malte de Linhagem G, cv Vintage, e malte de controlo cv Nevada

Dois ensaios de produção de cerveja foram realizados, usando mosto preparado a partir da Linhagem G e malte de controlo cv Nevada no Ensaio 1 e malte controlo cv Vintage no Ensaio 2.

A cerveja foi fabricada à escala industrial 30 hl com 475 kg de malte de acordo com o seguinte esquema: Empastagem a 50° C; 30 minutos a 50° C; 30 minutos de aquecimento 50-70° C; 15 minutos a 70° C. Uma parte do mosto foi aquecida durante 20 minutos de 7-10° C e 5 minutos a 100° C, enquanto a pasta principal foi mantida a 70° C durante mais 25 minutos e então as duas pastas foram combinadas e

mantidas durante 10 minutos a 76° C. As etapas de produção de fermentação do mosto, separação do grão gasto, arrefecimento, fermentação, fermentação baixa e enbalagem em garrafas de vidro castanhas foram de acordo com as práticas correntes na produção de cerveja.

3. Estabilidade de sabor e conteúdo T2N de cerveja produzida a partir da linha G, malte de cv Vintage e malte controlo cv Nevada

A cerveja acabada de engarrafar foi armazenada a 5° C e analisada dentro de 2 meses após produção. A estabilidade do sabor da cerveja fresca e armazenada foi avaliada em dois laboratórios independentes após dois tipos diferentes de condições de armazenamento da cerveja. No laboratório A, a cerveja foi submetida a um processo de envelhecimento forçado, onde a cerveja era armazenada a 37° C durante um período de 7 dias, enquanto que no laboratório B a cerveja foi armazenada a 30° C durante 6 e 12 semanas. Os níveis do Trans-2-nonenal na cerveja foram determinados por cromatografia gasosa e deteção por espectrometria de massa após derivatização de carbonilos com O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-hidroxilamina, essencialmente tal como descrito por Grönqvist *et al.* 1993 Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo, 421-428. Um painel treinado para degustação de cerveja avaliou a pontuação geral do sabor da cerveja, que incluiu a deteção de um sabor a papelão, indicativo de *trans*-2-nonenal livre na cerveja.

Laboratório A: Tolerância ao Envelhecimento Forçado

A comparação de cerveja, fabricada a partir do malte de linhagem G e do malte de controlo, cv Nevada, no primeiro ensaio de produção de cerveja (**Tabela 3**) demonstrou que a cerveja da linha G teve uma maior estabilidade no sabor e um menor conteúdo em *trans*-2-nonenal a seguir a um

envelhecimento forçado, quando comparado com os controles. O segundo ensaio, comparando cerveja fabricada a partir do malte de linha G com cerveja produzida a partir de malte cv Vintage, das culturas parentais, confirmou os dados iniciais (Tabela 4).

TABELA 3

ENSAIO DE FERMENTAÇÃO 1		
Malte da cevada	Cv Nevada	Linhagem G
Conteúdo em SO ₂ (mg/mL)	1	1
T2N** (ppb) - Cerveja Fresca	0,009	0,005
T2N** (ppb) - Cerveja envelhecida (37 °C/7 dias)	0,117	0,025
Sabor* - Cerveja fresca	5,9	5,3
Sabor* - Cerveja envelhecida (37 °C/7 dias)	1,3	5,1
*Escala de avaliação do sabor 1-10 de qualidade crescente; ** <i>trans</i> -2-nonenal.		

TABELA 4

ENSAIO DE FERMENTAÇÃO 2		
Malte da cevada	Cv Vintage	Linhagem G
Conteúdo em SO ₂ (mg/mL)	2	2,5
T2N** (ppb) - Cerveja Fresca	0,023	0,019
T2N** (ppb) - Cerveja envelhecida (37 °C/7 dias)	2,9	5,9
Sabor* - Cerveja fresca	5,5	6,1
Sabor* - Cerveja envelhecida (37 °C/7 dias)	2,9	5,9
*Escala de avaliação do sabor 1-10 de qualidade crescente; ** <i>trans</i> -2-nonenal.		

Laboratório B: Tolerância ao armazenamento a 30° C

A cerveja produzida a partir de malte de linha G teve níveis inferiores de *trans*-2-nonenal, após 6 e 12 semanas, à temperatura elevada de armazenamento de 30° C, quando comparada com a cerveja produzida a partir de qualquer um dos maltes de referência (Tabela 5 e 6) e teve uma estabilidade do sabor melhor, de acordo com a opinião de um painel de degustação. O limiar do sabor para o *trans*-2-nonenal nestas cervejas analisadas está perto de 0,08 ppb.

TABELA 5

ENSAIO DE FERMENTAÇÃO 1		
Malte de Cevada	Cv Nevada	Linhagem G
<i>Trans</i> -2-nonenal (ppb) - Cerveja fresca	0,050	0,044
<i>Trans</i> -2-nonenal (ppb) - 30 °C/6 semanas	0,072	0,037
<i>Trans</i> -2-nonenal (ppb) - 30 °C/12 semanas	0,095	0,046
Sabor a <i>Trans</i> -2-nonenal* - Cerveja fresca	0,6	0,3
Sabor a <i>Trans</i> -2-nonenal* - 30 °C/6 semanas	3,7	1,4
Sabor a <i>Trans</i> -2-nonenal* - 30 °C/12 semanas	2,5	0,6
*Classificação da detecção do sabor a <i>trans</i> -2-nonenal numa escala de 1-10		

TABELA 6

ENSAIO DE FERMENTAÇÃO 2		
Malte de Cevada	Cv Vintage	Linhagem G
<i>Trans</i> -2-nonenal (ppb) - Cerveja fresca	0,070	0,062
<i>Trans</i> -2-nonenal (ppb) - 30 °C/6 semanas	0,093	0,070
<i>Trans</i> -2-nonenal (ppb) - 30 °C/12 semanas	0,133	0,080
Sabor a <i>Trans</i> -2-nonenal* - Cerveja fresca	0,3	0,9
Sabor a <i>Trans</i> -2-nonenal* - 30 °C/6 semanas	2,5	1,7
Sabor a <i>Trans</i> -2-nonenal* - 30 °C/12 semanas	2,2	1,3
*Classificação da detecção do sabor a <i>trans</i> -2-nonenal numa escala de 1-10		

A estabilidade do sabor melhorada da cerveja produzida a partir do malte de linhagem G, tal como medida pelos níveis de *trans*-2-nonenal detetado no armazenamento seguinte da cerveja a 30° C a partir dos dados combinados do ensaio de produção de cerveja, demonstra ser estatisticamente significativa (Tabela 7).

TABELA 7

TRANS-2-NONENAL NA CERVEJA ARMAZENADA					
fresca	Média	Desvio Padrão	Diferença	P 2 caudas	Significante (p<0,05)
Referência	0,060	0,012	0,007	0,34	Não
Linhagem G	0,053	0,011			
6 semanas, 30 °C	Média	Desvio Padrão	Diferença	P 2 caudas	Significante (p<0,05)
Referência	0,083	0,013	0,029	0,031	sim
Linhagem G	0,054	0,021			
12 semanas, 30 °C	Média	Desvio Padrão	Diferença	P 2 caudas	Significante (p<0,05)
Referência	0,114	0,023	0,051	0,003	sim
Linhagem G	0,063	0,020			

Uma vez que os níveis naturais de sulfito eram baixos em ambos os ensaios de produção de cerveja, os níveis do *trans*-2-nonenal livre na cerveja envelhecida refletiriam bem o potencial do *trans*-2-nonenal das diferentes cervejas, nomeadamente o nível de aductos do *trans*-2-nonenal presentes na cerveja fresca. A adição de sulfito pode temporariamente retardar o processo de formação do travo a oxidação, ao complexar-se com o *trans*-2-nonenal livre, até os níveis de sulfito serem eduzidos por oxidação devido à troca de gases através da embalagem.

Os ensaios descritos de produção de cerveja com baixo teor em LOX-1 de malte de cevada fornecem a primeira evidência inequívoca de que a atividade da LOX-1 em cevada durante o processo de maltagem e de produção de cerveja é um fator determinante da aparência do composto alterador do sabor *trans*-2-nonenal em cerveja envelhecida.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Douma, Anneke

Doderer, Albert

Cameron-Mills, Verena

Skadhauge, Birgitte

Bech, Lene

<120> CEVADA COM NÍVEL BAIXO DE LIPOXIGENASE 1

<130> 11225.12wo01

<160> 18

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 143

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 1

ctaagccatc ggcaaccatg gatgaataaa gggcggttcgc cacgtacgaa acttgtcgag	60
agattgggtgt agtgtgtgtc tgtgacagta ctatgtcagc agttgctctt taagccgaat	120
aaataaagca gatttgcttc caa	143

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 2

gaaaagcttg gaggtagacg ctgc	24
----------------------------	----

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 3

tataggatcc ttgttcttgg cctcctctcc tcg 33

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 4

agtgaaaaac agtgtgctgg tg 22

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 5

ggcttaaaga gcaactgctg a 21

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 6

caagatgcat atgctgctgg gag 23

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 7

cgatggttta aattagatgg agatgctgt 29

<210> 8

<211> 4663

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 8

cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg	60
atgggcgatc acccggtcacg ggaccggagc gcgccatgcg aagcacgagg agggcacgtc	120
accgtccgcg cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga	180
gcgccacacc accgggaccg gaccgggacc ggccataaaa ttgcccggac cgagctgcaa	240
gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag	300
tgtgctggtg ccattggttg gagcagtga agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc	360
tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccgg ctcaaggga	420
cgggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg	480
acggcatcgg cgagtccctc ggcaaggggc tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccc	540
tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ctttctcctc tgtttacaag atatagtatt	600
tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat	660
aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcataatgcc atcgaaaaaa	720
gagacaacag catgcatgca tggcgcgcg accagaccac gcagagcacc ggatgctcga	780
gacaaagcaa cacaacaagc aaggacgaca cgtcaaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg	840
cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaaaga cgtaagagca agcacacaat	900
cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa	960
gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc	1020
agggtagctg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtagc	1080
tgggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc tggagcagtg	1140
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtcctaag ttcggcctca ctttcgactg	1200
ggaggtggag aagctcgggg tgccgggcg catcgctcgtc aacaactacc acagctccga	1260
gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt	1320
cgtcgcaaac tcatggatct accccggcgc caactaccga tacagccgcg tcttcttcgc	1380
caacgacgtg cgtggatttt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca	1440

ttcatggtcg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca	1500
cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga	1560
tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat	1620
aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt	1680
ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaaacgatt aaattaagca	1740
taaaaagaaa agggaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt	1800
agatatgcaa tttttatctt acatctaaac ctttcttcac tcttaaatat aagacatttg	1860
taagatttca ctatggacaa catacgaaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt	1920
atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca	1980
taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga	2040
tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgcgt ggcgacgacc	2100
agcagggccc gtaccaggag cagcaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg	2160
gcgagggccg ccccatcctc ggcggcaact ccgaccacc ttacccgcgc cgcggccgca	2220
cggagcgcaa gcccacgcc agcgaccgga gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc	2280
agatctacgt gccgcgggac gagaagttcg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct	2340
actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca	2400
cccccgcgga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcattcaagc	2460
tgcccaaggt ggccgcctcg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg	2520
acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg	2580
agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggagggtgctc gccggcgctca	2640
acccggtcat gatcacgcgt ctcacggtga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta	2700
tggtgtccat ggtgagaaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct	2760
gcatgcatgc aggagttccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac	2820
accagcacca tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag	2880
gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta	2940
gataatttgg cttcgttgca attaatgtga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt	3000
tgaaatttgc aggcgtgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc	3060
atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cacgaggacc	3120
ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc	3180
atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggt gccagcggc	3240
tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg	3300
tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacgtt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga	3360

```

tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420
gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa 3480
gctgctgagc ccgcactacc gcgacaccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540
catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccg ggcaagtctg cgttggggat 3600
gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660
caagaggtag gtacctggta aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720
ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggaccc gtcgagcccg 3780
tacaaggtag ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgc cggacgggct ggcgatctgg 3840
cacgccattg agcagtagct gagcagtagc ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900
ctgcagggcg atacggaggt gcaggcgtgg tggaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960
gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020
tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgc cagtcaactt cgggcagtag 4080
ccctacgcgc ggttcctccc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc 4140
ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc gggccttcat ccacaccatc 4200
acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260
tccgacgagc tgtacctcgc gcagcgggac acgccggagt ggacctcgga cccaaaggcc 4320
ctggagggtg tcaagcgggt cagcgaccgc ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc 4380
atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgc ctaagtttcc ctacatgctg 4440
ctctaccca acacctccga ccacaaggcc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500
cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560
gccacgtacg aaacttgctg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca 4620
gcagttgctc ttttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

```

<210> 9

<211> 862

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 9

```

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

