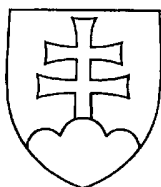


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ  
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(11), (21) Číslo dokumentu:

**937-2003**

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

**C12N 9/02,  
C12N 15/82,  
A01H 5/10**

- (22) Dátum podania prihlášky: **22. 1. 2001**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **09/751 687**  
**PCT/IB00/02045**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **29. 12. 2000**  
**29. 12. 2000**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, IB**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 5. 2004**  
Vestník ÚPV SR č.: **5/2004**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IB01/00207**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/053721**

(71) Prihlasovateľ: **CARLSBERG RESEARCH LABORATORY, Copenhagen, DÁNSKO;**  
**HEINEKEN TECHNICAL SERVICES BV, Zoeterwoude, HOLANDSKO;**  
**BRASSERIES KRONENBOURG, Strasbourg, FRANCÚZSKO;**

(72) Pôvodca: **Douma Anneke Christiana, Zeiste, HOLANDSKO;**  
**Doderer Albert, Zoeterwoude, HOLANDSKO;**  
**Cameron-Mills Varena, Valby, DÁNSKO;**  
**Skadhauge Birgitte, Birkerød, DÁNSKO;**  
**Bech Lene Molskov, Smorum, DÁNSKO;**  
**Schmitt Natalie, Den Haag, HOLANDSKO;**  
**Heistek Jolanda Carolina, Vlaardingen, HOLANDSKO;**  
**Van Mechelen Johannes Reinier, Amsterdam, HOLANDSKO;**

(74) Zástupca: **Mešková Viera, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Jačmeň s nízkou aktivitou lipoxygenázy 1**

(57) Anotácia:  
Poskytnuté sú jačmenné rastliny so zníženou aktivitou enzýmu lipoxygenáza-1, napríklad jačmenné rastliny exprimujúce mutantný LOX-1 proteín. Uvedené jačmenné rastliny sú užitočné na výrobu rastlinných produktov, ako napríklad sladu, a na varenie nápojov, najmä piva, so zvýšenou stabilitou a zníženým T2N potenciálom.

SK 937-2003 A3

Jačmeň s nízkou aktivitou lipoxygenázy 1

Táto prihláška bola podaná ako PCT medzinárodná prihláška vynálezu v mene Carlsberg Research Laboratory, Dánskej spoločnosti, 22. januára 2001, pričom boli dezinované všetky krajiny.

### **Oblasť techniky**

Vynález spadá do oblasti rastlinnej biotechnológie. Konkrétnejšie, vynález sa týka mutantného génu jačmennej lipoxygenázy 1 (*lox-1*), ktorý kóduje enzým so značne zníženou aktivitou vytvárania kyseliny 9-hydroperoxyoktadekánovú. Vynález sa týka aj použitia kultivarov jačmeňa, ktoré sú homozygotné pre *lox-1*, v procesoch varenia, aby sa znížilo vytváranie nežiadúcich chutí v pripravených produktoch, ako napríklad v pive, v priebehu uskladňovania.

### **Doterajší stav techniky**

Lipoxygenázy sú rodinou enzýmov (EC 1.13.11.12), ktoré katalyzujú dioxidáciu voľných a esterifikovaných poly-nenasýtených mastných kyselín zahŕňajúcich 1(Z),4(Z)-pentadiénovú konfiguráciu. Produkty lipoxygenázou katalyzovaných reakcií boli dlho považované za hlavného vinníka objavovania sa stuchnutej vône v rastlinných zrnách/semenách a v potravinárskych produktoch odvodených od týchto zrn/semien (Robinson a ďalší, 1995, Food Chem., 54: 33-43). Lipoxygenázy sa podieľali na produkcii prchavých hexanalaldehydov generovaných v priebehu spracovania sóje, ktoré majú neželateľnú arómu, obmedzujúcu použitie sójových proteínov v potravinárskych produktoch. Tri lipoxygenázové izozýmy exprimované v sójových semenách sú považované za podieľajúce sa na lipidovej oxidácii a na vytváraní hexanal. Sójové mutanty, ktorým chýba jeden alebo viacero z týchto izozým, boli generované s cieľom znížiť vytváranie hexanal a zlepšiť ich chuťovú stabilitu. Úspech tohto prístupu bol hodnotený v Hildebrand a ďalší, 1990,

J. Agric. Food Chem. 38: 1934-1936. Mutanty bez sójovej lipoxygenázy 3 produkovali vyššie hladiny hexanal, čo naznačuje, že tento izozým presmerúva 13-hydroxyperoxyoktadekanoidy, produkované lipidovou oxidáciou, smerom k neprchavým produktom. Poľný pokus s trojitými nulovými sójovými líniami, ktorým chýbali všetky tri semenné lipoxygenázy, ukázal, že tieto enzýmy nie sú nevyhnutné pre normálne agronomické vlastnosti a vlastnosti semena (Narvel a ďalší, 1998, Crop Sci. 38: 926-928).

Lipoxygenázy sa podieľali aj na generovaní nežiadúcich chutí v ryži, ktoré sa môžu vyskytnúť v priebehu skladovania zŕn. V skladovaných zrnách je možné detegovať uvoľňovanie voľných mastných kyselín, čo indikuje metabolizovanie triglyceridových zásob. Zistilo sa, že varieta ryže Daw Dam akumuluje nižšie hladiny pentanalov a hexanalov, z čoho vyplýva lepšia chuťová stabilita pri uskladňovaní (Susuki a ďalší, 1999, J. Agric. Food Chem., 47: 1119-1124). Želateľný fenotyp sa prisúdil absencii ryžovej lipoxygenázy-3, ktorá oxiduje nenasýtené lipidové acylové reťazce, aby sa vytvorili 9-hydroxyperoxyoktadekánové pozičné izoméry.

Je dokázané, že lipoxygenázová dráha je komplex s mnohými vetvami a jej úloha v početných aspektoch rastlinného rastu a fyziológie nie je plne pochopená. Modifikácie lipoxygenázovej dráhy, ktoré menia 9-hydroperoxidačnú aktivitu v obilninách, sú navrhnuté na reguláciu ich náchylnosti na kontamináciu mykotoxínom prostredníctvom *Aspergillus spp.* (WO 97/26364), čo je v súlade so zahrnutím tejto dráhy v rezistencii rastlín voči patogénom, ale netýka sa to cieľov tu opísaného vynálezu.

Spomedzi mnohých aromatických prchavých látok, ktoré sa podieľajú na chuti piva, majú najmä vyššie nenasýtené aldehydy so 6-12 uhlíkovým reťazcom nízke organoleptické chuťové prahy (Meilgard 1975, MBAA Tech. Quart. 12: 151-168). *Trans-2-nonenal*, ktorý je členom tejto skupiny, má aj extrémne nízky chuťový prah 0,11 ppb, aj sa podieľa na nepríjemnej slamovej, „lepenkovej“ chuti piva. Charakteristická nežiadúca chuť spôsobená *trans-2-nonenalom* je zvyčajnou charakteristikou pív uskladňovaných 1 až 3 mesiace alebo dlhšie, najmä je škodlivá pre chuť ležiakového piva, ktoré je varené so svetlými sladmi a má delikátnu chuť.

O sírane je už dlho známe, že zlepšuje chuťovú stabilitu piva, nie len prostredníctvom viazania kyslíka a účinkovaním ako anti-oxidant, ale aj vytváraním

prchavých bisulfidových adičných zlúčenín s aldehydmi a ketónmi nachádzajúcimi sa v pive. Dvoma hlavnými zdrojmi síranu v pive sú síran produkovaný kvasinkami v priebehu fermentácie prostredníctvom síranovej asimilačnej dráhy, a druhou je síran pridávaný do piva pred balením. Fermentačné podmienky, ktoré zlepšujú produkciu a vylučovanie síranu kvasinkami, umožní vytváranie síranovo karbonylových aduktov z karbonylov nachádzajúcich sa v slade a bude zabraňovať ich ďalšiemu metabolizovaniu kvasinkami (Dufour 1991, Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Lisbon, str. 209-216). Týmto spôsobom sa karbonyly, ako napríklad acetaldehyd a diacetyl, môžu preniesť do piva. Schopnosť síranu zabrániť objaveniu sa karbonylovej zlúčeniny *trans*-2-nonenalu v priebehu zretia piva bola demonštrovaná prostredníctvom varenia piva s kvasinkovým kmeňom, v ktorom bola blokována síranová asimilačná dráha (Johannesen a ďalší, 1999, Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Nice, str. 655-662). Po naliatí do fliaš sa pivo podrobilo urýchlenému zretiu jeho uskladnením pri 37 °C počas 7 dní, a potom sa zistilo, že hladiny *trans*-2-nonenalu boli dosť vysoko nad chuťovým prahom. Ak sa pridalo 10 ppm síranu do piva s nízkou hladinou síranu tesne pred nalievaním do fliaš, bolo objavenie sa *trans*-2-nonenalu v priebehu urýchleného zretia významne znížené. Reakcia medzi síranom a karbonylovými zlúčeninami je reverzibilná a pod termodynamickou a kinetickou kontrolou. Rovnovážne konštanty pre bisulfidové zlúčeniny sú zjavne v rozsahu od  $10^{-6}$  M pre karbonylové zlúčeniny, ako napríklad acetaldehyd, hexanal a dekanal, do  $10^{-3}$  pri diacetyl a pyruvát (Dufour 1991, *supra*). V priebehu skladovania piva umožní výmena plynov cez balenie vstup kyslíka do piva a síran sa stratí, takže slabšie bisulfidové adukty budú disociovať, čo umožní voľným karbonylom objaviť sa v pive. Hoci síran neodškriepiteľne posilňuje chuťovú stabilitu piva, najmä krátkodobu, jeho zadržiavanie v zabalenom pive je silne závislé na výmene plynov cez balenie a na teplote. V konečnom pive sú prirodzené hladiny síranu produkovaného v priebehu fermentácie variabilné a pridanie síranu pred naplňaním do fliaš nie je univerzálne akceptovanou praxou. Z týchto dôvodov samotný síran neposkytuje spoľahlivý spôsob na zlepšenie dlhodobej chuťovej stability piva v rôznych podmienkach skladovania piva na svete.

Všeobecne sa akceptuje, že *trans*-2-nonenal nachádzajúci sa v pive vedie k oxidácii polynenasýtených mastných kyselín odvodených od lipidov v jačmenných

zrnách, kde sú najviac zastúpené mastné kyseliny s reťazcami s 18 uhlíkmi a kyselina linolénová (klasifikovaná ako 18:2, n-6 polynenasýtená mastná kyselina (Broun, Gettner a Sommerville 1999, Annu. Rev. Nutr. 19: 197-216)). Avšak v literatúre je len malý konsenzus čo sa týka mechanizmu ktorým sa vytvára *trans*-2-nonenal. Bola navrhnutá prítomnosť enzymatickej dráhy vedúcej k vytváraniu *trans*-2-nonenalu z polynenasýtených mastných kyselín, ale jednotlivé enzymatické kroky neboli nikdy experimentálne demonštrované v jačmenných zrnách alebo v priebehu sladového procesu (Gardner 1988, Adv. Cereal Sci. Technol. 9: 161-215). Na kontrolu vytvárania nežiadúcej chuti bol navrhnutý koncept použitia antisense alebo kosupresnej génovej technológie na redukciiu hladín lipoxygenázy-1 v jačmennom zrne a tým na kontrolu 9-hydroperoxidácie a na zníženie hladín aldehydu a alkoholu v konečnom jačmennom zrne, ale výsledky takéhoto prístupu neboli zverejnené (McElroy a Jacobsen, 1995, Bio/Technology 13: 245-249).

Vyvinul sa test urýchľovania ako spôsob hodnotenia *trans*-2-nonenalového potenciálu piva, v ktorom sa indukuje vytváranie *trans*-2-nonenalu v slade alebo v pive vystavením vzoriek zvýšeným teplotám pri zníženom pH (100 °C, pri pH 4,0, 2 hodiny). Pokusy korelovať *trans*-2-nonenalový potenciál v slade a vo finálnom pive s celkovou úrovňou lipoxygenázovej aktivity v sušenom slade indikovali, že lipoxygenáza sa môže podieľať na objavení sa *trans*-2-nonenalu v staršom pive (Drost a ďalší, 1990, J. Am. Soc. Brew. Chem. 48: 124-131). Avšak závery, ktoré je možné odvodiť z tejto štúdie sú veľmi limitované skutočnosťou, že lipoxygenázová aktivita v jačmennom slade bola regulovaná na konci sladového procesu prostredníctvom stupňa enzymatickej inaktivácie v priebehu sušenia v sušiarňi. Takže sa skúmal len vplyv zvyškovej sladovej lipoxygenázovej aktivity na potenciál *trans*-2-nonenalu v derivovanom slade a vo finálnom pive. Štúdia nebola schopná zhodnotiť lipoxygenázy, ktoré katalyzujú prvý krok v lipoxygenázovej enzymatickej dráhe v jačmennom zrne v priebehu vývoja a sladového procesu a ich úlohu ako determinantov hladín *trans*-2-nonenalu nachádzajúcich sa v pive. V skutočnosti absencia jačmenných kultivarov deficientných v jednom alebo viacerých lipoxygenázových izoenzýmoch znemožnila poskytnutie presvedčivého dôkazu úlohy v lipoxygenázovej dráhe v jačmennom slade pri kontrole vytvárania *trans*-2-nonenalu. Takéto experimenty sú potrebné na zhodnotenie podielu enzymatickej

dráhy, v porovnaní s auto-oxidatívnou/chemickou dráhou, na vytváraní *trans*-2-nonenalu v pive. Prípravný proces zahŕňa krok varenia sladu pri vysokej teplote, kde sa predpokladá, že nastávajú tieto neenzymatické reakcie (Noel a ďalší, 1999, J. Agric. Food Chem. 47: 4323-4326).

### Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje kultivar jačmeňa, ktorý má značne zníženú aktivitu lipoxygenázy-1. V jednom uskutočnení jačmenné rastliny podľa vynálezu obsahujú mutantný *lox-1* gén exprimujúci značne znížené hladiny izoenzýmu lipoxygenázy-1. V alternatívnom uskutočnení jačmenné rastliny obsahujú heterológnu nukleokyselinovú sekvenciu exprimujúcu antisense sekvenciu štandardného *lox-1*, čím sa znižuje enzymatická aktivita.

Ako je tu ukázané, slad a sladina vyrábané z jačmeňa so zníženou aktivitou lipoxygenázy podľa vynálezu, napríklad z jačmenných kultivarov homozygotných v mutantnom *lox-1* géne, sú užitočné na výrobu piva, ktoré má významne zlepšenú chuťovú stabilitu a znížené hladiny *trans*-2-nonenalu, najmä v podmienkach, o ktorých je známe, že podporujú objavenie sa T2N. Vynález demonštruje koreláciu medzi aktivitou jačmennej sladovej lipoxygenázy-1 pri produkcii kyseliny 9-hydroxyperoxy-oktadekadiénovej (9-HPOD) a prítomnosťou *trans*-2-nonenalu v pive. Vynález ďalej demonštruje, že použitie jačmeňa homozygotného pre mutantný *lox-1* gén v prípravnom procese zlepšuje chuťovú stabilitu piva, tak v priebehu uskladňovania, ako aj pri vystavení zvýšeným skladovacím teplotám. Tieto vlastnosti zlepšujú kvalitu piva a sú užitočné na predlžovania trvanlivosti a znižujú potrebu chladiť pivo v priebehu transportu a skladovania.