```

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

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

acccgagcct	ggagagccgg	ctgtcgctgc	tggagcagat	ctacgtgccg	cgggacgaga	840
agttcggcca	cctcaagacg	tccgacttcc	tgggctactc	catcaaggcc	atcacgcagg	900
gcatectgcc	ggccgtgcgc	acctacgtgg	acaccacccc	cggcgagttc	gactccttcc	960
aggacatcat	caacctctat	gagggcggca	tcaagctgcc	caaggtggcc	gccctggagg	1020
agctccgtaa	gcagttcccg	ctccagctca	tcaaggacct	cctccccgtc	ggcggcgact	1080
ccctgcttaa	gctccccgtg	ccccacatca	tccaggagaa	caagcaggcg	tggaggaccg	1140
acgaggagtt	cgcacgggag	gtgctcgccg	gcgtcaaccc	ggtcagatc	acgcgtctca	1200
cggagttccc	gccaaaaagt	agtctggacc	ctagcaagtt	tggtgaccac	accagcacca	1260
tcacggcgga	gcacatagag	aagaacctcg	agggcctcac	ggtgcagcag	gcgtggaaa	1320
gcaacaggct	gtacatcctt	gataccatg	accggttcct	gccgttcctg	atcgacgtca	1380
acaacctgcc	cggcaacttc	atctacgcc	caggagacct	cttcttcctg	cgcggcgacg	1440
gcaggctcac	gccgctcgcc	atcgagctga	gcgagcccat	catccagggc	ggccttacca	1500
cggccaagag	caaggtttac	acgccggtgc	ccagcggtc	cgtcgaaggc	tgggtgtggg	1560
agctcgccaa	ggcctacgtc	gccgtcaatg	actccgggtg	gcaccagctc	gtcagccact	1620
ggctgaacac	tcacgcggtg	atggagccgt	tcgtgatctc	gacgaaccgg	caccttagcg	1680
tgacgcaccc	ggtgcacaag	ctgctgagcc	cgcactaccg	cgacaccatg	accatcaacg	1740
cgctggcgcg	gcagacgctc	atcaacgccg	gcggcatctt	cgagatgacg	gtgttcccgg	1800
gcaagttcgc	gttggggatg	tcggccgtgg	tgtacaagga	ctggaagttc	accgagcagg	1860
gactgccgga	cgatctcatc	aagaggggca	tggcggtgga	ggacccgtcg	agcccgtaca	1920
aggtgcggtt	gctggtgtcg	gactaccctg	acgcggcgga	cgggctggcg	atctggcacg	1980
ccattgagca	gtacgtgagc	gagtacctgg	ccatctacta	cccgaacgac	ggcgtgctgc	2040
agggcgatac	ggagggtgag	gcgtggtgga	aggagacgcg	cgaggtcggg	cacggcgacc	2100
tcaaggacgc	cccattggtg	cccaagatgc	aaagtgtgcc	ggagctggcc	aaggcgtgca	2160
ccaccatcat	ctggatcggg	tcggcgctgc	atgcggcagt	caacttcggg	cagtaccctt	2220
acgcgggggtt	cctcccgaac	cggccgacgg	tgagccggcg	ccgcatgccg	gagcccgga	2280
cggaggagta	cgcggagctg	gagcgcgacc	cggagcgggc	cttcatccac	accatcacga	2340
gccagatcca	gaccatcatc	ggcgtgtcgc	tgctggagggt	gctgtcgaag	cactcctccg	2400
acgagctgta	cctcgggcag	cgggacacgc	cggagtggac	ctcggaccca	aaggccctgg	2460
aggtgttcaa	gcggttcagc	gaccggctgg	tggagatcga	gagcaagggtg	gtgggcatga	2520
accatgaccc	ggagctcaag	aaccgcaacg	gcccggctaa	gtttccctac	atgctgctct	2580
acccaacac	ctccgaccac	aagggcgccg	ctgccgggct	taccgccaag	ggcatcccca	2640
acagcatctc	catctaattt	aagccatcgg	caaccatgga	tgaataaagg	gcgttcgcca	2700

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

<210> 11

<211> 4663

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<220>

<221> variação

<222> (2346)..(2348)

<223> "n" é a, c, t, ou g que codifica para um aminoácido
 acídico, básico ou polar

<400> 11

cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60
 atgggcatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgca aagcacgagg agggcacgctc 120
 accgtccgag cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180
 gcgccacacc accgggaccg gaccgggacc ggcctataaa ttgcccggac cgagctgcaa 240
 gcagctcttc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300
 tgtgctggtg ccattggttg gagcagtga aagcaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360
 tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg ggccgaacaa gagcgcccg ctcaagggca 420
 cgggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480
 acggcatcgg cgagttcttc ggcaagggtg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccg 540
 tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ccttctcttc tgtttacaag atatatgtatt 600
 tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660
 aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcataatgcc atcgaaaaaa 720
 gagacaacag catgcatgca tggcgcgcgc accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780
 gacaaagcaa cacaacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840
 cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat 900
 cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960
 gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cggtgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020
 agggtagctg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtacg 1080

tggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc tggagcagtg	1140
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg	1200
ggaggtggag aagctcgggg tgccgggctc catcgctcgc aacaactacc acagctccga	1260
gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt	1320
cgtcgccaac tcatggatct accccgccgc caactaccga tacagccgcg tcttcttcgc	1380
caacgacgtg cgtggatttt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca	1440
ttcatggtcg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca	1500
cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga	1560
tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat	1620
aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt	1680
ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaacgatt aaattaagca	1740
taaaaagaaa aggaaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt	1800
agatatgcaa tatttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaataa aagacatttg	1860
taagatttca ctatggacaa catacgaaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt	1920
atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatattt gcaacggagg gagtaaaaca	1980
taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga	2040
tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgcgt ggcgacgacc	2100
agcagggccc gtaccaggag cacgaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg	2160
gcgagggccg ccccatcctc ggccggcaact ccgaccacc ttaccgcgc cgcgcccgca	2220
cggagcgcaa gcccaacgcc agcgaccgga gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc	2280
agatctacgt gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct	2340
actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca	2400
cccccgga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcataagc	2460
tgcccaaggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg	2520
acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg	2580
agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggaggtgctc gccnnngtca	2640
accggtcat gatcacgcgt ctacaggtga gtcagcgatt attgttcat tgttgtgtga	2700
tggtgtccat ggtgagaaa tgacagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct	2760
gcatgcatgc aggagtcccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac	2820
accagacca tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag	2880
gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta	2940
gataatttgg cttcgttgca attaatattga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt	3000

```

tgaaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccgggttc 3060
atgccggttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc caccaggacc 3120
ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc 3180
atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggt gcccagcggc 3240
tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg 3300
tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacgtt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga 3360
tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420
gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa 3480
gctgctgagc ccgcactacc gcgacaccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540
catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccc ggcaagtctg cgttggggat 3600
gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660
caagaggtac gtacctggt aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720
ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggaccc gtcgagccc 3780
tacaaggtgc ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg 3840
cacgccattg agcagtacgt gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900
ctgcagggcg atacggaggt gcaggcgtgg tggaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960
gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020
tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtac 4080
ccctacgcgg ggttcctccc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc 4140
ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc gggccttcat ccacaccatc 4200
acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260
tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgccggagt ggacctcga cccaaaggcc 4320
ctggaggtgt tcaagcggtt cagcgaccgg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc 4380
atgaaccatg acccgagct caagaaccgc aacggcccgg ctaagtttcc ctacatgctg 4440
ctctaccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500
cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcggtc 4560
gccacgtacg aaacttgctg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca 4620
gcagttgctc tttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

```

<210> 12

<211> 862

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare*

<220>

<221> variação

<222> (368)..(368)

<223> "Xaa" é um aminoácido acídico, básico ou polar

<400> 12

```

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

```


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

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 13

cgctacgacg tctacaacga 20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 14

cagactactt tttggcggga 20

<210> 15

<211> 839

<212> PRT

<213> Glicina max

<400> 15

```

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

```

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

```

545                      550                      555                      560
Lys Tyr Ser Val Glu Met Ser Ser Ala Val Tyr Lys Asn Trp Val Phe
565                      570                      575
Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly Val Ala Ile
580                      585                      590
Lys Asp Pro Ser Thr Pro His Gly Val Arg Leu Leu Ile Glu Asp Tyr
595                      600                      605
Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Glu Ile Trp Ala Ala Ile Lys Thr Trp
610                      615                      620
Val Gln Glu Tyr Val Pro Leu Tyr Tyr Ala Arg Asp Asp Asp Val Lys
625                      630                      635
Asn Asp Ser Glu Leu Gln His Trp Trp Lys Glu Ala Val Glu Lys Gly
645                      650                      655
His Gly Asp Leu Lys Asp Lys Pro Trp Trp Pro Lys Leu Gln Thr Leu
660                      665                      670
Glu Asp Leu Val Glu Val Cys Leu Ile Ile Ile Trp Ile Ala Ser Ala
675                      680                      685
Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Gly Gly Leu Ile
690                      695                      700
Met Asn Arg Pro Thr Ala Ser Arg Arg Leu Leu Pro Glu Lys Gly Thr
705                      710                      715                      720
Pro Glu Tyr Glu Glu Met Ile Asn Asn His Glu Lys Ala Tyr Leu Arg
725                      730                      735
Thr Ile Thr Ser Lys Leu Pro Thr Leu Ile Ser Leu Ser Val Ile Glu
740                      745                      750
Ile Leu Ser Thr His Ala Ser Asp Glu Val Tyr Leu Gly Gln Arg Asp
755                      760                      765
Asn Pro His Trp Thr Ser Asp Ser Lys Ala Leu Gln Ala Phe Gln Lys
770                      775                      780
Phe Gly Asn Lys Leu Lys Glu Ile Glu Glu Lys Leu Val Arg Arg Asn
785                      790                      795                      800
Asn Asp Pro Ser Leu Gln Gly Asn Arg Leu Gly Pro Val Gln Leu Pro
805                      810                      815
Tyr Thr Leu Leu Tyr Pro Ser Ser Glu Glu Gly Leu Thr Phe Arg Gly
820                      825                      830
Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
835

```

<210> 16

<211> 865

<212> PRT

<213> Glicina max

<400> 16

```

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

```

[illegible]

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

<210> 17

<211> 857

<212> PRT

<213> Glicina max

<400> 17

Met Leu Gly Gly Leu Leu His Arg Gly His Lys Ile Lys Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp Val Asn Ser Val Thr Ser Val
 20 25 30
 Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Leu Asp Leu Val Gly Ser Thr Leu Asp
 35 40 45
 Thr Leu Thr Ala Phe Leu Gly Arg Ser Val Ser Leu Gln Leu Ile Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 18

<211> 864

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 18

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

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

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

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

Lisboa, 30 de Janeiro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Planta de cevada ou sua porção compreendendo uma proteína LOX-1 mutada, em que a atividade da LOX-1 da referida planta ou porção de planta é reduzida ou ausente quando comparada com um controle não mutado, em que a referida proteína LOX-1 mutada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:12, em que o Xaa é o ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, triptofano, asparagina ou glutamina.
2. Planta de cevada ou sua porção de acordo com a reivindicação 1, em que a atividade da LOX-1 compreende a catálise da oxidação dos ácidos gordos poli-insaturados livres e esterificados e dos ácidos gordos octadecanóicos poli-insaturados para formar derivados do ácido gordo 9-hidroperoxi.
3. Planta de cevada ou sua porção de acordo com a reivindicação 1, em que Xaa é o ácido glutâmico ou ácido aspártico.
4. Planta de cevada ou porção da reivindicação 3, em que o Xaa é o ácido aspártico.
5. Grão ou progenia de planta compreendendo uma proteína LOX-1 mutada, em que a proteína LOX-1 mutada compreende a sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID NO.12, em que o Xaa é D, E, H, K, R, T, S, Y, W, N ou Q produzido a partir da planta de cevada ou sua porção da planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4.

6. Malte ou mosto compreendendo uma proteína LOX-1 mutada, em que a proteína LOX-1 mutada compreende a sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID NO. 12, em que o Xaa é D, E, H, K, R, T, S, Y, W, N ou Q produzido a partir da planta de cevada ou sua porção da planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4 ou do grão ou progenia da planta da reivindicação 5.
7. Uso de um malte ou mosto de acordo com a reivindicação 6 para a preparação de uma bebida apresentando qualidades organoléticas que permanecem estáveis ao longo de um período de tempo medido ou a temperaturas de armazenamento elevadas quando comparadas com uma bebida preparada a partir de um produto vegetal de um controlo não mutado.
8. Uso de uma planta de cevada ou sua porção, grão ou progenia de planta, ou malte, ou mosto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6 para a produção de uma bebida.
9. Uso de uma planta de cevada ou sua porção, grão ou progenia de planta ou malte ou mosto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6 para a produção de um malte ou cerveja.
10. Uso de uma planta de cevada ou sua porção, grão ou progenia de planta, ou malte ou mosto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6 para a estabilização das propriedades organoléticas de um produto fermentado ao longo de um período de tempo medido quando comparada com um produto controlo fermentado produzido usando uma planta de cevada não mutada ou sua porção, grão ou progenia de planta, ou produto vegetal.

11. Uso de uma planta de cevada ou sua porção, grão ou progenia de planta, ou malte ou mosto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6 para a produção de um produto fermentado contendo níveis reduzidos de *trans*-2-nonenal livre ao longo de um período de tempo medido ou sob condições de temperatura de armazenamento elevada, quando comparada com um produto controle fermentado produzido usando uma planta de cevada não mutada ou sua porção, grão ou progenia de planta, ou produto vegetal.
12. Processo para produzir cerveja a partir de cevada em que a cevada ou uma sua porção compreende uma proteína LOX-1 mutada, em que a atividade da LOX-1 da referida planta ou porção de planta é reduzida ou ausente quando comparada com um controle não mutado e em que a referida proteína LOX-1 mutada compreende a sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID NO:12, em que o Xaa é ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, lisina arginina, treonina, serina, tirosina, triptofano, asparagina ou glutamina.
13. Processo de acordo com a reivindicação 12, em que o Xaa é o ácido glutâmico ou ácido aspártico.
14. Processo de acordo com a reivindicação 13, em que o Xaa é o ácido aspártico.

Lisboa, 30 de Janeiro de 2012

FIG. 1

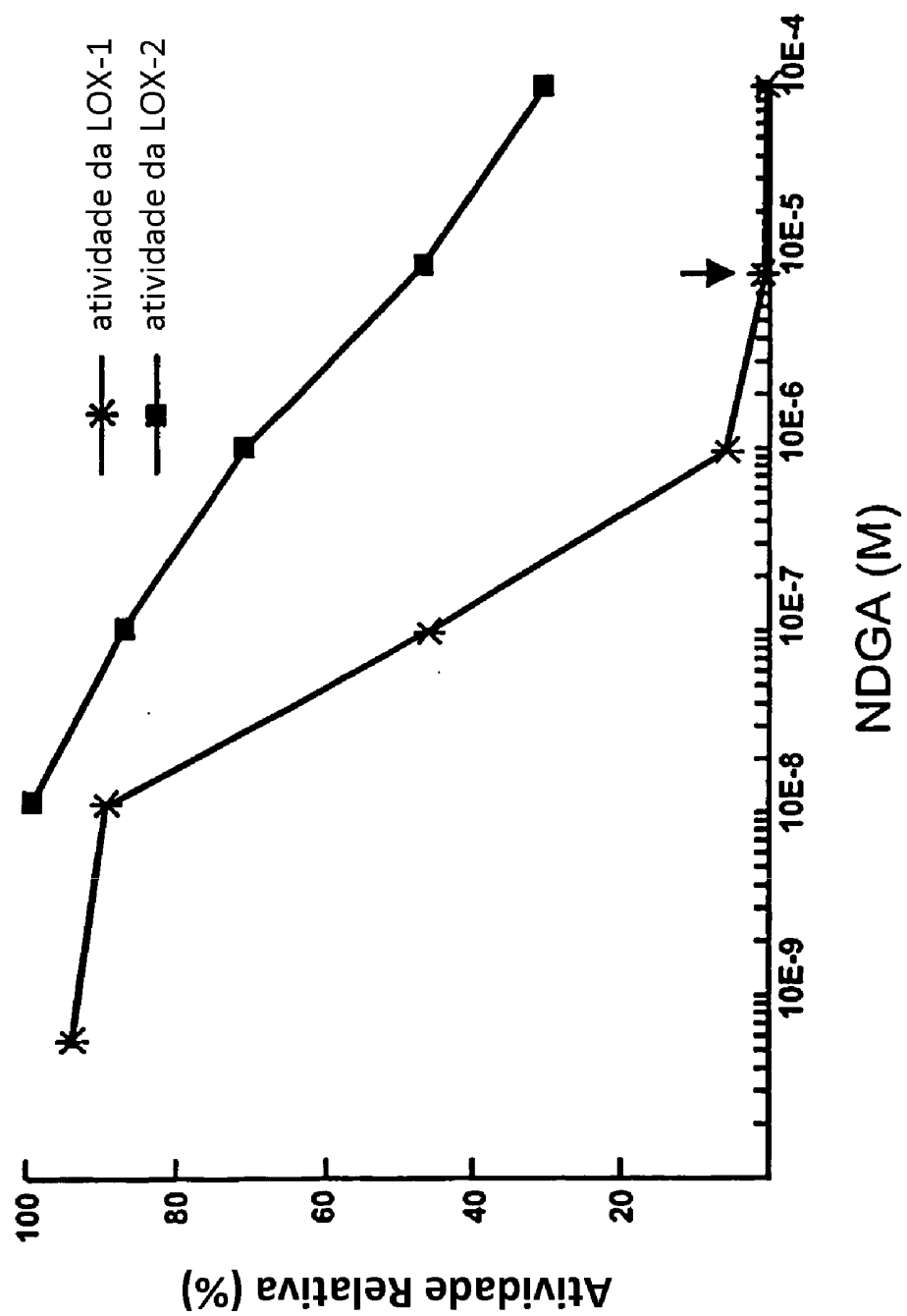


Figura 1

FIG. 2

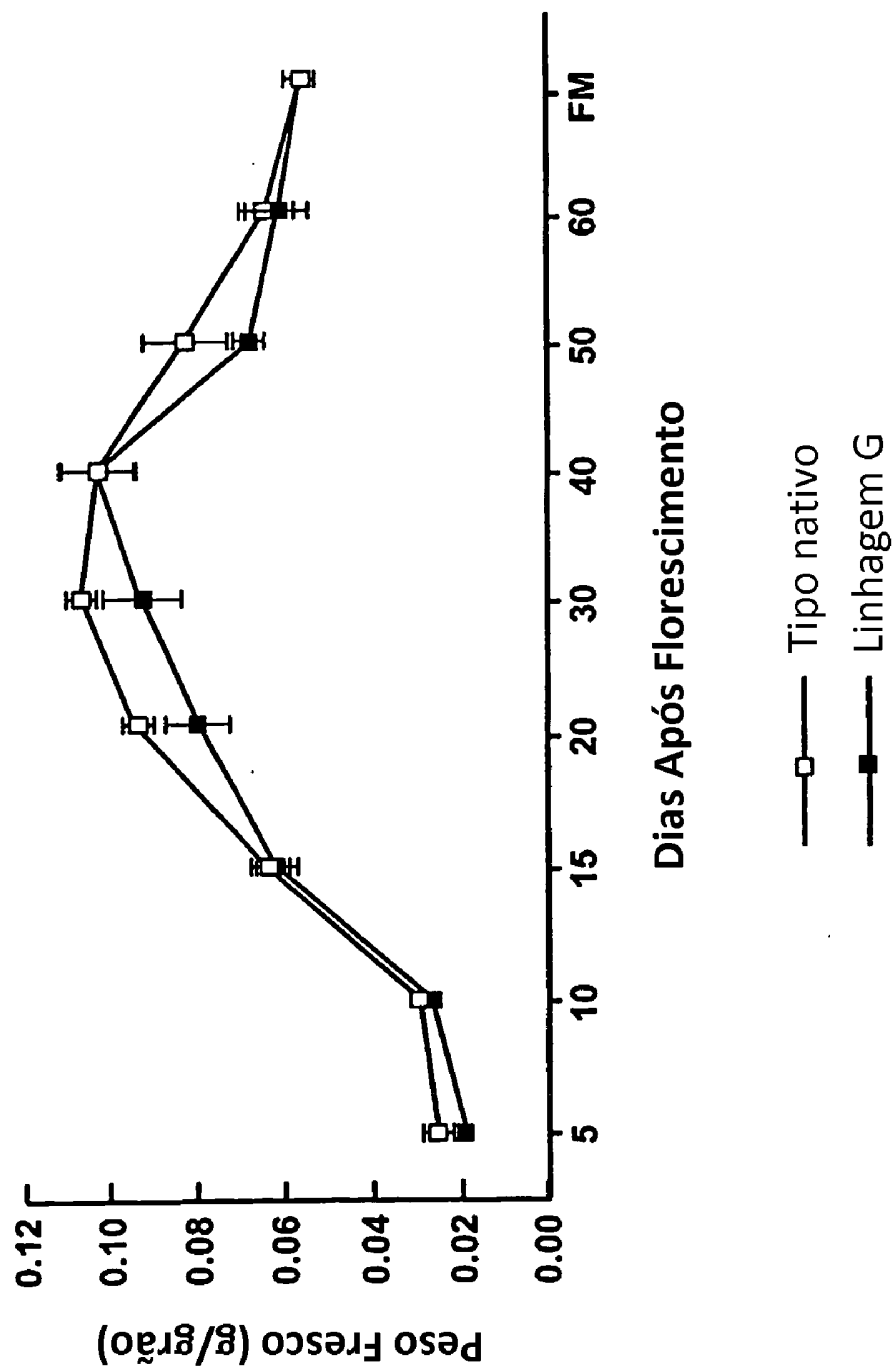


Figura 2

FIG. 3

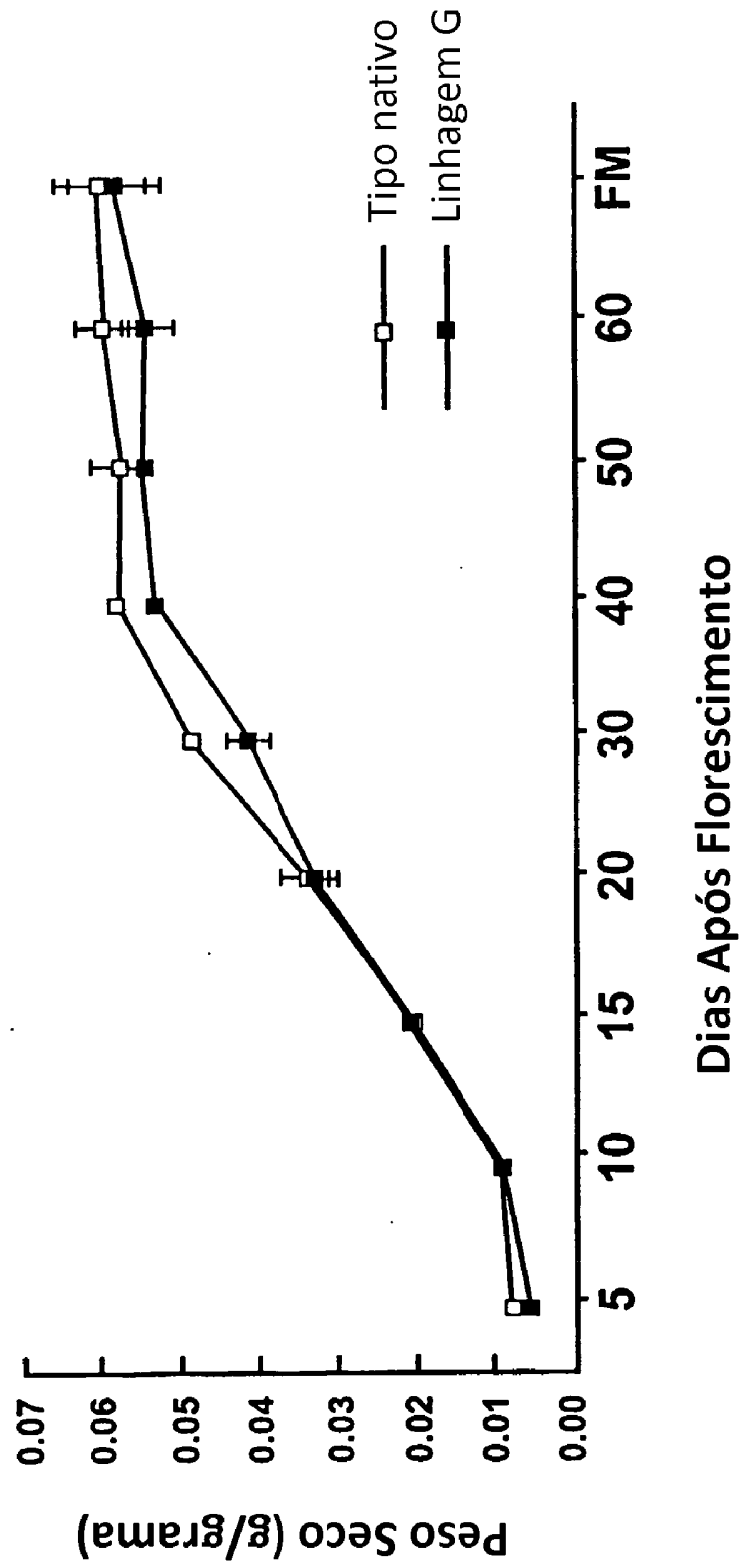


Figura 3

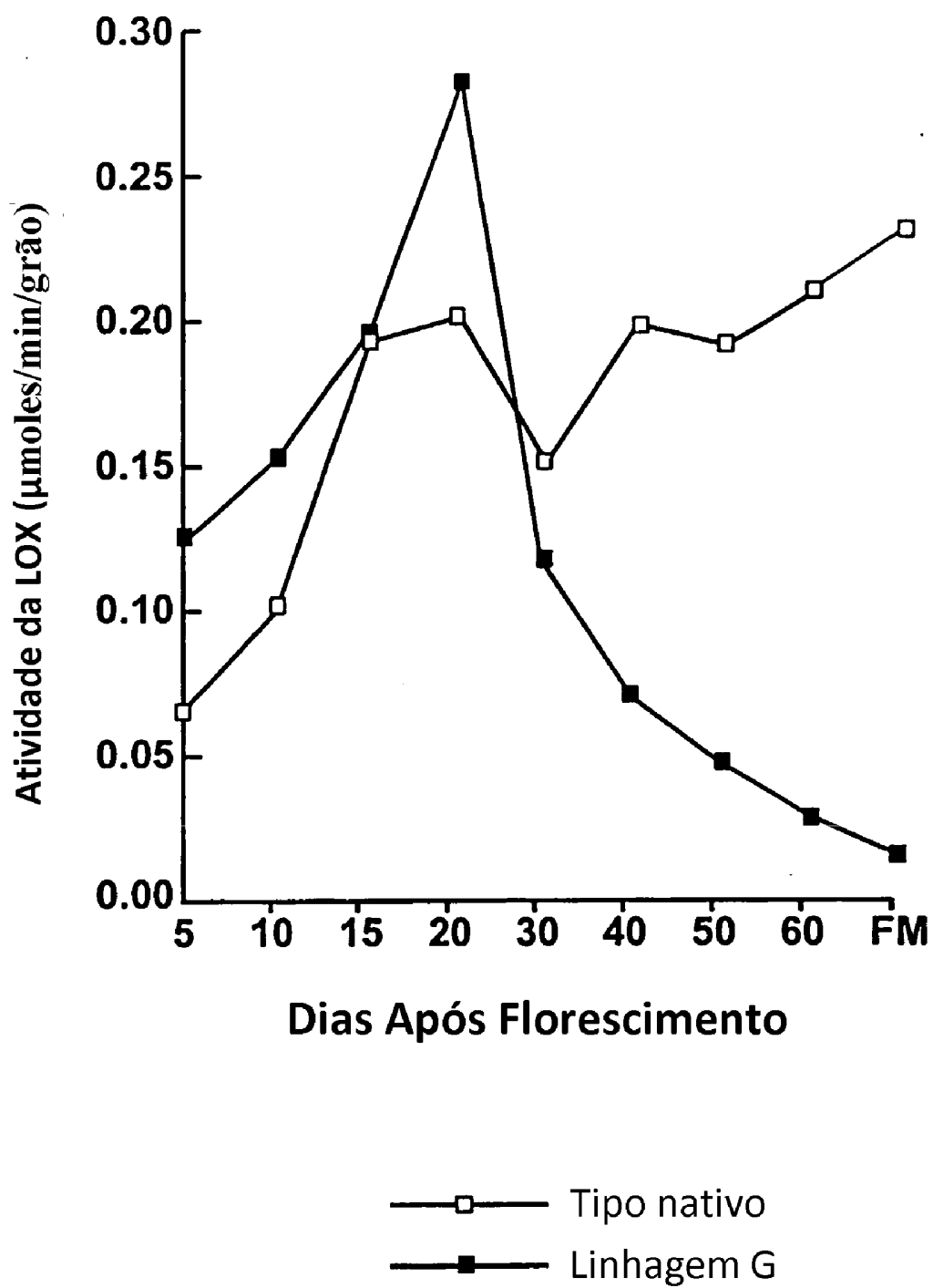
FIG. 4

Figura 4

FIG. 5

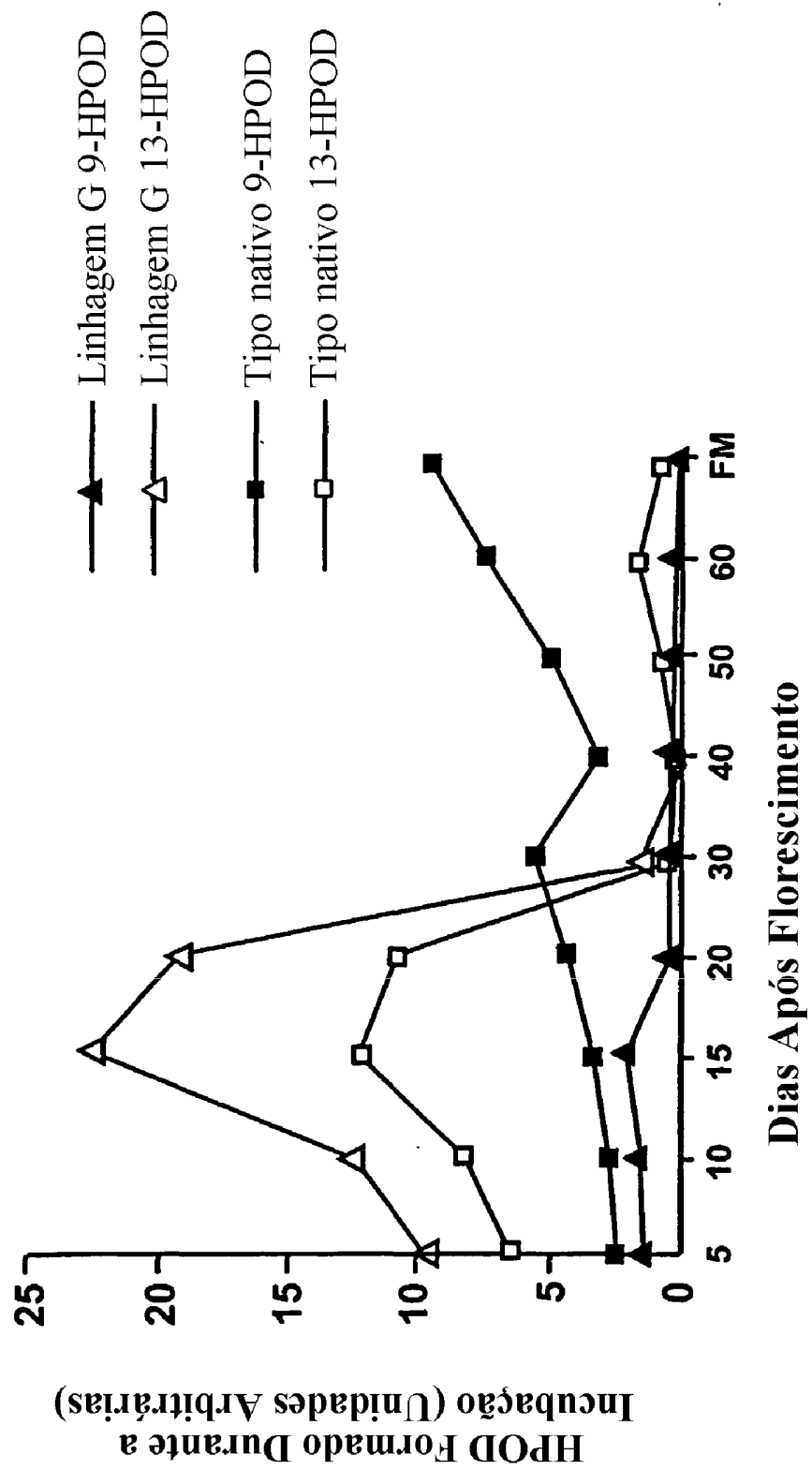


Figura 5

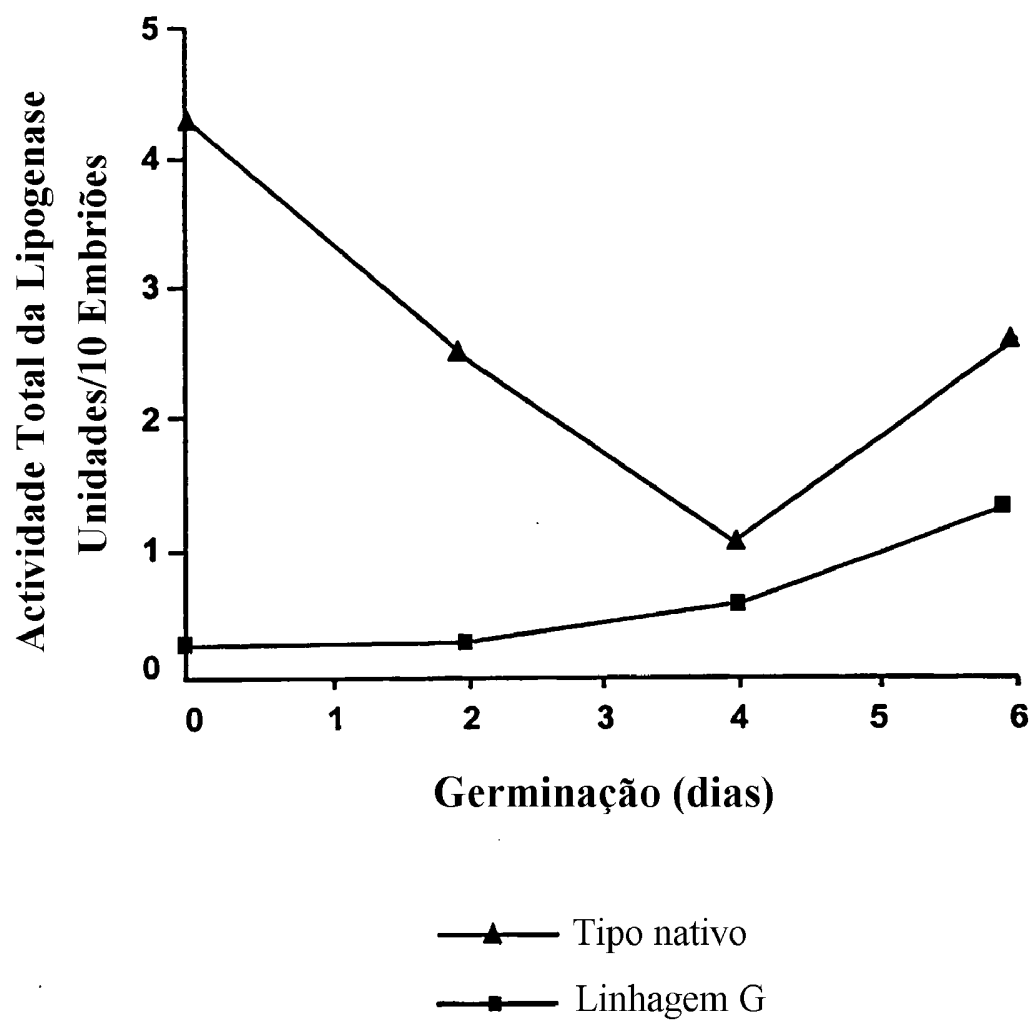
FIG. 6

Figura 6

FIG. 7

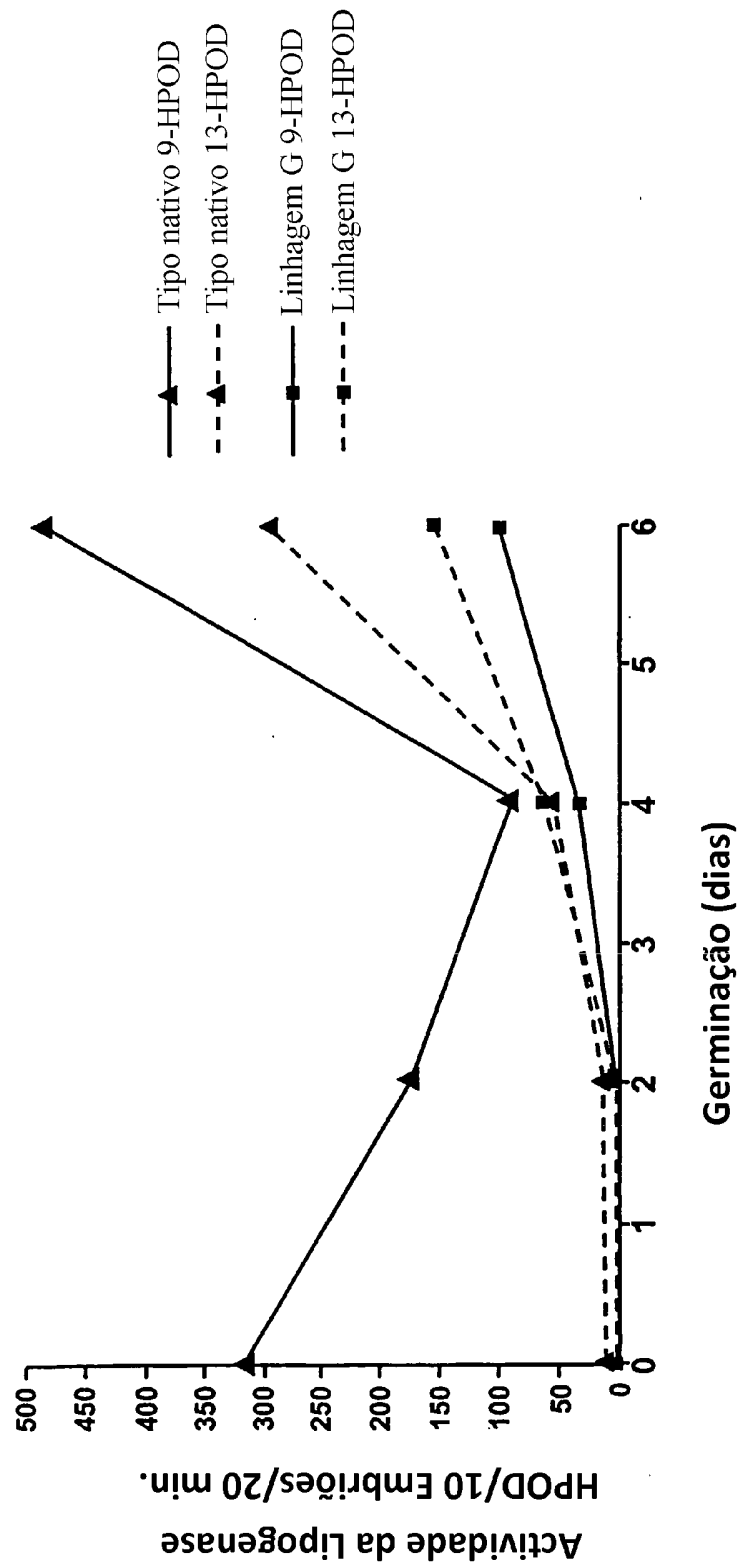


Figura 7

FIG. 8

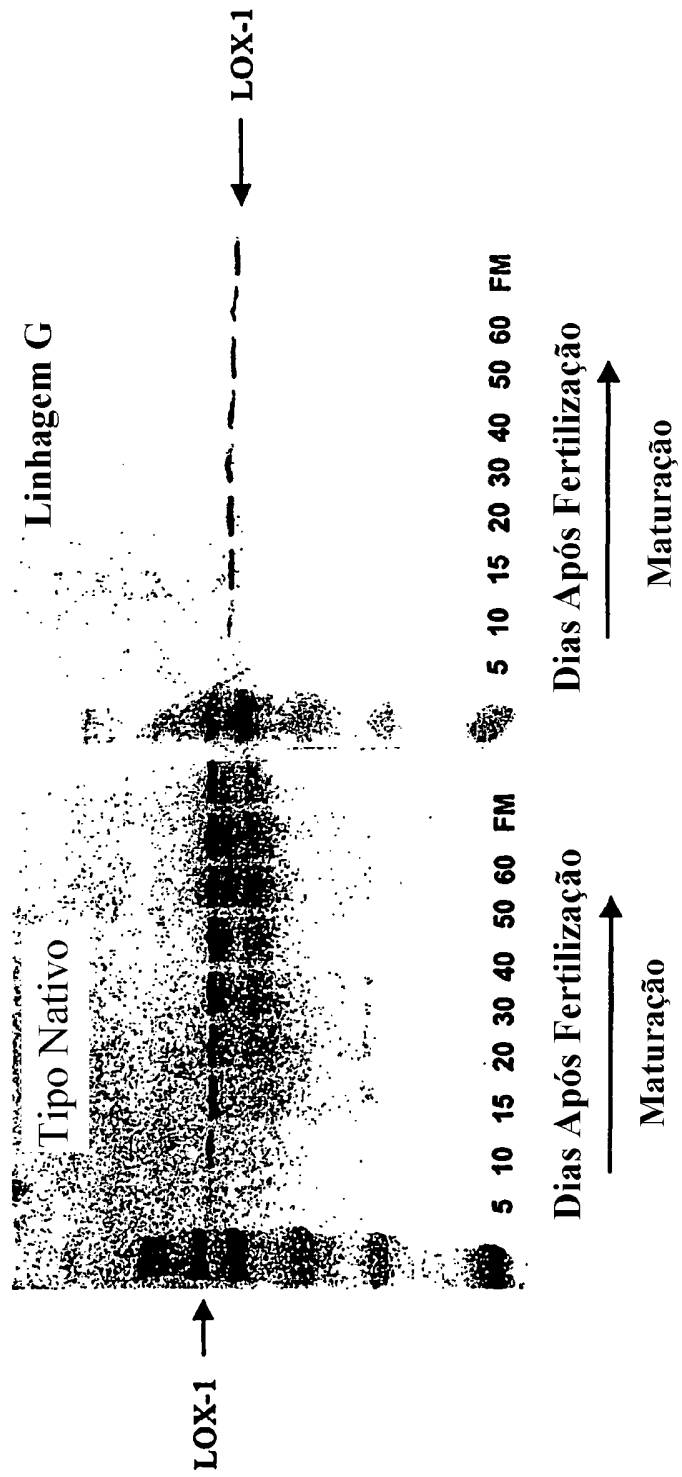


Figura 8

FIG. 9

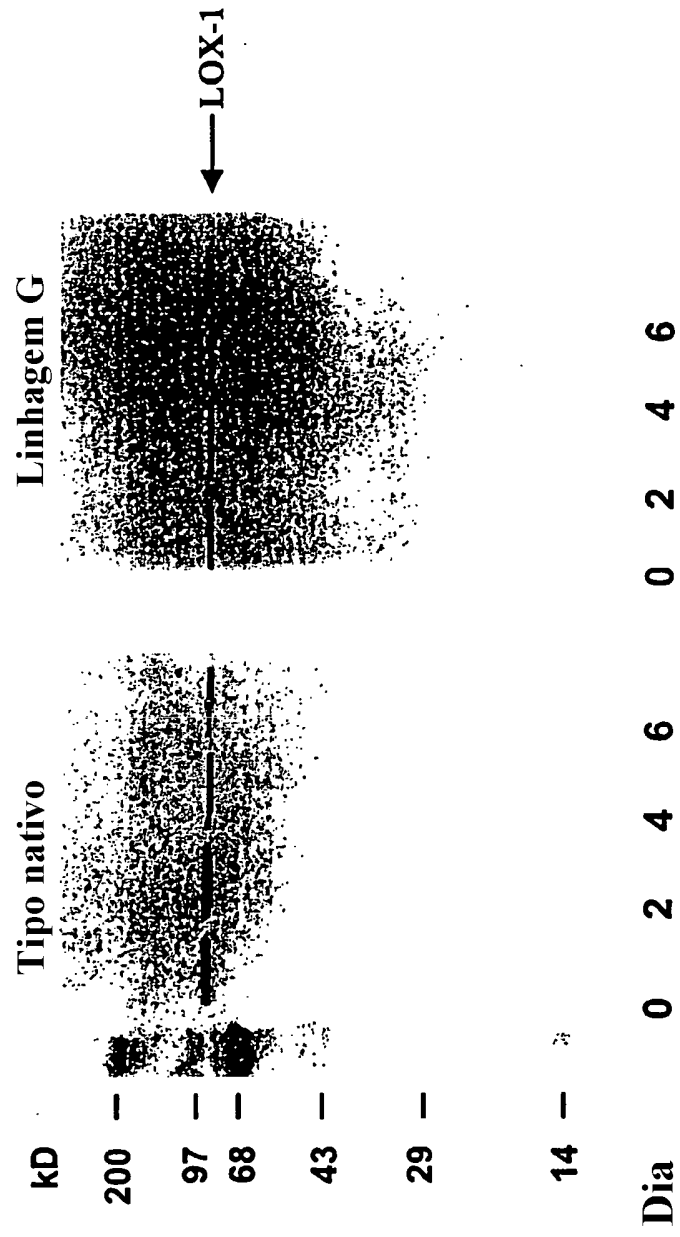


Figura 9

FIGURA 10

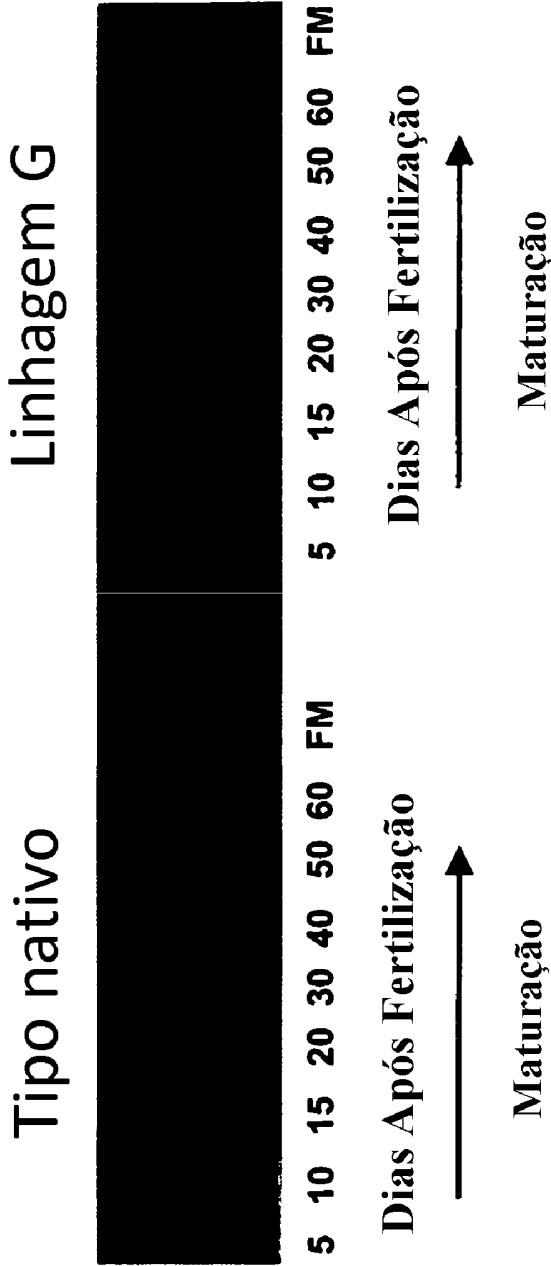


Figura 10

FIG. 11

Figura 11

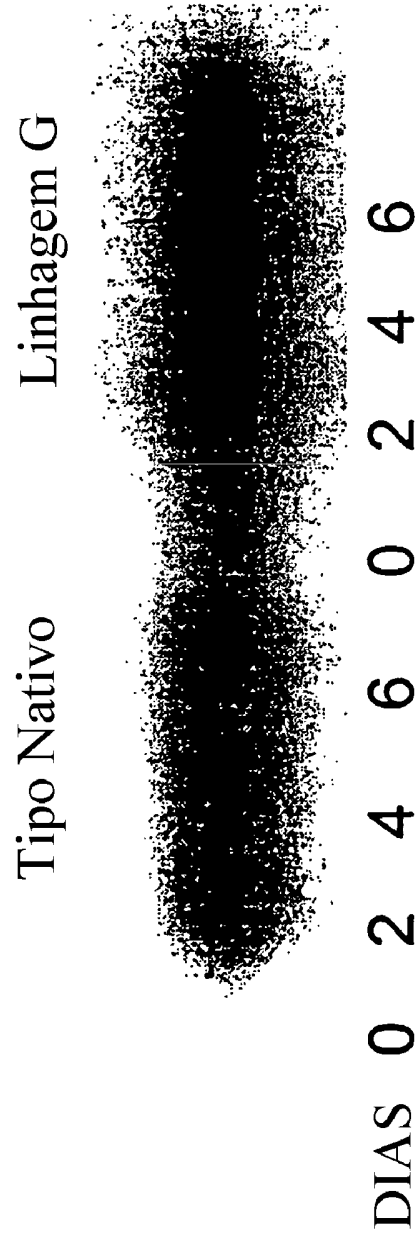


FIG. 12A

(-288) Promotor

LG CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCAGTGCAGCAAGCACCGCTCGATGGCGGATCACCCGTCACG -21
WT CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCAGTGCAGCAAGCACCGCTCGATGGCGGATCACCCGTCACG

LG GGACCGGAGCGGCCCATGCCGAAGCACGAGGAGGGCACGTCACCGTCCGCGCGGAGCACGCTGGAGAGCACGTCGCCGTCGG -1:
WT GGACCGGAGCGGCCCATGCCGAAGCACGAGGAGGGCACGTCACCGTCCGCGCGGAGCACGCTGGAGAGCACGTCGCCGTCGG

LG ATCCATCTCTCAAAGCGGAGCGGCCACACACCGGGACCGGACCCGGACCGGCTATAAATTGCCCGGACCGAGCTGCAA -4:
WT ATCCATCTCTCAAAGCGGAGCGGCCACACACCGGGACCGGACCCGGACCGGCTATAAATTGCCCGGACCGAGCTGCAA

Local de início da Transcrição (+1)

LG GCAGCTCCTCACACACTCACGCAACACACATCCATCTTCACTGAAAGTGAAGAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG 32
WT GCAGCTCCTCACACACTCACGCAACACACATCCATCTTCACTGAAAGTGAAGAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG

Local do início da tradução (+69) →

LG GAGCAGTGAAAGCGAGGAGGAGGAGGCCAAGAACAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGGCGAACA 11
WT GAGCAGTGAAAGCGAGGAGGAGGAGGCCAAGAACAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGGCGAACA

LG GAGCGCCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTGTCTCATGCGCAAGAACGGTGTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG 19
WT GAGCGCCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTGTCTCATGCGCAAGAACGGTGTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG

(Mutação Silenciosa) *

LG ACGGCATCGCGGAGTTCTCGGCAAGGGTGTACCTGCCAGCTTATCAGCTCCACCGCCGTCGACCAAGTAATCACTAC 27
WT ACGGCATCGCGGAGTTCTCGGCAAGGGGCTCACTGCCAGCTTATCAGCTCCACCGCCGTCGACCAAGTAATCACTAC

LG CCTCCTCCGGCCCTTCTCCTCTGTTTACAAGATATAGTATTTCTTTTCGTGTGGCCCGGGCCCATGGATGGATGGATGTGT 35
WT CCTCCTCCGGCCCTTCTCCTCTGTTTACAAGATATAGTATTTCTTTTCGTGTGGCCCGGGCCCATGGATGGATGGATGTGT

Figura 12A

FIG. 12B

LG CTGGATCGGCTAAAGAAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCGTCTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAAA 432
WT CTGGATCGGCTAAAGAAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCGTCTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAAA

LG GAGACAAACAGCATGCATGGTGGCGCACAGACCACGAGACCCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAACAGC 512