Vynález poskytuje rastliny jačmeňa a ich časti, ktoré majú zníženú aktivitu lipoxygenázy-1, vrátane rastlín jačmeňa exprimujúcich LOX-1 proteín, ako je tu opísaný, ako aj spôsoby výroby takýchto rastlín jačmeňa, častí rastlín, rastlinných produktov a najmä sladových a pivových produktov vyrábaných z rastlín jačmeňa podľa vynálezu.

### **Stručný prehľad obrázkov**

Obrázok 1 predstavuje graf znázorňujúci vplyv inhibítora, kyseliny nordihydroguaiaretovej (NDGA), na aktivitu imuno-afinitne purifikovaných lipoxygenáz 1 a 2 z embryí trojdňových klíčiach jačmenných zrn.

Obrázok 2 predstavuje graf znázorňujúci čerstvú hmotnosť vyvíjajúceho sa zrna línie G a cv Vintage od 5 dní po kvitnutí do úplnej zrelosti (FM). Každé stanovenie predstavuje priemer hmotnosti jediného zrna zo 6 klasov.

Obrázok 3 predstavuje graf znázorňujúci suchú hmotnosť vyvíjajúceho sa zrna línie G a cv Vintage od 5 dní po kvitnutí do úplnej zrelosti (FM). Každé stanovenie predstavuje priemernú hmotnosť jedného zrna z troch vzoriek po 5 zrn.

Obrázok 4 predstavuje graf znázorňujúci celkovú lipoxygenázovú aktivitu vo vyvíjajúcom sa zrne línie G a cv Vintage od 5 dní po kvitnutí do úplnej zrelosti (FM).

Obrázok 5 predstavuje graf znázorňujúci 9- a 13-HPOD produkty oxidácie kyseliny linolénovej prostredníctvom lipoxygenázovej aktivity vo vyvíjajúcom sa zrne línie G.

Obrázok 6 predstavuje graf znázorňujúci celkovú lipoxygenázovú aktivitu v embryách klíčiach zrn línie G a cv Vintage vyjadrenú v  $\mu\text{mol}/\text{min}/10$  embryí (U/10 embryí).

Obrázok 7 predstavuje graf znázorňujúci 9-HPOD a 13-HPOD produkty oxidácie kyseliny linolénovej prostredníctvom lipoxygenázovej aktivity v embryách klíčiach zrn línie G a cv Vintage, znázorňujúc hladiny 9-HPOD a 13-HPOD.

Obrázok 8 predstavuje Western blot znázorňujúci imunodetekciu lipogenázy 1 v embryách vyvíjajúceho sa zrna línie G a cv Vintage (wt) od 5 dní po kvitnutí do úplnej zrelosti (FM).

Obrázok 9 predstavuje Western blot znázorňujúci imunodetekciu lipoxygenázy 1 v embryách zrn línie G a cv Vintage (štandard) klíčiach 0 až 6 dní.

Obrázok 10 predstavuje Northern blot, pri ktorom bola použitá sonda s 3' netranskribovanou oblasťou *lox-1* cDNA, a znázorňuje lipoxygenázové 1 transkripty detegované vo vyvíjajúcich sa zrnách línie G a cv Vintage (štandard) od piatich dní po kvitnutí do úplnej zrelosti (FM).

Obrázok 11 predstavuje Northern blot, pri ktorom bola použitá sonda s 3' netranskribovanou oblasťou *lox-1* cDNA, a znázorňuje lipoxygenázové 1 transkripty detegované v embryách vyvíjajúcich sa z rln línie G a cv Vintage (štandard) klíčiacich 0 až 6 dní.

Obrázky 12A až 12G predstavujú zoradenie nukleotidových sekvencií promótorovej a transkribovanej oblasti *lox-1* štandardnej cv Vintage alely (WT) a línie G alely (LG). V génových sekvenciách sú transkripčné štartovacie miesto (+1), ATG štartovací kodón (+69) a translačný stop kodón (+4231) podčiarknuté. Nukleotidové mutácie identifikované v línia G alele sú vytlačené hrubou kurzívou a sú označené hviezdikou.

Obrázok 13 je schematickým znázornením *lox-1* génu cv Vintage (štandard) a mutantného *lox-1* génu línie G. Transkript od +1 do +4375 je zložený zo 7 exónov (bodkované obdĺžniky) a 6 intrónov (biele obdĺžniky). Označené sú dve mutácie v *lox-1* géne.

Obrázok 14 predstavuje schematické znázornenie génových kaziet na prechodnú expresiu štandardnej *lox-1* cDNA a *lox-1* génu a mutantného *lox-1* génu z línie G. Sekvencie klonujúce lipoxygenázu boli klonované medzi konštitutívny kukuričný ubiquitínový promótor s intrónom 1 (*Ubi-1*) a *nos* terminátor.

Obrázok 15 predstavuje stĺpcový graf znázorňujúci aktivitu lipoxygenázy 1 v jačmenných aleurónových protoplastoch transfekovaných s génovými kazetami obsahujúcimi štandardnú *lox-1* cDNA; mutantný *lox-1* gén z línie G; štandardný *lox-1* gén; a kontrolný GUS reporterový gén. Lipoxygenázová aktivita v extraktoch transfekovaných protoplastov sa testovala v mikrotitračných platniach prostredníctvom oxidácie KI a kvantifikovala sa spektrofotometricky. Aktivita lipoxygenázy 1 sa vyjadřila ako jednotky na  $\mu\text{g}$  proteínu v extrakte a je znázornená ako priemer 3 meraní z 2 replikačných testov.

Obrázok 16 predstavuje zoradenie sekvencií demonštrujúce, že RFLP medzi štandardným a mutantným *lox-1* génom je spôsobený bodovou mutáciou v nukleotide 2347, ktorá vytvára ďalšie *AafII* restrikčné miesto.

Obrázok 17 predstavuje schematické znázornenie *lox-1* PCR fragmentov amplifikovaných a štiepených v polymerázovej reťazovej reakcii – testom štiepenia amplifikovaného polymorfného miesta (PCR-CAPS). Polohy PCR primerov sú

označené šípkami a AafII miesta sú znázornené nad génom (ako sekvenčná poloha). Exónové a intrónové oblasti vo vnútri PCR produktu sú rozlíšené ako bodkované obdĺžniky, respektíve ako biele obdĺžniky, a sú uvedené veľkosti AafII štiepných fragmentov.

Obrázok 18 predstavuje elektroforetický agarózový gél znázorňujúci *lox-1* PCR fragmenty (652 bp) amplifikované v prvom kroku PCR-CAPS testu z línie G a z cv Vintage genomickej DNA.

Obrázok 19 predstavuje elektroforetický agarózový gél znázorňujúci RFLP detegované prostredníctvom PCR-CAPS v štandardnom a v mutantnom *lox-1* géne. AafII štiepne fragmenty mutantného génu zahŕňajú jediný 313bp restričný fragment označený hviezdikou.