WT GAGACAAACAGCATGCATGGTGGCGCACAGACCACGAGACCCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAACAGC

LG AAGGACGACACGTCAAAAAGCAACACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAAGCAACAAACCTAAAGCACAAGA 592
WT AAGGACGACACGTCAAAAAGCAACACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAAGCAACAAACCTAAAGCACAAGA

LG CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCTCAATAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAGAGGAA 672
WT CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCTCAATAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAGAGGAA

LG GTAGTAGCCATGAAAAATTAAATCACCGGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG 752
WT GTAGTAGCCATGAAAAATTAAATCACCGGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG

LG TTCCTTGTAAAGTAAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGGTGAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGGCGCG 832
WT TTCCTTGTAAAGTAAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGGTGAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGGCGCG

LG GAGGCGGAGCTGGAGCAGTGGTGACGAGCCTGCCGTGCTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTGCGCCTCACCTTCGACTG 912
WT GAGGCGGAGCTGGAGCAGTGGTGACGAGCCTGCCGTGCTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTGCGCCTCACCTTCGACTG

LG GGAGGTGGAGAAAGCTCGGGGTGCCGGGGCCCATCGTCGTCAACAATAACACAGCTCCGAGTTCCTGTAAACCATCA 992
WT GGAGGTGGAGAAAGCTCGGGGTGCCGGGGCCCATCGTCGTCAACAATAACACAGCTCCGAGTTCCTGTAAACCATCA

LG CCCTCCACGACGTCCCCCGGCGCAGCGGCAACCTCACCTTCGTGCGCAACTCATGGATCTACCCCGCGCCAACTACCGA 1072
WT CCCTCCACGACGTCCCCCGGCGCAGCGGCAACCTCACCTTCGTGCGCAACTCATGGATCTACCCCGCGCCAACTACCGA

Figura 12B

FIG. 12C

LG TACAGCCGGGTCCTTTCGCCAACGACGTCGGTGGATTTTCCTCTACTTTCCCTCTCCTTTTCATTTTACCGCCTTCGTCA 1152
 WT TACAGCCGGGTCCTTTCGCCAACGACGTCGGTGGATTTTCCTCTACTTTCCCTCTCCTTTTCATTTTACCGCCTTCGTCA

 LG TTCATGGTCGATCATTAAGTCTTCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGAGTGGTTACCACTTAGCAGTACGTACATTAT 1232
 WT TTCATGGTCGATCATTAAGTCTTCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGAGTGGTTACCACTTAGCAGTACGTACATTAT

 LG TTATTCGGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAGTTGCACCGTGGCACCCGTG 1312
 WT TTATTCGGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAGTTGCACCGTGGCACCCGTG

 LG GCAGCGGTGGTAGGTGAAAATAACTGTTCACCGGATCCACCACATGATTGTTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTGT 1392
 WT GCAGCGGTGGTAGGTGAAAATAACTGTTCACCGGATCCACCACATGATTGTTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTGT

 LG CTAGCCACATCTAGATGCATGTCAATAATTATTGTCATACCAAAACGATTAAATTAAAGCATAAAAGAAAAGGAAAAAA 1472
 WT CTAGCCACATCTAGATGCATGTCAATAATTATTGTCATACCAAAACGATTAAATTAAAGCATAAAAGAAAAGGAAAAAA

 LG TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT 1552
 WT TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT

 LG TCYTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTTCACTATGGACAACATACGAAACAAATCAGTGGATCTCTATGCAATTCATT 1632
 WT TCYTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTTCACTATGGACAACATACGAAACAAATCAGTGGATCTCTATGCAATTCATT

 LG ATGTAGTCTATAATAAANTCTTTAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGAGTAAACATAAATCTTTTAAATAGTAATGT 1712
 WT ATGTAGTCTATAATAAANTCTTTAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGAGTAAACATAAATCTTTTAAATAGTAATGT

Figura 12C

FIG. 12D

LG TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCGGAGCCAGATGCCGGGGGGGCTGAAGCCGTACCGCGACGACGAGCTCCG 1792
WT TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCGGAGCCAGATGCCGGGGGGGCTGAAGCCGTACCGCGACGACGAGCTCCG

LG GAACCTGCTGGCGACGACCCAGCAGGGCCCGTACCAGGAGCAGACCGCATCTACCGCTACGACGTCCTAACGACCTCG 1872
WT GAACCTGCTGGCGACGACCCAGCAGGGCCCGTACCAGGAGCAGACCGCATCTACCGCTACGACGTCCTAACGACCTCG

LG GCGAGGGCGCCCCCATCCTCGGGGCAACTCCGACCACTTACCCGCGCGCGCCGACGGAGCGCAAGCCCAACGCC 1952
WT GCGAGGGCGCCCCCATCCTCGGGGCAACTCCGACCACTTACCCGCGCGCGCCGACGGAGCGCAAGCCCAACGCC

LG AGCGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGCGGACGAGAGTTCCGCCACCTCAA 2032
WT AGCGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGCGGACGAGAGTTCCGCCACCTCAA

LG GACGTCCGACTTCCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCAGCGAGGGCATCTGTCCCGCCGTGCGCACCTACGTGGACACCA 2112
WT GACGTCCGACTTCCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCAGCGAGGGCATCTGTCCCGCCGTGCGCACCTACGTGGACACCA

LG CCCCCGGCGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG 2192
WT CCCCCGGCGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG

LG GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCCGCGGCGACTCCCTGCTTAAGCTCCC 2272
WT GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCCGCGGCGACTCCCTGCTTAAGCTCCC

Local Mutante *

LG CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACCAAGCAGGCGGTGGAGGACCGACGAGGAGTTCCGACGGGAGGTGCTCGCCGA CGTCA 2352
WT CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACCAAGCAGGCGGTGGAGGACCGACGAGGAGTTCCGACGGGAGGTGCTCGCCGGCGTCA

Figura 12D

FIG. 12E

LG ACCGGTCATCAGCGTCTCAGGGTGAGTCAGCGATTATTGTTTCAATTGTTGTGTATGTTGTGTCCATGTTGTGAGAAAAG 2432
WT ACCCGGTCATGATCAGCGTCTCAGGGTGAGTCAGCGATTATTGTTTCAATTGTTGTGTATGTTGTGTCCATGTTGTGAGAAAAG

LG TGCAGATCTTGATTGCGTTGGTTCGCATGCACCGCATGCTGCATGCATGCAGGAGTTCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC 2512
WT TGCAGATCTTGATTGCGTTGGTTCGCATGCACCGCATGCTGCATGCATGCAGGAGTTCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC

LG CTAGCAAGTTTGGTGACCACACAGCACCATCACGGCGGAGCACATAGAGAAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG 2592
WT CTAGCAAGTTTGGTGACCACACAGCACCATCACGGCGGAGCACATAGAGAAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG

LG GTAATTGGTCCAAAGCCATCGACATCAACTATGATTACCTAGGAGTAATTGTTAGTGTGTAGATAAATTGGCTTCGTTGCA 2672
WT GTAATTGGTCCAAAGCCATCGACATCAACTATGATTACCTAGGAGTAATTGTTAGTGTGTAGATAAATTGGCTTCGTTGCA

LG ATTAATTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTCGAGCGCTGGAAAGCAACAGGCTGTACATCC 2752
WT ATTAATTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTCGAGCGCTGGAAAGCAACAGGCTGTACATCC