Obrázok 20 predstavuje tabuľku znázorňujúcu program na spätné kríženie pre jediný recesívny génový pár // (znak nízkej aktivity lipoxygenázy) línie G s cv Alexis. LL genotyp sú rastliny exprimujúce štandardnú lipoxygenázovú aktivitu (dominantná alela), ll genotyp sú rastliny exprimujúce nízku lipoxygenázovú aktivitu (recesívna alela). Ll sú heterozygotné rastliny obsahujúce tak štandardnú alelu, ako aj alelu pre nízku lipoxygenázovú aktivitu. Po každom kole spätného kríženia (vrátane samoopelenia) sa očakáva, že ll potomstvo predstavuje 25 % potomstva. Uvedené sú pozorované frekvencie nízkej lipoxygenázovej aktivity. Vypočítané cv Alexis genetické pozadie majúce homozygotnú alelu pre nízku aktivitu lipoxygeázy je označené ako % Alexis.

Obrázok 21 predstavuje elektroforetický agarózový gél znázorňujúci PCR-CAPS detekciu mutantného *lox-1* génu v ll potomstve programu spätného kríženia línie G – Alexis. PCR-CAPS test genomickej DNA línie G (dráha 2), cv Vintage (dráha 3), ll potomstvo 3. spätného kríženia (dráha 4) a 4. spätného kríženia (dráhy 5 až 9). DNA rebrík (dráha 1). Kontrola, spätne krížená línia s vysokou lox aktivitou (dráha 10).

Obrázky 22A až 22B predstavujú komparatívne zoradenie aminokyselinových sekvencií sójových lipoxygenáz LOX-1 (Gm1), LOX-2 (Gm2), LOX-3 (Gm3) a jačmenných lipoxygenáz LOX-1 (Hv1) a LOX-2 (Hv2).

### Podrobný opis vynálezu

V súlade s predmetom vynálezu sú poskytnuté rastlinné materiály, rastlinné produkty a spôsoby na produkciu nápoja, ako napríklad piva, ktorý má znížený obsah *trans*-2-nonenalu, zlúčeniny s nežiadúcou chuťou, takže sa zlepši chuťová stabilita nápoja, napríklad piva, počas skladovania a vystavenia zvýšeným teplotám, v porovnaní s kontrolnými nápojmi. Konkrétnejšie vynález poskytuje variety, ktorých vyvíjajúce sa a klíčiace zrna produkuje značne zníženú aktivitu enzýmu lipoxygenázy-1, označenú LOX-1, ktoré, napríklad, keď sa použijú v procese varenia piva, vedú k pivu so zníženými hladinami *trans*-2-nonenalu, v porovnaní s kontrolnou jačmennou varietou.

Spôsoby použité na generovanie, charakterizáciu a hodnotenie jačmennej variety majúcej značne zníženú LOX-1 aktivitu, a použitie tohto typu jačmeňa na výrobu chuťovo stabilného piva sú opísané nižšie.

#### 1. Definície

Tak ako sa používajú tu, majú nasledujúce výrazy uvedené definície:

„Rastlinná časť“ znamená rastlinu alebo špecifickú časť rastliny, ako napríklad stonku, listy, korene, kvety, semená, zrná, plody alebo puky.

„LOX-1“ znamená lipoxygenázový –1 proteín; „*lox-1*“ znamená gén kódujúci LOX-1.

„Mutantný jačmenný *lox-1*“ znamená mutovaný jačmenný gén kódujúci mutantný lipoxygenázový 1 polypeptid.

„Nemutovaná kontrola“ znamená rastlinu, nukleovú kyselinu, gén, polypeptid, rastlinnú časť alebo rastlinný produkt obsahujúci štandardný gén alebo proteín.

„Heterológny“ znamená inú ako natívnu sekvenciu, napr. sekvenciu odvodenú z iných druhov alebo rekombinantne skonštruovanú alebo syntetickú sekvenciu, ktoré sa líšia od natívnej sekvencie.

„Rastlinný produkt“ znamená produkt, ktorý je výsledkom spracovania rastliny alebo rastlinnej časti, a zahŕňa napríklad slad a sladinu.

„Kyslá aminokyselina“ znamená kyselinu asparágovú alebo glutámovú.

„Zásaditá aminokyselina“ znamená treonín, serín, tyrozín, tryptofán, asparagín alebo glutamín.

„Uvarený produkt“ znamená produkt pripravený roztláčením, varením a fermentovaním, napr. pivo.

„Redukovaný *trans*-2-nonenal“ znamená znížený na menej ako približne 50 % v porovnaní so štandardnými (kontrolnými) podmienkami.

## 2. Lipoxygenázová aktivita

Lipoxygenázové enzýmy katalyzujú oxidáciu polynenasýtených mastných kyselín. V jačmeni sú známe izoenzýmy LOX-1 a LOX-2. LOX-1 primárne katalyzuje 9-hydroperoxidáciu, pričom LOX-2 primárne katalyzuje 13-hydroxyperoxidáciu polynenasýtených oktadekánových mastných kyselín. Údaje uvedené v príkladoch, nižšie, demonštrujú koreláciu medzi aktivitou jačmennej LOX-1 9-hydroperoxidácie a prítomnosťou *trans*-2-nonenalu v pive. Z toho vyplýva, že jačmeň majúci zníženú LOX-1 aktivitu je užitočný na výrobu piva so zníženou hladinou a/alebo potenciálom *trans*-2-nonenalu v porovnaní s kontrolou.

## 3. Produkcia jačmeňa s nízkou aktivitou lipoxygenázy

Na produkciu rastlín podľa vynálezu, teda na zníženie exprimovanej aktivity enzýmu lipoxygenázy 1 v jačmennej rastline stabilným, dedičným spôsobom, sa môžu použiť rôzne známe genetické prístupy. Tieto prístupy zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na antisense technológiu a mutagenézu, ako napríklad chemicky a žiarením indukovanú mutagenézu, ako aj miestne špecifickú mutagenézu.

## Transformácia jačmeňa

Jačmeň sa môže transformovať rôznymi nukleokyselinovými molekulami skonštruovanými na manipuláciu *lox-1* génovej expresie alebo na zmenu architektúry *lox-1* génu. Na úspešné zavedenie nukleových kyselín do jačmennej bunky, napríklad do protoplastu, kalusu alebo embrya, môžu byť použité rôzne metódy, napríklad transfer sprostredkovaný s *Agrobacterium tumefaciens* (Tingay a ďalší, 1997, Plant J., 11: 1369-1376), bombardovanie časticami (Wan a Lemaux, 1994, Plant Physiol., 104: 37-48) alebo príjem DNA sprostredkovaný

polyetylénglykolom (PEG) (Funatsuki a Kihara, 1995, Theor. Appl. Genet., 91:707-712).

Na poháňanie expresie daného génu môžu byť použité rôzne promótoary. Napríklad môžu byť použité *lox-1* obsahujúce vektory zahŕňajúce antisense sekvencie, natívnu *lox-1* promótorovú oblasť. Promótorová sekvencia *lox-1* je obsiahnutá v nukleotidoch 2602-3511, ktoré zahŕňajú 5' UTR z EMBL s prístupovým číslom U83904. Alternatívne môžu byť použité promótoary, ktoré poháňajú expresiu daného génu konštitutívne, napríklad *Ubi 1* kukuričný ubiquitínový promótor (Wan a Lemaux, vyššie; Kjaerulff a ďalší, v P. Mathis, vyd. 1995, Photosynthesis: from Light to Biosphere, zv. II, 151-154). Expresné vektory môžu obsahovať aj transkripčnú terminačnú oblasť, napríklad 3' terminátor nopalínového syntázového génu (*3'-nos*) (Brevan a ďalší, 1983, Nucl. Acids Res., 11: 369-385) môže byť fúzovaný s génmi exprimovanými v transgénomnom jačmeni (Wan a Lemaux, vyššie; Funatsuki a Kihara, vyššie).