LG TTGATCACCATGACCGGTTCAATGCCGTTCTGTATCGACGTCAACAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC 2832
WT TTGATCACCATGACCGGTTCAATGCCGTTCTGTATCGACGTCAACAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC

LG CTCCTTCTTCTGCGCGGCGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGCGGCCTTAC 2912
WT CTCCTTCTTCTGCGCGGCGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGCGGCCTTAC

LG CACGGCCAAAGAGCAAGGTTTACACGCCCGGTGCCAGCGGCTCCGTTCGAAGGCTGGGTGTGGGAGCTCGCCAAAGGCCTACG 2992
WT CACGGCCAAAGAGCAAGGTTTACACGCCCGGTGCCAGCGGCTCCGTTCGAAGGCTGGGTGTGGGAGCTCGCCAAAGGCCTACG

LG TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTTCGATGTGATTTCAGTCAGTCGA 3072
WT TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTTCGATGTGATTTCAGTCAGTCGA

Figura 12E

FIG. 12F

LG TGCACAACACTGATCGAAATATGATTGATTGAAACGCGCAGGCTGAACACTCACGCGGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT 3152
WT TGCACAACAACTGATCGAAATATGATTGATTGAAACGCGCAGGCTGAACACTCACGCGGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT

LG CGACGAACCGGCACCTTAGCGTGACGCACCCCGGTGCACAAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC 3232
WT CGACGAACCGGCACCTTAGCGTGACGCACCCCGGTGCACAAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC

LG GCGCTGGCGCGCAGACGCTCATCAACGCCGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGCGCAAGTTCGCGTTGGGGAT 3312
WT GCGCTGGCGCGCAGACGCTCATCAACGCCGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGCGCAAGTTCGCGTTGGGGAT

LG GTCGGCCGTGGTGTAACAAGGACTGGAAGTTCACCGAGCAGGGA CTCCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA 3392
WT GTCGGCCGTGGTGTAACAAGGACTGGAAGTTCACCGAGCAGGGA CTCCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA

LG AATGTTATGAATGTGTAAACAAATTTGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG 3472
WT AATGTTATGAATGTGTAAACAAATTTGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG

LG TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGTGCGGTTGCTGGTGTCCGACTACCCGTACGCGGCGGACGGGCTGGCGATCTGG 3552
WT TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGTGCGGTTGCTGGTGTCCGACTACCCGTACGCGGCGGACGGGCTGGCGATCTGG

LG CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTGACGGCGGATACGGAGGT 3632
WT CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTGACGGCGGATACGGAGGT

LG GCAGGCGTGGTGAAGGAGACGCGCGAGGTGCGGCACGCGCACCTCAAGGACGCCCCCATGTGTGCCCAAGATGCAAAAGTG 3712
WT GCAGGCGTGGTGAAGGAGACGCGCGAGGTGCGGCACGCGCACCTCAAGGACGCCCCCATGTGTGCCCAAGATGCAAAAGTG

Figura 12F

FIG. 12G

LG TGC CGAGCTGGCCAAAGSGGTGCACCAACCATCATCTGGATCGGGTCGGCGCTGCATGCGGCAGTCAACTTCGGGCAGTAC 3792
WT TGC CGAGCTGGCCAAAGSGGTGCACCAACCATCATCTGGATCGGGTCGGCGCTGCATGCGGCAGTCAACTTCGGGCAGTAC

LG CCCTACGCGGGGTTCTCCCGAACCGGCCGACGGTGAAGCCGGCGCCGCATGCCGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCGGA 3872
WT CCCTACGCGGGGTTCTCCCGAACCGGCCGACGGTGAAGCCGGCGCCGCATGCCGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCGGA

LG GCTGAGCGCGAACCCGAGCGGGCCCTTCATCCACACCATCAAGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTGCTGCTGG 3952
WT GCTGAGCGCGAACCCGAGCGGGCCCTTCATCCACACCATCAAGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTGCTGCTGG

LG AGGTGCTGTCCGAGCACTCCTCCGACGAGCTGTACCTCGGGCAGCGGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCCAAAGGCC 4032
WT AGGTGCTGTCCGAGCACTCCTCCGACGAGCTGTACCTCGGGCAGCGGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCCAAAGGCC

LG CTGAGGTGTTCAAGCGGTTACGGACCCGGCTGGTGGAGATCGAGAGCAAGGTGGTGGGCATGAACCATGACCCGGAGCT 4112
WT CTGAGGTGTTCAAGCGGTTACGGACCCGGCTGGTGGAGATCGAGAGCAAGGTGGTGGGCATGAACCATGACCCGGAGCT

LG CAAGAACCGCAACGGCCCGGCTAAGTTTCCTTACATGCTGCTCTACCCCAACACCTCCGACCAAGGGCGCGCTGCCG 4192
WT CAAGAACCGCAACGGCCCGGCTAAGTTTCCTTACATGCTGCTCTACCCCAACACCTCCGACCAAGGGCGCGCTGCCG
 paragem da tradução (4229)

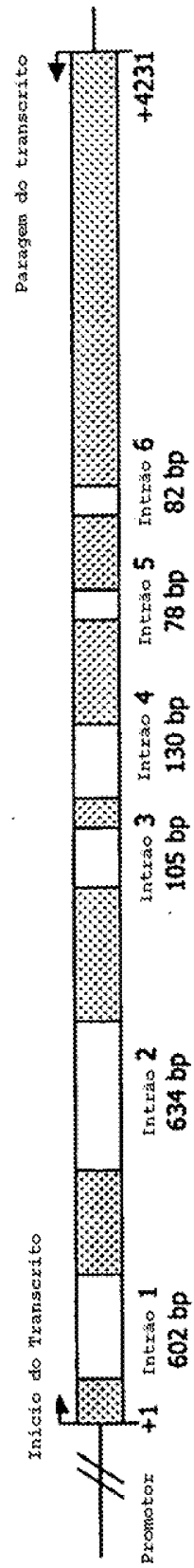
LG GGCTTACCGCCCAAGGGCATCCCCAACAGCATCTCCATCTAATCTAAGCCATCGGCAACCATGGATGAATAAAGGGCGTTTC 4272
WT GGCTTACCGCCCAAGGGCATCCCCAACAGCATCTCCATCTAATCTAAGCCATCGGCAACCATGGATGAATAAAGGGCGTTTC

LG GCCACGTACGAAACTTGTTCGAGAGATTGGTGTAGTGTGTCTGTGACAGTACTATGTGACAGTTGCTCTTTAAGCCGA 4352
WT GCCACGTACGAAACTTGTTCGAGAGATTGGTGTAGTGTGTCTGTGACAGTACTATGTGACAGTTGCTCTTTAAGCCGA

LG ATAAATAAAGCAGATTGCTTCC 4375
WT ATAAATAAAGCAGATTGCTTCC

Figura 12G

Estrutura do gene lox-1 do tipo nativo



Estrutura do gene lox-1 de Linhagem G

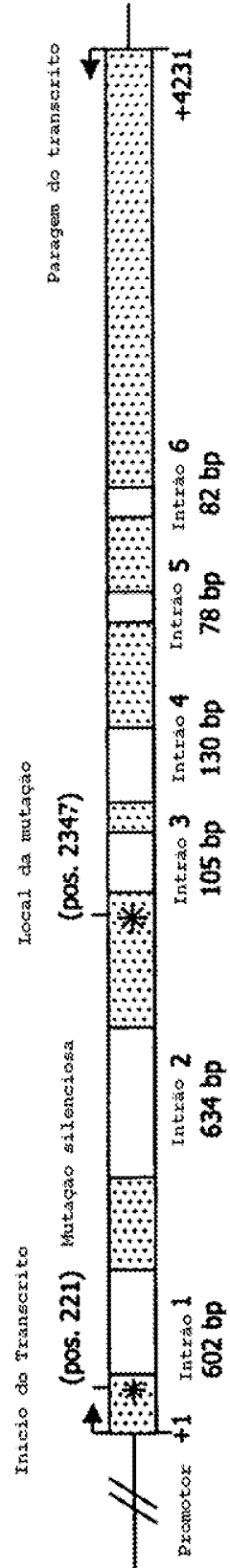


Figura 13

FIG. 14

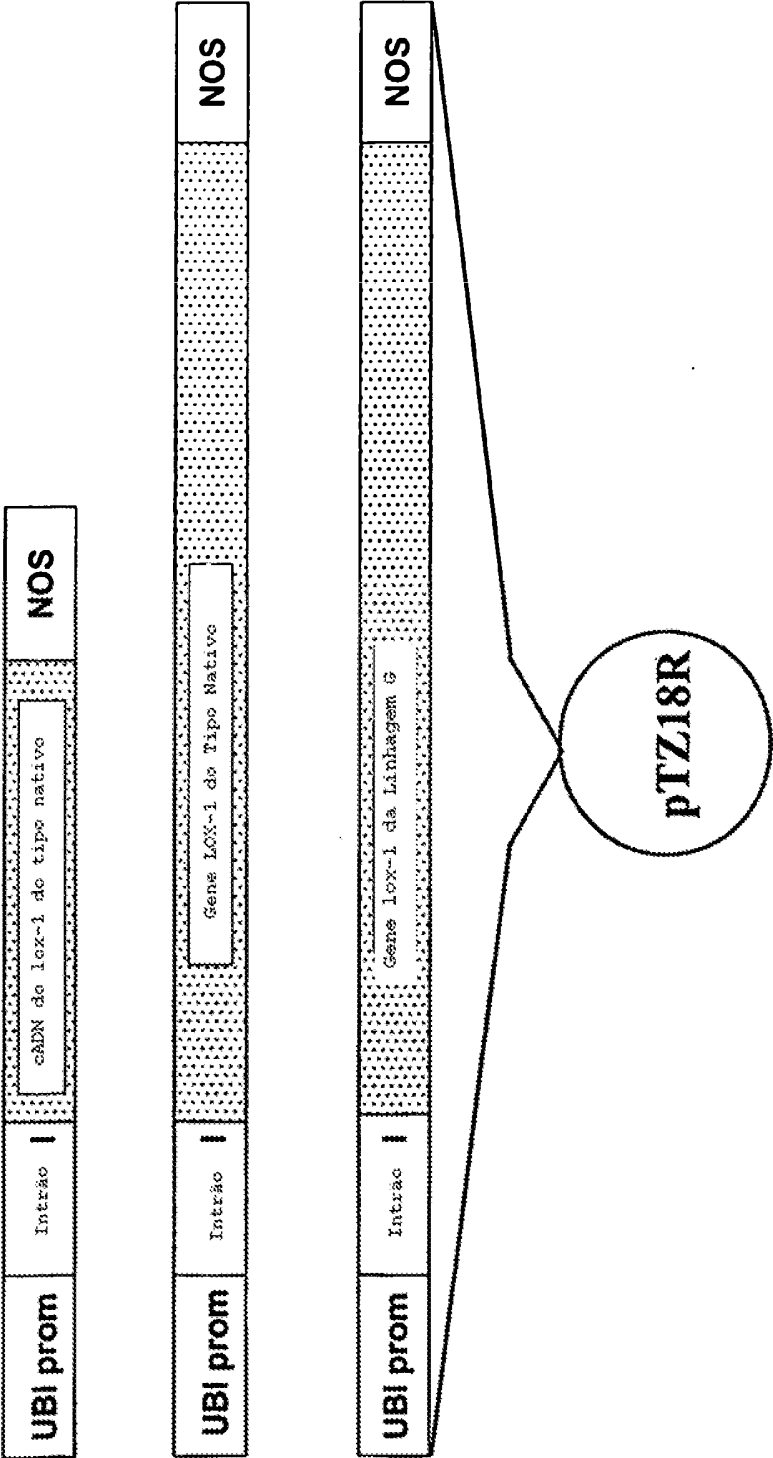


Figura 14

FIG. 15

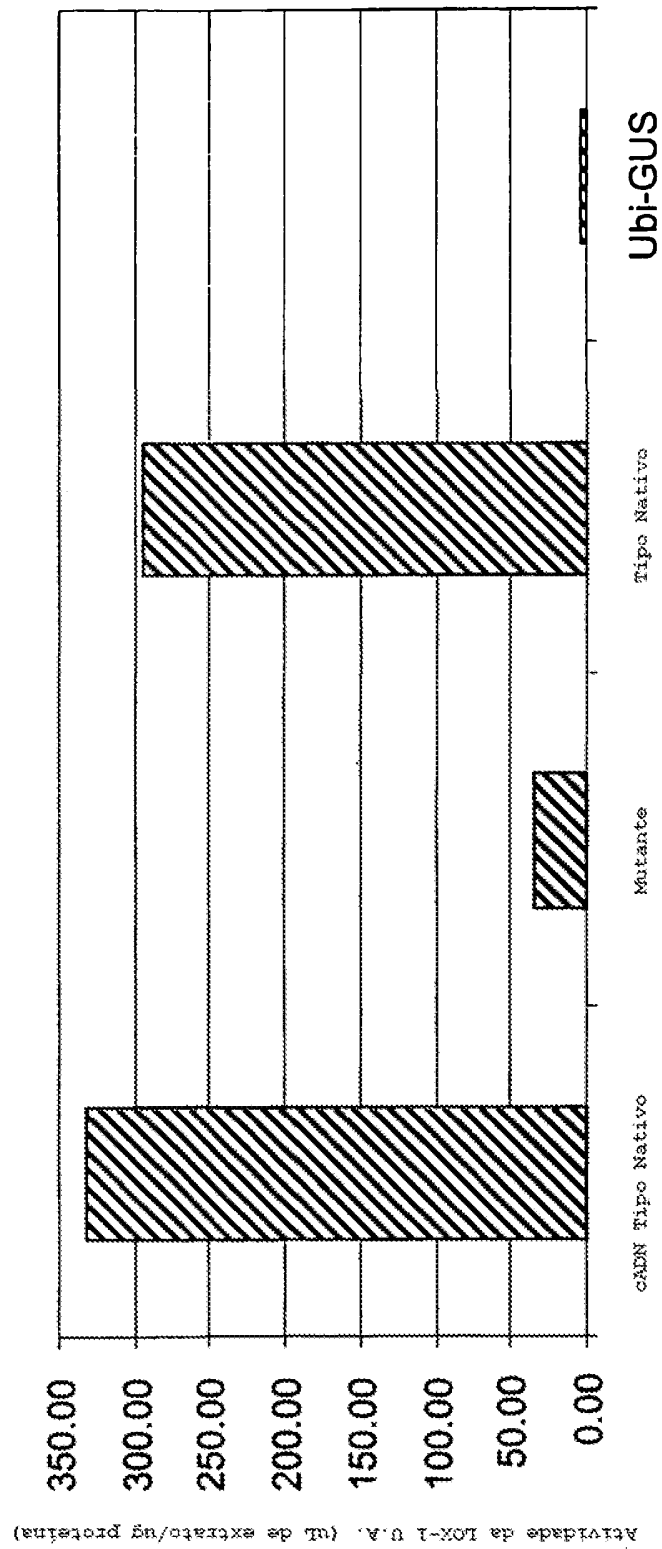


Figura 15

FIG. 16

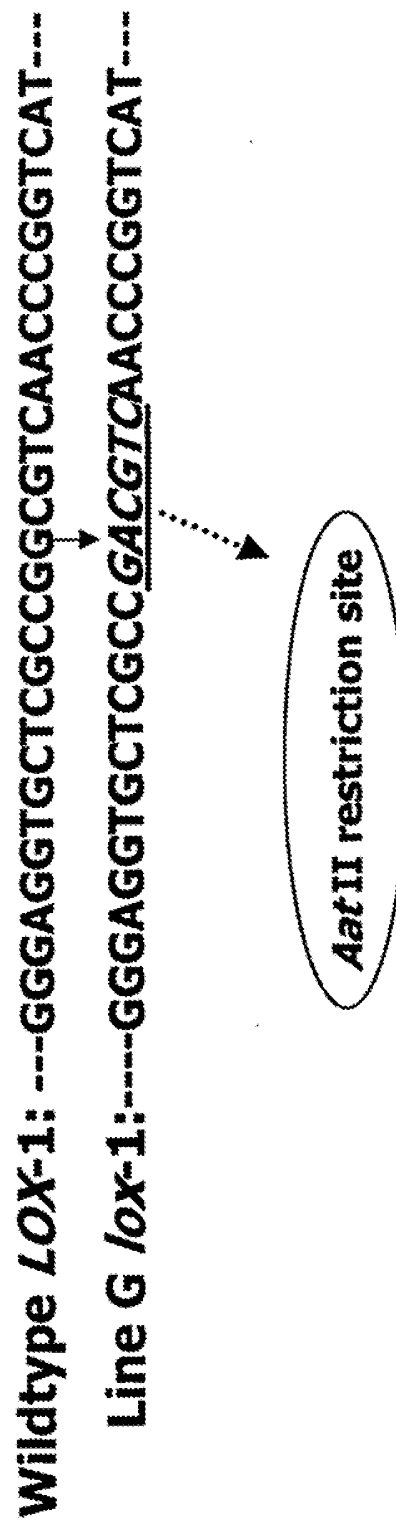


Figura 16

FIG. 17

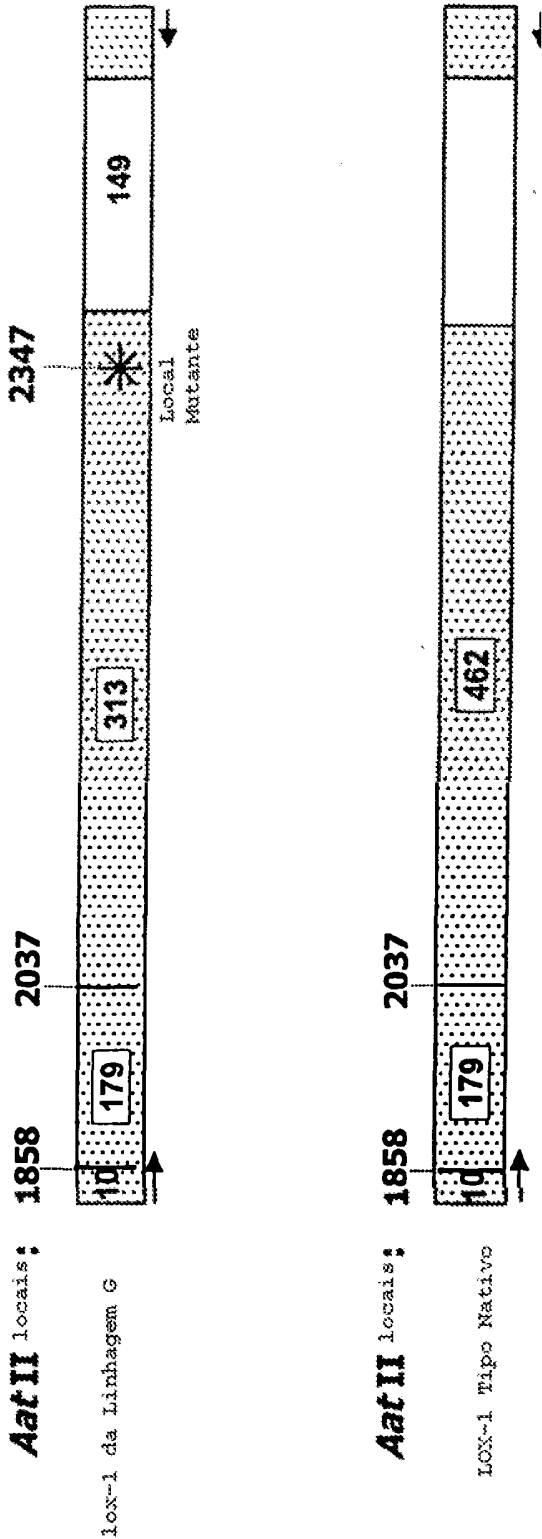


Figura 17

FIG. 18

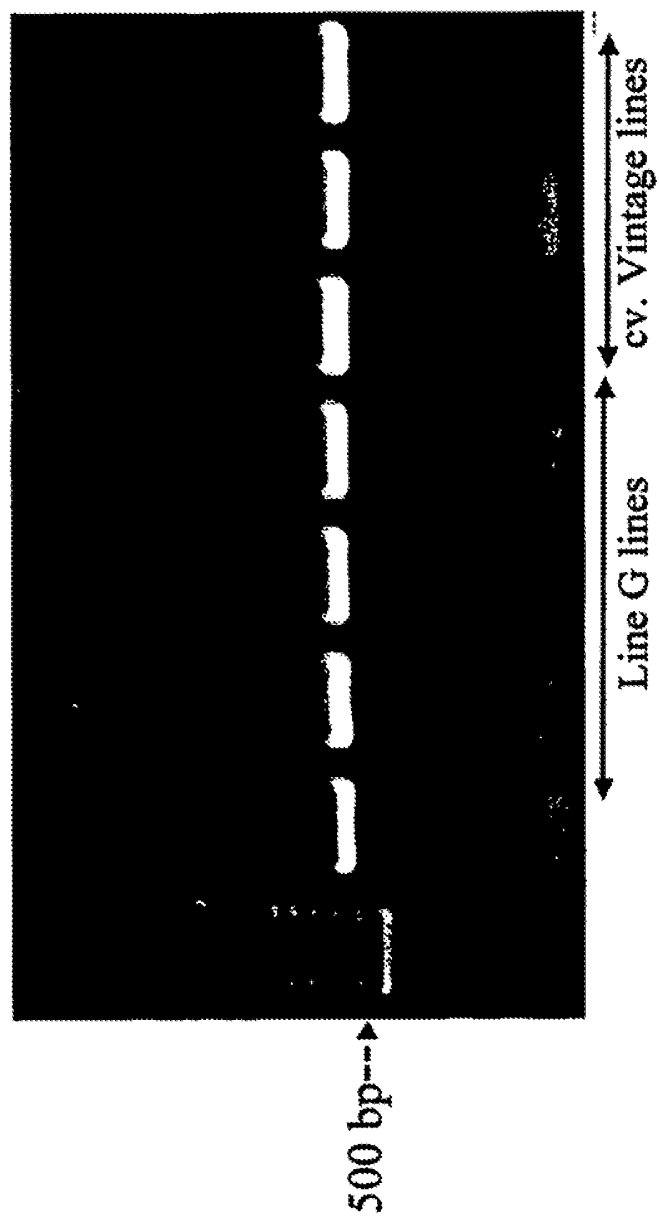


Figura 18

FIG. 19

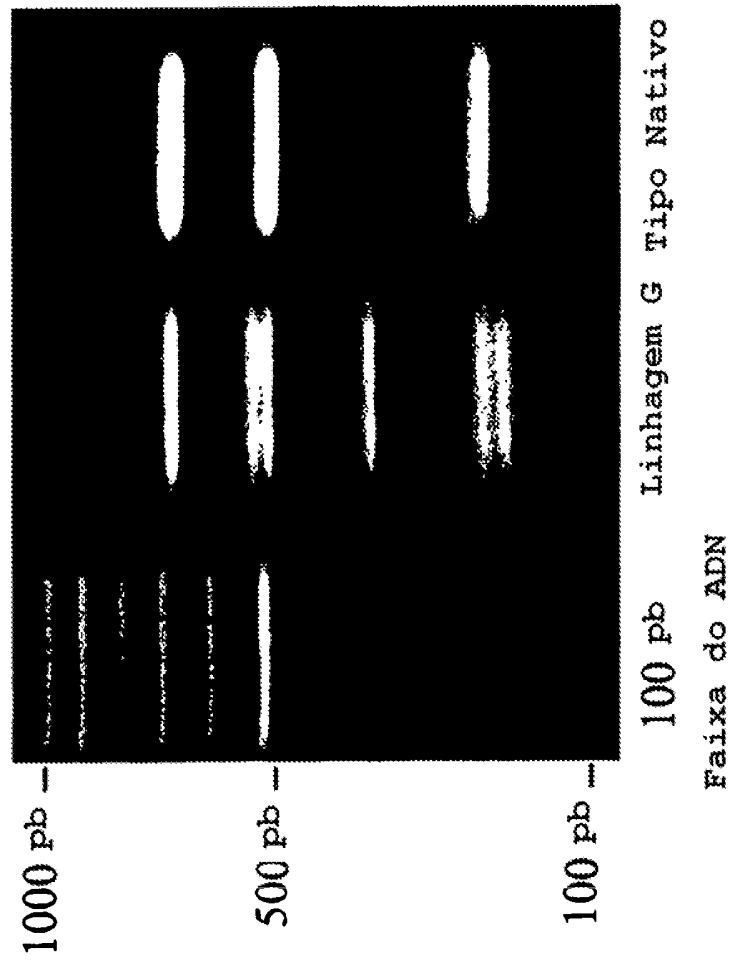


Figura 19

FIG. 20

Programa de Retrocruzamento da Linhagem G com cv Alexis

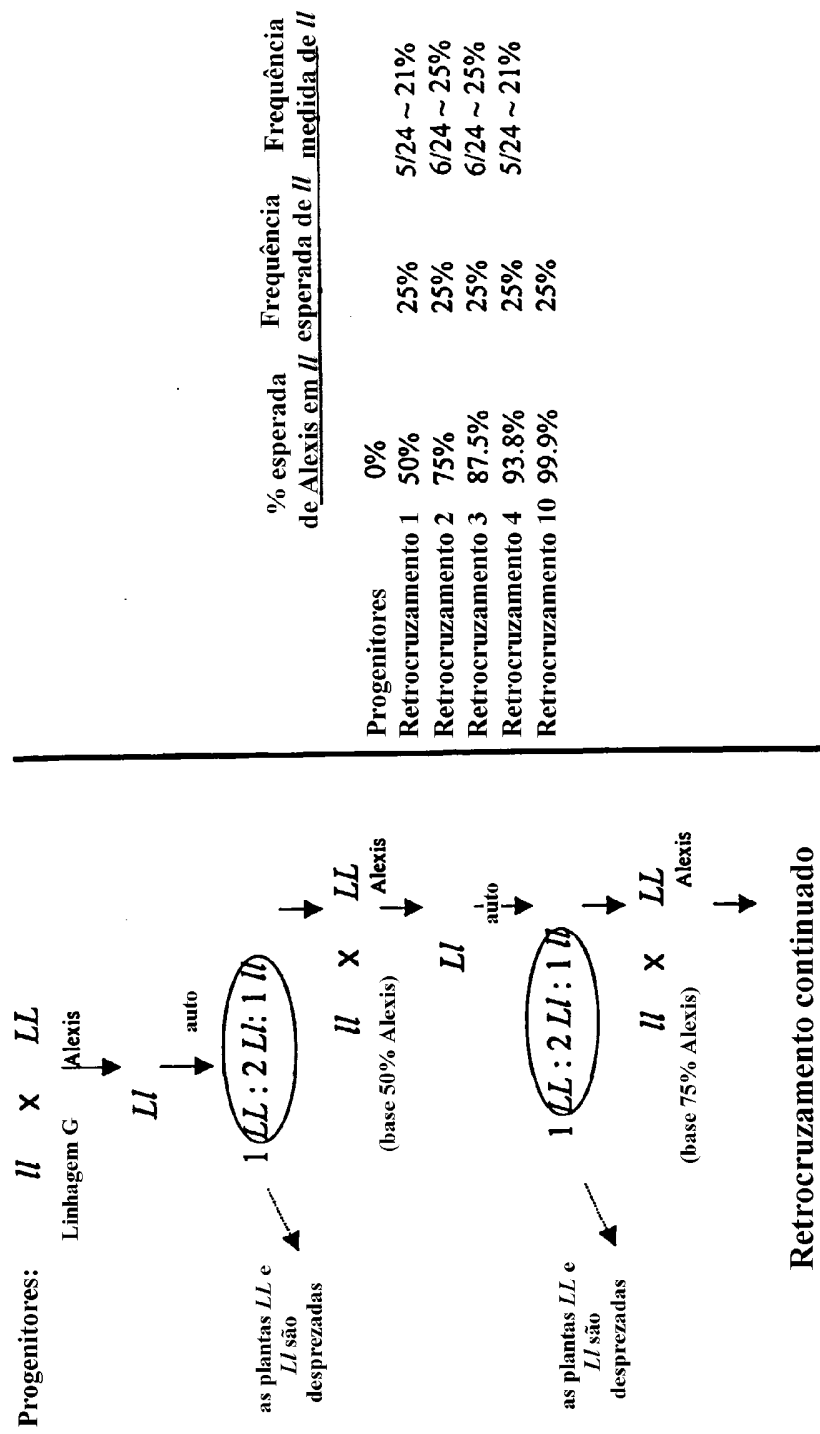


Figura 20

FIG. 21

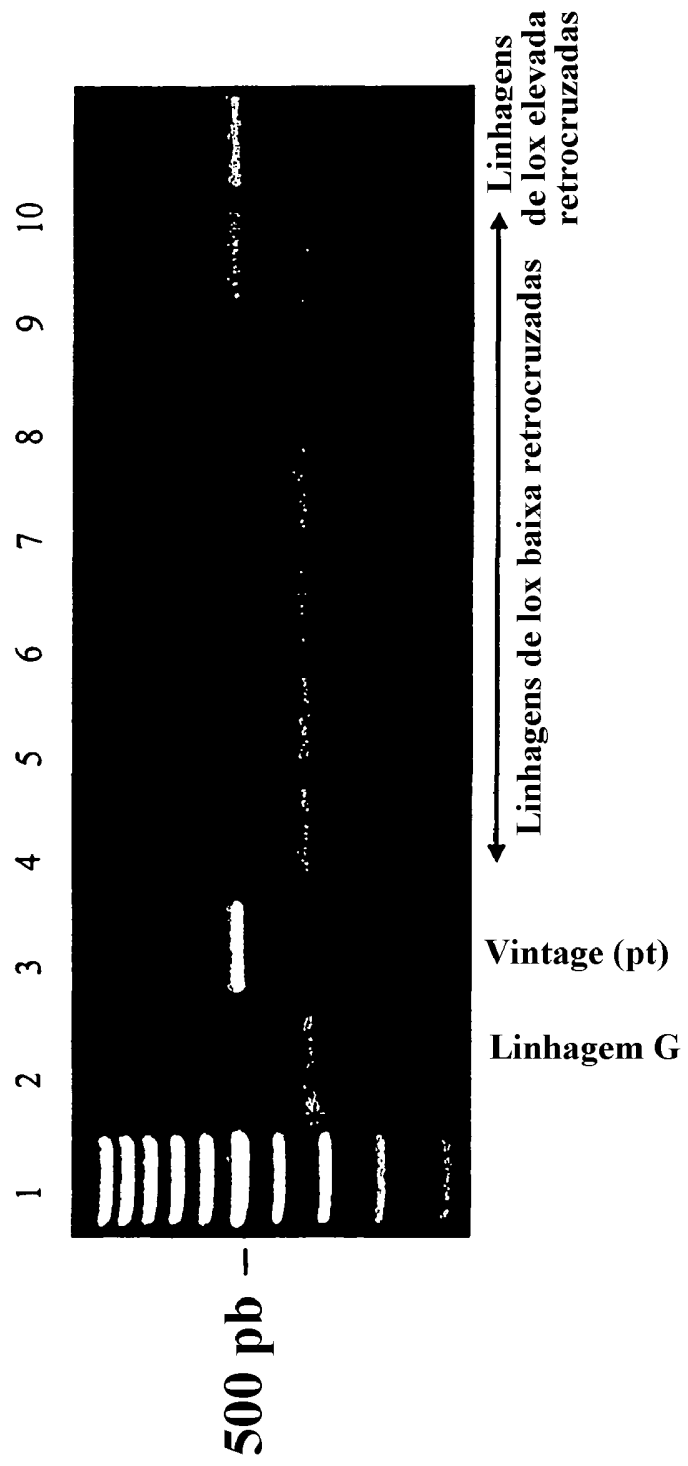


Figura 21

FIG. 22A

ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA LIPOXIGENASE

```

1          E1      H          60
Gm1 MFS.....A.GHKIKGTVVLMRKNELE.....VNPDGSAV
Gm2 MFSVPGVSGILNRGG.GHKIKGTVVLMRKNVLDNFNSVADLTGKNGVGGIGTGLNVVGSTL
Gm3 M.....LGGLLHRG...HKIKGTVVLMRKNVLDVNSVT.....SVGGIIGQGLDLVGSTL
Hv2 MLGVGGIVSDLTGGIRGAHLKGSVVLMRKNALDFN.....DFGAHVM
Hv1 ML.LGGLIDTLTGANKSARLKGTVVLMRKNVLDLN.....DFGATII
61      +      E2      ++ +      E3      +      E4 120
Gm1 DNLNAFLGRSVSLQLISATKADAH..GKGKVGKDTFLEG..INTSLPTLGAGESAFNIHF
Gm2 DNLTAFLGRSVALQLISATKPLAN..GKGKVGKDTFLEG..IIVSLPTLGAGESAFNIQF
Gm3 DTLTAFLGRSVSLQLISATKADAN..GKGKLGKATFLEG..IITSLPTLGAGQSAFKINF
Hv2 DGVTELLGRGVTCQLISSTNVHDHNGGRGKVGAEANLEQWLLPTNLPFITGTENKFAVTF
Hv1 DGIGEFGLGKGVTCQLISSTAVDQDNGGRGKVGAEAELEQWV..TSLPSLTGTESKFGLTF
121      + +      E5      E6      +      E7      E8 180
Gm1 EWD.GSMGIPGAFYIKNYMQVEFFLKSLTLEAISNQ.GTIRFVCNSWVYNTKLYKSVRIF
Gm2 EWD.ESMGIPGAFYIKNYMQVEFFYLKSLTLEDVPNQ.GTIRFVCNSWVYNTKLYKSVRIF
Gm3 EWD.DSGIPGAFYIKNFMQTEFFLVSLTLEDIPNH.GSIHFVCNSWIYNALFKSDRIF
Hv2 DWSVDKLGVPGAIIKNNHASEFFLKTITLNDVPGR.GTIVFVANSWVYPQAKYRYNRVF
Hv1 DWEVEKLGVPGAIVVNNYHSSEFFLKTITLHDVPGRSGNLTFFVANSWIYPAAANYRYSRVF
181      +      +      H1      +      +      E      +      240
Gm1 FANHTYVPSETPAPLVSYREEELKSLRGNGT.GERKEYDRIYDYDVYNDLGNPDKSEKLA
Gm2 FANHTYVPSETPAALVGYREEELKSLRGDGT.GERKEHDRIYDYDVYNDLGNPDHGENFA
Gm3 FANQTYLPSETPAPLVKYREEELKSLRGDGT.GERKEWERIYDYDVYNDLGDPODKGENHA
Hv2 FANDTYLPHQMPAALKPYRDELRLNLRGDDQGGPYLDHDRVYRYDVYNDLGD.....S
Hv1 FANDTYLPSQMPAALKPYRDELRLNLRGDDQGGPYQEHDRYRYDVYNDLGE.....G
241 ++      +      +      +      +      +      +      +      300
Gm1 RPYLGGSSSTFFPPRRGRTGRGPTVTDPNTEKQ...GEVFTVPRDENLGHLSKDALEIG
Gm2 RPILGGSSSTFFPPRRGRTGRYPTRKDQNSEKP...GEV.YVPRDENFGHLKSSDFLAYG
Gm3 RPYLGGNDTFFPPRRGRTGRKPTRKDPNSESER...SNDVYLPRDEAFGHLKSSDFLTYG
Hv2 RDVLGGSKDLFPFPRRCRTGRKPSDSKPDHESRLLLLVQNVYVLRDELFGHLKQSDLLGYT
Hv1 RPILGGNSDHFPPRRGRTERKPNASDPSLESRLSLL.EQIYVPRDEKFGHLKTSDFLGYS
•      H2      +      H3      ++      +      H4      +      360
Gm1 TKSLSQIVQPAFESAFDLKSTPIEFHSFQDVHDLYEKGKILPR...DVISTIPLPVIK
Gm2 IKSLSQYVLPAPFESVFDLNFPTNEFDSFQDVRLHEGGIKLPT...EVISTIMPLPVVK
Gm3 LKSVSQNVLPPLQSAFDLNFPTREFDSFDEVHGLYSGGKILPT...DIISKISPLPVLK
Hv2 LKGWLDGIIAIRTYVDL..SPGEFDSFADILKLYEGGKILPNIPALEEVRKRFPQLQVK
Hv1 IKAITQGILPAVRTYVDT..TPGEFDSFQDIINLYEGGKILPKVALEELRKQFPLQLIK
E10 +E11 + +      H6      +      E12      ++      420
Gm1 ELYRTDGGHILKFPQPHVVQVSQSAWMTDEEFAREMIAGVNPQVIRGLEEFPPKSNLDPA
Gm2 ELFRTDGEQVLKFPFPPHVIQVSKSAWMTDEEFAREMVAGVNPQVIRGLQEFPPKSNLDPT
Gm3 EIFRTDGEQALKFPFPPKVIQVSKSAWMTDEEFAREMLAGVNPNLIRCLKDFPPRSKLDPSQ
Hv2 DLIPKGGDFLLKLPKPEIIKVDQKAWMTDEEFAREMLAGVNPMMIKRLTEFPPKSTLDPS
Hv1 DLLPVGGDSLLKLPVPHIIQENKQAWMTDEEFAREVLAGVNPVMITRLTEFPPKSSLDPS
+      +      +      H7      E13      H8      480