Expresné vektory môžu obsahovať aj gén, ktorý umožňuje selekciu transformovaných buniek, keď bol vektor úspešne integrovaný do bunky. Tieto gény môžu kódovať antibiotikovú alebo herbicidovú rezistenciu, napríklad neomycín fosfotransferázový (*npt*) alebo fosfinotrién acetyltransferázový (*bar*) gén. Keď sa exprimujú, takéto rezistenčné gény umožňujú rast transformovanej bunky v médiu obsahujúcom neomycín, respektíve bialofos (pozri napríklad Wan a Lemaux, vyššie; Funatsuki a Kihara, vyššie; Kjaerulff a ďalší, v P. Mathis, vyššie).

Po transformácii môžu bunky určitý čas rásť v selektívnych médiách a potom sa môžu kultivovať, aby sa umožnilo vytvorenie klíčkov, následne koreňových systémov a potom rastliniek. Úspešná procedúra na transformáciu jačmeňa bola vyvinutá Funatsukim a Kiharom (vyššie), kde sú výsledkom transformácie jačmenných protoplastov prostredníctvom PEG s expresnými vektormi obsahujúcimi neomycín fosfotransferázu a následnej selekcie v neomycíne rastliny, obsahujúce transgén. Ukázalo sa, že transgén sa integruje do genómu a väčšina transgénomnych rastlín exprimuje proteín kódovaný transgénom. Tieto rastliny boli schopné aj prenášať a exprimovať transgén po kríženíach.

Je zrejmé, že rôzne metódy transformácie, expresné vektory, promótoary, selektovateľné markery a podobne, sú známe a užitočné na transformáciu jačmeňa.

### **Mutagenéza jačmeňa**

*Lox-1* gén môže byť podrobený miestne špecifickej mutagenéze použitím chimérnych RNA/DNA oligonukleotidov. Ukázalo sa, že tieto chimérne RNA/DNA oligonukleotidy úspešne zavádzajú mutácie do rastlinných buniek (Zhu a ďalší, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8768-8773; a Beetham a ďalší, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8774-8778) a do cicavčích buniek (Yoon a ďalší, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 2071-2076) v požadovaných lokalitách. Chimérne RNA/DNA oligonukleotidy sa môžu transformovať do daných jačmenných protoplastov alebo buniek rôznymi spôsobmi, napríklad použitím PEG-sprostredkovanej transformačnej metódy, alebo transformačnej metódy prostredníctvom bombardovania časticami, ktoré sú opísané vyššie. Jednotlivé protoplasty alebo bunky sa potom môžu regenerovať tkanivovou kultiváciou na kompletne fertillné rastliny a mutovanie môže byť potvrdené a sledované napríklad použitím prístupu založeného na PCR, ako bude podrobne uvedené v nižšie v príkladoch.

Metóda miestne špecifickej mutagenézy môže byť použitá na mutovanie špecifických zvyškov v *lox-1* géne. *Lox-1* gén môže byť mutovaný v jednej alebo vo viacerých nukleotidových polohách v promótorovej oblasti, aby sa znížila alebo zrušila *lox-1* transkripcia. Špecifická mutagenéza sa môže aplikovať aj na zavedenie zmien do *lox-1* kódujúcej oblasti, napríklad na zníženie enzýmovej aktivity. Takéto mutácie zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na inzercie, delécie a substitúcie, ktoré vedú k posunu rámca, skráteniu LOX-1 proteínu a/alebo zmene neutrálnej a hydrofóbnej povahy enzýmovej substrátovej kavity.

### **Antisense expresia**

Redukcia *lox-1* expresie sa môže dosiahnuť aj prostredníctvom expresie *lox-1* antisense konštruktu v jačmenných bunkách. Metódy na expresiu antisense konštruktov v jačmeni na zníženie expresie cieľového proteínu boli zverejnené napríklad v Gilpin, M.J. a ďalší, 1998, v *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, G. Garab, vyd., zv. IV, 2983-2986; Kjaernulff a ďalší, 1995, v *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, P. Mathis, vyd., zv. II, 151-154).

Jačmenné bunky sa môžu transformovať s expresným konštruktom obsahujúcim antisense nukleokyselinovú sekvenciu. Expresný konštrukt produkuje antisense RNA molekulu schopnú špecificky sa viazať aspoň na časť mRNA produkovanej zo štandardného *lox-1* génu prostredníctvom komplementárneho párovania báz, a je schopný prerušiť zostrih pre-mRNA alebo transláciu tejto mRNA. Expresiu antisense nukleokyselinovej sekvencie môže poháňať konštitutívny alebo tkanivovo/časovo špecifický promótor.

### **Chemická mutagenéza**

Chemický mutagén azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ) bol bežne používaný na mutagenézu jačmeňa a je známe, že indukuje stabilné mutácie v DNA (kyselina deoxyribonukleová) sekvencii jačmenného genómu (Olsen a ďalší, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8043-8047). Na indukciu DNA mutácií môžu byť použité aj iné chemické mutagény (Rank, J. a ďalší, 1997, Mutat. Res. 390:121-7), ako napríklad etylmetánsulfonát (EMS), azidoglycerol (AG, 3-azido-1,2-propándiol), metylnitrózomočovina (MNU) a hydrazín kyseliny maleínovej (MH), ako aj UV žiarenie.

Ako je uvedené nižšie v príkladoch, na zrná jačmenných kultivarov (cv Vintage a Caruso sa pôsobilo azidom sodným a tieto kultivary sa rozmnožovali samoopelením až do 3. generácie (M3).

#### **4. Identifikácia a selekcia jačmeňa s nízkou aktivitou lipoxygenázy**

Identifikácia a selekcia rastlín jačmeňa, ktoré majú zníženú lipoxygenázovú izoenzymovú aktivitu v zrnách, sa môže dosiahnuť napríklad analýzou lipoxygenázovej aktivity. Enzymatické testy sa môžu použiť na determináciu aktivity dvoch hlavných lipoxygenáz, o ktorých je známe, že sa nachádzajú buď v zreľých, alebo v klíčiach zrnách, LOX-1, respektíve LOX-2.

Jeden selektívny test LOX-1 a LOX-2 je založený na oxidácii polynenasýtenej mastnej kyseliny lipoxygenázou a na spektrofotometrickej detekcii hydroperoxidového produktu takejto oxidácie. Špecifita tohto testu pre LOX-1 využíva výhodu komparatívnej necitlivosti LOX-1 voči inhibítoru, napríklad NDGA, vzhľadom na LOX-2.

Selektívny test sa môže dosiahnuť aj použitím imunoprecipitácie na selektívne odstránenie LOX-1 alebo LOX-2 z testu. Špecifické anti-LOX-1 a anti-LOX-2 protilátky, napríklad monoklonálne protilátky, sa môžu pripraviť z purifikovaného LOX-1 alebo LOX-2, ako je opísané v Holtman a ďalší, 1996, vyššie.

Tieto testovacie metódy sa môžu adaptovať pre mikrotitračné platňové testovacie postupy, alebo iné známe opakovacie testovacie formáty s vysokou účinnosťou, čo umožňuje rýchli skrining mnohých vzoriek. Tieto testy sa môžu upraviť na skrining kľúčových vrcholov kľúčiacich zrn nedeštruktívnym spôsobom tak, aby sa sadenice vybrané v skriningu mohli ďalej množiť.