Gm1 IYGDQSSKITADSLD..LDGYTMDEALGSRRLFMDYHDIEMFYVRQINQLNSAKTYATR
Gm2 IYGEQTSKITADALD..LDGYTVDEALASRRLFMDYHDMFYIRINQ.TYAKAYATR
Gm3 VYGDHTSQITKEHLEPNLEGLTVDEAIQNKRLFLDHHDPIMPYLRINA.TSTKAYATR
Hv2 KYGDHTSTMTEEHVAKSLEGLTVQALAGNRLYIVDQHDNLMFPLIDINNLDASFVYATR
Hv1 KFGDHTSTITAHEIEKNLEGLTVQQALESNRLYIDHHDRFMPFLIDVNNLPGNFIYATR

```

Figura 22A

FIG. 22B

	E14	+	E15	+	E16	+	+	H9	540		
Gm1	TILFLREDGTLKPVAIELSLPHSAGDLSAAVSQVVLPAKEG.VESTIWL							LAKAYVIVNDS			
Gm2	TILFLRENGTLKPVAIELSLPHAGDLSGAVSQVILPAKEG.VESTIWL							LAKAYVVNDS			
Gm3	TILFLKNDGTLRPLAIELSLPHPQGDQSGAFSQVFLPADEG.VESSIWL							LAKAYVVNDS			
Hv2	TLFLRGDGT LAPVAIELSSPLIQGELTTAKSAVYTPQHAG.VEGWIWL							LAKAYASVNDY			
Hv1	TLFFLRGDGRLT PL AIELSEPI IQGGLTTAKSKVYTPVPSGSVEGWVWL							LAKAYVAVNDS			
	541	•	•	•	H9		+H10	+	•	H11	600+
Gm1	CYHQLMSHWLNTHAAMEPFVIATHRHLSVLHPIYKLLTPHYRNNM									INALAROSLINANG	
Gm2	CYHQLMSHWLNTHAVIEPFIATNRHLSALHPIYKLLTPHYRDTM									INALAROSLINADG	
Gm3	CYHQLVSHWLNTHAVVEPFIATNRHLSVVHPIYKLLHPHYRDTM									INGLARLSLVNDGG	
Hv2	GWHLQISHWLNTHAVMEPFVIATNRQLSVTHPVYKLLHPHYRDTM									INARARGLLINAGG	
Hv1	GWHLQVSHWLNTHAVMEPFVISTNRHLSVTHPVHKLSPHYRDTM									INALAROTLINAGG	
	601	H12		H13		+H14	+	E	+	E	+660
Gm1	IIETITFLPSKYSVEMSSAVYKNWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPHGVRLLIEDYPYA										
Gm2	IIEKSEFLPSKHSVEMSSAVYKNWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSAPHGLRLLIEDYPYA										
Gm3	VIEQITFLWGRYSVEMSSAVVYKDWVFTDQALPADLIKRGMAIEDPSCPHGIRLVIEDYPYT										
Hv2	VIEMITVFPKHAMPMSMVYKHWNFTEQALPADLIKRGMAVEDASSPHKVRLLIKDYPYA										
Hv1	IFEMITVFPKGKFGMSAVVYKDWKFTEQGLPDDLIKRGMAVEDPSSPYKVRLLVSDYPYA										
	661	H15		H16		H17	+	+			720
Gm1	ADGLEIWAIAIKTWVQEYVPLYARDDVDKNDSELQHWKKEAVEKGHGDLDKDPWPKLQT										
Gm2	VDGLEIWAIAIKTWVQEYVSLYYARDDVDKPDSELQQWKEAVEKGHGDLDKDPWPKLQT										
Gm3	VDGLEIWDIAIKTWVHEYVFLYYKSDDTLREDPELQACWKELVEVGHGDKKNEPWWPKMQT										
Hv2	TDGLAVWDAIEQWVSDYLTIIYYPNDGVLQGDVELQAWWKEVREVGHGDLKDAAWPKMQT										
Hv1	ADGLAIWHAIEQYVSEYLAIYYPNDGVLQGDTEVQAWWKETREVGHGDLKDAWPKMQS										
	721	H18	•	•	•	+	•	+	+	H19	780
Gm1	LEDLVEVCLIIIIWIASALHAAVNFGQYPPYGGILINRPTASRRLLPEKGTPEYEEMINNHE										
Gm2	IEELVEICTIIIIWTASALHAAVNFGQYPPYGGFILLNRPTSSRRLLPEKGTPEYEEMVKS HQ										
Gm3	REELVEACAIIIWTASALHAAVNFGQYPPYGGILLNRPTLSRRFMPEKGS AEYEELRKNPQ										
Hv2	VAELIKACATIIWTGSALHAAVNFGQYPPYSGYHFNKPSASRRMPMPVQGS E EYAE LERDPE										
Hv1	VPELAKACTIIWIGSALHAAVNFGQYPPYAGFLPNRPTVSRRRMPEPGTEEYAE LERDPE										
	781	H20		H21	•	•	•	+	+	H22	840
Gm1	KAYLRTITSKLPTLISLSVIEIILSTHASDEVYLGQRDNPHWTS DSKALQAFQKFGNKLKE										
Gm2	KAYLRTITSKFQTLVDLSVIEIILSRHASDEVYLGQRDNPHWTS DSKALQAFQKFGNKLKE										
Gm3	KAYLKTITPKFQTLIDLSVIEIILSRHASDEVYLGQRDNPNWTS DTRALEAFKRFGNKLQ										
Hv2	KAFIRTITSQFHALVGISLMEIILSKHSSDEVYLGQHDTPAWTS DAKALEAFKRF GAKLEG										
Hv1	RAFIHTITSQIQTIIGVSLLEVLSKHSSDELYLGQRDTPWTS DPKALEVFKRFS DRLVE										
	841		++	+	+	+	+	+	+	+	895*
Gm1	IEEKLVRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLPSSEE.....GLTFRGIPNSIS I										
Gm2	IEEKLARKVNDQSL.SNRLGPVQLPYTLLHPNSE.....GLTCRGIPNSIS I										
Gm3	IENKLSENNDEKLR.NRCGPVQMPYTLLLPSSKE.....GLTFRGIPNSIS I										
Hv2	IEKQVVAMNSDPQLK.NRTGPAKFPMMLYPNTSDHTGQAEGLTARGIPNSIS I										
Hv1	IESKVVGMMHDPKLN.NRNGPAKFPMMLYPNTSDHKGAAAGLTAKGIPNSIS I										

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

□ O sistema de numeração apresentado acima do alinhamento de seqüências não corresponde ao número real de aminoácidos de qualquer seqüência de lipoxigenase no alinhamento.

Figura 22B