Strata LOX-1 aktivity v domnelých mutantoch sa môže potvrdiť testom na enzymatickú aktivitu. Napríklad, extrakty zrn sa môžu inkubovať s kyselinou linoleovou a oxidačné produkty kyseliny linoleovej sa môžu analyzovať napríklad reverznou fázovou HPLC. Relatívne množstvá 9-HPOD a 13-HPOD vytvorených z kyseliny linoleovej poskytujú mieru LOX-1 aktivity, ktorej hlavným produktom je 9-HPOD.

Ako je ukázané nižšie v príkladoch, približne 20 000 zrn M3 generácie mutovaného cv Vintage a cv Caruso sa skrinovalo na LOX-1 a LOX-2 aktivitu oxidačným testom v prítomnosti inhibítora a aj prostredníctvom imunoprecipitačných testov. Použitím týchto skriningových metód sa našiel mutant v cv Vintage majúci veľmi redukovanú LOX-1 aktivitu a označil sa línia G. Mutantný fenotyp sa dedil v M4 a M5 generácii.

Semená produkované jačmeňom línie G sa uložili 4. januára, 2001 v National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB243RY, Škótsko, UK, v súlade s Budapeštianskou dohodou pod prístupovým číslom: NCIMB 41078.

## 5. Genetické sekvencie

Presný opis genotypovej zmeny, ktorá je zodpovedná za fenotyp nízkej lipoxygenázovej aktivity v jačmenných rastlinách podľa vynálezu, je užitočný na identifikáciu rastlín majúcich túto genetickú zmenu a na vkriženie tejto genetickej vlastnosti do iných jačmenných kultivarov v šľachtiteľskom programe. Rôzne známe

molekulárne a biochemické metódy môžu byť použité na determináciu genetických základov fenotypu s nízkou lipoxygenázovou aktivitou.

Je vo všeobecnosti akceptované, že tak *cis*-účinkujúce, ako aj *trans*-účinkujúce genetické sekvencie môžu determinovať expresiu daného génu v genóme a aktivitu génového produktu. Riadiace body v génovej expresii zahŕňajú reguláciu časovania, tkanivovej špecificity a rýchlosti génovej transkripcie, stabilitu transkriptu a rýchlosť translácie transkriptu. Tak úroveň génovej expresie, ako aj stabilita a špecifická aktivita kódovaného enzýmu budú determinovať úroveň enzymovej aktivity detegovanej v tkanive.

Zmeny v rastlinnej génovej sekvencii sa môžu determinovať DNA sekvenovaním známych relevantných častí genómu, zatiaľ čo Northern analýza poskytuje nástroj na monitorovanie hladín stabilných transkriptov v danom rastlinnom tkanive. Enzým exprimovaný v rastlinnom tkanive sa môže hodnotiť prostredníctvom extrahovania enzýmu z tkaniva a merania enzymatickej aktivity.

Ako je ukázané nižšie v príkladoch, identita genetických zmien, ktoré determinujú fenotyp mutantnej línie G s nízkou aktivitou lipoxygenázy indukovaný v cv Vintage, sa determinovala nasledujúcim spôsobom. Štrukturálny gén kódujúci LOX-1 proteín tak v rodičovskom cv Vintage, ako aj v línii G, sa amplifikoval polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) a protiprúdové promótorové sekvencie, ktoré regulujú expresiu génu, ako aj celá kódujúca sekvencia obsahujúca intrónové a exónové sekvencie sa sekvenovali.

Porovnanie nukleotidových sekvencií *lox-1* génu z línie G a zo štandardného cv Vintage odhalilo 2 nukleotidové substitúcie v 2 exónoch, z ktorých jedna (v polohe +2347) viedla k nekonzervatívnej aminokyselinovej substitúcii (glycín<sup>368</sup> → aspartát) v exprimovanom proteíne.

Obrázok 22 znázorňuje zoradenie sójových (Gm: *Glycine max. L*) lipoxygenáz LOX1 (prístup. č. P08170); LOX2 (prístup. č. P08170), LOX3 (prístup. č. AAB41272) a jačmenných (hv: *Hordeum vulgare*) lipoxygenáz LOX1 (prístup. č. P29114) a LOX2 (prístup. č. AAB70865.1). Konzervatívne aminokyselinové zvyšky a konzervatívne substitúcie nabitých zvyškov sú vytlačené tučne. Nad zoradením sú označené sekundárne štruktúry LOX3 zo sóje *Glycine max*, kde H = alfa závitnice a E = beta vlákna, a zvyšky relevantné pre funkciu enzýmu (označené hviezdičkou

alebo plným krúžkom) sú znázornené ako je opísané v Skrzypczak-Jankun a ďalší, 1997, *Proteins* 29:15-31.

Aminokyselinové zvyšky, ktoré sa podieľajú na viazaní iného ako hemoglobínového železa, alebo ktoré sú nevyhnutné pre katalýzu (\*) sójovej LOX3, zahŕňajú: H<sub>518</sub>, H<sub>523</sub>, H<sub>709</sub> [3N atómy]; N<sub>713</sub>, I<sub>857</sub>. Ekvivalentné zvyšky v jačmennej LOX1 sú H<sub>517</sub>, H<sub>522</sub>, H<sub>708</sub>, N<sub>712</sub> a I<sub>862</sub>. Zvyškami v sójovej LOX3 s predpokladanou úlohou pri katalýze (\*) sú: H<sub>266</sub>, H<sub>531</sub>, H<sub>776</sub>, F<sub>364</sub>, F<sub>272</sub>, F<sub>714</sub>, W<sub>519</sub>, R<sub>552</sub>, R<sub>726</sub>, D<sub>766</sub>, D<sub>779</sub>, K<sub>278</sub>. Ekvivalentnými zvyškami v jačmennej LOX1 sú: H<sub>261</sub>, H<sub>512</sub>, H<sub>775</sub>, F<sub>259</sub>, F<sub>267</sub>, F<sub>713</sub>, W<sub>518</sub>, R<sub>551</sub>, R<sub>735</sub>, D<sub>778</sub> a K<sub>271</sub>.

Prolínové (P<sub>86</sub>, 109, 167, 171, 223, 234, 291, 311, 324, 343, 345, 371, 381, 382, 426, 541, 548, 600, 616, 627, 685, 726, 734, 788, 829, 833, 839, 857) a glycínové (G<sub>49</sub>, 67, 68, 70, 91, 107, 137, 187, 192, 210, 217, 218, 260, 306, 307, 336, 392, 409, 458, 474, 490, 569, 607, 674, 676, 720, 736, 783, 828, 850, 855) zvyšky (+) umiestnené v slučkách a v helixových krycích polohách v proteínových sekundárnych štruktúrach, môžu ulahčovať ostré otočky a skladanie peptidovej kostry.

Zo zoradenia príbuzných rastlinných lipoxygenáz vyplynulo, že glycín 368 v jačmennej LOX-1 je silne konzervatívny. Navyše, tento zvyšok, ktorý zodpovedá glycínu 353 v sójovej LOX-1, je jedným z 35 vysoko konzervatívnych zvyškov z celkovo 58 zvyškov, ktoré lemujú substrátovú dutinu II enzýmu, ako je vidieť z kryštálovej štruktúry. Tieto konzervatívne zvyšky sú zvýraznené (boxy) v zoradení rastlinných lipoxygenázových sekvencií znázornených na obrázku 22 (Minor a ďalší, 1996, *Biochemistry* 35: 10687-10701) a zahŕňajú nasledujúce jačmenné LOX-1 zvyšky: Y<sub>234</sub>, L<sub>268</sub>, W<sub>364</sub>, G<sub>368</sub>, V<sub>369</sub>, N<sub>370</sub>, I<sub>374</sub>, L<sub>424</sub>, L<sub>499</sub>, K<sub>501</sub>, A<sub>503</sub>, V<sub>504</sub>, D<sub>508</sub>, S<sub>509</sub>, H<sub>512</sub>, Q<sub>513</sub>, L<sub>514</sub>, H<sub>517</sub>, W<sub>518</sub>, H<sub>522</sub>, I<sub>556</sub>, L<sub>559</sub>, A<sub>560</sub>, L<sub>564</sub>, I<sub>565</sub>, I<sub>570</sub>, T<sub>574</sub>, S<sub>585</sub>, Q<sub>715</sub>, Y<sub>718</sub>, N<sub>724</sub>, R<sub>725</sub>, P<sub>726</sub>, T<sub>727</sub>, L<sub>772</sub> a I<sub>862</sub>. Všetky okrem 7 z 35 konzervatívnych zvyškov sú neutrálne alebo hydrofóbne zvyšky. Je pravdepodobné, že substitúcia nabitého zvyšku v polohe glycín 368 v jačmeni alebo iného konzervatívneho neutrálneho alebo hydrofóbneho zvyšku lemujúceho substrátovú dutinu II poruší štruktúrne a funkčné vlastnosti enzýmu. G→D168 mutácia v jačmennej LOX1(♦) línie G je lokalizovaná medzi alfa závitnicou H6 a beta vláknom E12.

Ako je znázornené na obrázku 22, lipoxygenázová rodina enzýmov zdieľa vysoký stupeň sekvenčnej konzervatívnosti, ktorá sa odráža v konzervatívnej sekundárnej štruktúre determinovanej pre niekoľko členov rastlinnej lipoxygenázovej

rodiny vrátane sójovej LOX1 a LOX3 (Skrzypczak-Jankum a ďalší, 1997, vyššie). Jačmenná LOX1 zdieľa 56,9% sekvenčnú identitu a 67,8% sekvenčnú podobnosť so sójovou LOX3. Niekoľko aminokyselinových zvyškov v sójovom LOX3 izoenzýme bolo identifikovaných ako ligandy pre iné ako hemoglobínové železo, alebo sú navrhnuté ako nevyhnutné pre jej aktivitu (označované s \* •). Vzhľadom na vysokú sekvenčnú konzervatívnosť medzi jačmennou LOX1 a sójovou LOX3 je opodstatnené predpokladať, že zvyšky v jačmennej LOX1 sekvencii, ktoré sú homologické so zvyškami identifikovanými ako dôležité pre funkciu LOX3, môžu byť tiež nevyhnutné pre enzymatickú aktivitu. Takže nekonzervatívne aminokyselinové substitúcie v ktorejkoľvek z týchto polôh, vrátane substitúcií týchto zvyškov v jačmennej LOX1, ktoré zodpovedajú 35 vysoko konzervatívnym zvyškom sójovej LOX3, ktoré lemujú substrátovú dutinu, a v iných polohách nevyhnutných pre enzymatickú aktivitu, pravdepodobne znižujú lipoxygénázovú aktivitu.

Je známe, že aminokyselinové zvyšky prolín a glycín uľahčujú otáčanie v peptidovej väzbe, keď sú umiestnené medzi sekundárnymi štruktúrnymi elementmi, ktoré umožňujú proteínu zaujať poskladanú terciárnu štruktúru. Prolínové a glycínové zvyšky sú bežné aj v závitnicových ukončovacích motívoch (Parker a Hefford, 1997, *Protein Eng.*, 10: 487-496, <http://www.expasy.ch>). Jediná nekonzervatívna substitúcia v LOX1 línie G, kde je glycín umiestnený medzi dvoma predpokladanými štruktúrnymi elementmi nahradený aspartátom, vedie k významnej strate enzymovej aktivity. Takže sa predpokladá, že mutácia v *lox-1* géne spôsobujúca nekonzervatívne aminokyselinové substitúcie v jednom alebo vo viacerých z prolínových alebo glycínových zvyškov v jačmennej LOX1, ktoré sú umiestnené v oblastiach mimo štruktúrnych elementov, môže podobne zabraňovať poskladaniu natívneho proteínu a tým redukovať aktivitu kódovaného enzýmu.

Takže v jednom uskutočnení obsahuje užitočná mutantná jačmenná rastlina podľa vynálezu, majúca zníženú aktivitu lipoxygénázy 1, mutovanú nukleokyselinovú sekvenciu, ktorá mení neutrálnu alebo hydrofóbnu povahu substrátovej dutiny enzýmu prostredníctvom inzercie jednej alebo viacerých kyslých, zásaditých alebo polárnych aminokyselín. Napríklad, užitočná nukleokyselinová sekvencia [sekv. č. 11] kóduje jačmenný LOX-1 proteín [sekv. č. 12] majúci

substitúciu aminokyseliny 368 z glycínu na Xaa, kde Xaa znamená kyslú, zásaditú alebo polárnu aminokyselinu. Jednou konkrétnou aminokyselinovou sekvenciou jačmennej mutantnej LOX-1 podľa vynálezu je sekvencia, v ktorej Xaa znamená kyselinu asparágovú, napr. línia G.

Ako je ukázané nižšie v príkladoch, genotypové zmeny v línii G nemali detegovateľný vplyv na *lox-1* génovú expresiu, ale LOX-1 aktivita detegovaná v zreých a klíčiach zrnách línie G predstavovala približne 9 % aktivity detegovanej v zrnách rodičovskej línie cv Vintage. Aby sa poskytol priamy dôkaz, že aminokyselinová mutácia v LOX-1 línie G je zodpovedná za fenotyp nízkej aktivity LOX-1, kódujúca sekvencia línie G *lox-1* a cv Vintage *lox-1* sa prechodne exprimovala v protoplastoch z jačmenného aleurónu, a ukázalo sa, že aktivita mutantného LOX-1 enzýmu je silno redukovaná v porovnaní so štandardným LOX-1 enzýmom.

## 6. Prenos medzi šľachtenými líniami

Detekcia zmien v genetickom charaktere jačmenných rastlín s genotypom podľa vynálezu je užitočná na identifikáciu prítomnosti špecifického genetického znaku v jačmennej línii a na uľahčenie prenosu tohto znaku medzi šľachtenými líniami v šľachtiteľskom programe. Na detekciu zmien v genomickej sekvencii sú dostupné rôzne molekulárne nástroje. Takéto metódy zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na detekciu polymorfizmov v dĺžke restričných fragmentov (Gebhardt a Salamini 1992, Int. Rev. Cytology., 135:201-237) a kvantitatívne detekčné metódy založené na PCR, ako napríklad amplifikácia použitím fluorescenčných primerov, napr. TaqMan primerových sondových systémov (Ibrahim a ďalší, 1998, Anal. Chem 70, 2013-2017). Voľba detekčnej metódy bude závisieť na špecifickom genetickom znaku, ale prednostne by mala byť rýchla a mala by poskytovať jasne interpretovateľné údaje.

Ako je ukázané nižšie v príkladoch, na detekciu mutantného lipoxygénázového-1 génu v línii G bol použitý PCR test so štiepením amplifikovaného polymorfného miesta (PCR-CAPS). Nukleotidová substitúcia v *lox-1* géne v línii G v polohe +2347 zaviedla ďalšie miesto rozoznávané AafII restričnou endonukleázou, ktoré môže byť detegované v PCR-CAPS teste.

Vhodné detekčné metódy pre *lox-1* nie sú obmedzené na tento test, ale môžu byť rovnako dobre založené na TaqMan technológii a iných známych detekčných metódach.

Nižšie v príkladoch je tiež ukázaná aplikácia PCR-CAPS testu na 4 generácie šľachteného materiálu z programu spätného kríženia, kde sa fenotyp línie G s nízkou aktivitou lipoxygenázy systematicky spätne krížil do cv Alexis. Ukázalo sa, že dedičnosť fenotypu nízkej lipoxygenázovej aktivity sleduje dedičnosť *lox-1* génu, a fenotyp sa identifikoval ako recesívny a pozoroval sa len v línách homozygotných v *lox-1* géne.

Z toho vyplýva, že rastlinné potomstvo podľa vynálezu zahŕňa šľachtené línie, napríklad odvodené programom spätného kríženia, ktoré obsahujú mutantný *lox-1* a exprimujú fenotyp nízkej lipoxygenázovej aktivity.

## 7. Varenie

Jačmenné rastliny podľa vynálezu vrátane častí rastlín, rastlinného potomstva, zŕn a rastlinných produktov, ako napríklad sladu a sladiny, majúce nízku aktivitu lipoxygenázy 1, tu boli demonštrované ako užitočné na výrobu nápoja majúceho znížené hladiny voľného *trans*-2-nonenalu v priebehu primeraného času alebo v podmienkach zvýšenej skladovacej teploty, v porovnaní s nápojom vyrobeným so štandardnej kontrolnej jačmennej variety. Za účelom týchto porovnaní sa obsah síranu v pive udržiaval na 5 ppm alebo nižšie, pretože sa vie, že vysoké hladiny síranu v čase plnenia do fliaš dočasne oddŕajú objavenie sa voľného *trans*-2-nonenalu. Napríklad, pivo varené zo sladu získaného z tu opísanej mutovanej jačmennej línie G malo stabilizované organoleptické vlastnosti primerane dlhý čas, v porovnaní s pivom vareným zo sladu získaného z kontrolného, nemutovaného jačmeňa.

Varné testy a hodnotenie fľaškového piva poskytli najlepší spôsob na hodnotenie vplyvu rôznych ingrediencií na kvalitu a stabilitu výsledného piva. Na testovanie vplyvu rôznych jačmenných sladov je potrebné dostatočné množstvo jačmenného zrna na uskutočňovanie sladových a varných pokusov v pilotnom meradle a v polopriemyselnom meradle. V priebehu množenia jačmeňa je možné hodnotiť správanie sa jačmennej línie na poli. Sladové vlastnosti jačmennej línie sa

môžu hodnotiť počas vyrábania sladu v pilotnom alebo priemyselnom meradle, a výhodne by mali byť v súlade s národnými odporúčaniami pre kvalitu sladu, napr. s odporúčaniami Európskej konvencie pre varenie piva (Analytica-EBC/European Brewing Convention, 1998, Publ. Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Nemecko). Po varení v pilotnom alebo polopriemyselnom meradle sa pivo zabalí do hnedých fliaš a ochladí sa na 5 °C na optimálne skladovanie. V tomto štádiu sa čerstvé pivo môže analyzovať prostredníctvom trénovaných chuťových panelov schopných detegovať špecifické pivové chute vrátane nežiaducej chute zlúčeniny *trans-2-nonenalu*. Okrem toho sa pivo chemicky analyzuje na hlavné chuťové komponenty vrátane *trans-2-nonenalu*. Tieto metódy analýzy chute piva sa potom opakujú s pivom, ktoré prešlo rôznymi skladovacími podmienkami, o ktorých je známe, že odhaľujú stabilitu piva pri dlhom skladovaní, napríklad nútené starnutie.

Ako je uvedené nižšie v príkladoch, jačmenná línia G sa rozmnožovala niekoľko sezón na poli, aby sa na slad spracovalo 10 ton tejto línie v priemyselnej sladovni. V podobných podmienkach sa na slad spracovali kontrolné variety cv Vintage a cv Nevada, ktoré obe majú štandardný LOX-1 fenotyp. Vysušený slad z línie G a z kontrolných jačmenných kultivarov spadal do špecifikácii požadovaných pre polopriemyselné varné pokusy.

Varné pokusy sa uskutočňovali v 30hl meradle a hodnotenie čerstvo nafflaškovaných pív odhalilo, že piva varené tak zo sladu línie G, ako aj zo sladu z kontrolných kultivarov, majú obsah *trans-2-nonenalu* pod chuťovým prahom a chuťovým panelom boli považované na uspokojujúce. Na hodnotenie chuťovej stability piva sa použili dve ošetrenia núteného starnutia, buď uskladňovanie pri 37°C počas 7 dní, alebo uskladnenie počas 6 až 12 týždňov pri 30°C. Prostredníctvom hodnotenia chuťovým panelom, ako aj prostredníctvom hladiny voľného *trans-2-nonenalu*, sa zistilo, že chuťová stabilita piva vareného zo sladu línie G je vynikajúca oproti pivu z kontrolného sladu, a zistilo sa, že toto zlepšenie je štatisticky významné.

## Príklady uskutočnenia vynálezu

Predložený vynález je podrobnejšie definovaný nižšie v príkladoch. Malo by byť zrejmé, že príklady, hoci uvádzajú výhodné uskutočnenia, sú poskytnuté len ako ilustrácia.

### Príklad 1

#### **Skríning a selekcia lipoxygénázového izoenzýmu Mutanty z mutovaného jačmeňa**

##### 1. Mutagenéza jačmeňa

Zrná jačmeňa *Hordeum vulgare* cv Vintage a cv Caruso sa mutovali azidom sodným v súlade s publikovaným postupom (Kleinhofs a ďalší, 1978, Mutation Research 51: 29-35). Mutagenéza zavádza bodové mutácie do genomickej DNA, ktoré môžu viesť napríklad k aminokyselinovým zmenám v kódovaných proteínoch. Mutované M1 zrná sa množili dve generácie v skleníku a M3 zrná sa zozbierali na skríning. Pozorovaná frekvencia jednogénových znakových mutácií v M2 generácii podľa Kleinhofsa a ďalších, 1978, vyššie, je 1,0-2,7 mutantov na 10000 zrn z M2 generácie. Keďže väčšina génových mutácií je recesívna a detegovateľná len v homozygotnom stave, mutovaná populácia sa skrinovala v M3 generácii, kde bol očakávaný podiel homozygotných mutantných zrn vyšší. V mutovanom materiáli v M3 generácii bola očakávaná mutačná frekvencia 0,9 až 2,3 na 10000 zrn.

##### 2. Nedeštruktívny test lipoxygénázovej 1 (LOX-1) a lipoxygénázovej-2 (LOX-2) aktivity v M3 mutovaných zrnách

Vyvinul sa rýchly skrínovací postup na detekciu mutantných jačmenných zrn so zníženou LOX-1 aktivitou s nasledujúcimi kritériami:

Skríningový postup by nemal brániť rozmnožovaniu zrn/sadeníc; vybrané zrnové/sadenicové tkanivo by malo vykazovať kvantifikovateľné hladiny lipoxygénázovej aktivity; test by mal rozlišovať LOX-1 aktivitu od LOX-2 aktivity; a testovací postup by mal zahŕňať multiplicitné vzorky.

Hladiny lipoxygénázovej aktivity v rôznych tkanivách klíčiacych zŕn, konkrétne v klíčkovom, koreňovom a štítkovom tkanive embrya a v endosperme sa testovali nasledovne: Extrakty jačmenného sadenicového tkaniva sa pripravili homogenizovaním tkaniva v ľadovo vychladenej 20mM Tris-HCl, pH 7,5, obsahujúcej 2 mM  $\text{NaN}_3$  a 0,5 mM fenylmetylsulfonyl fluoridu (PMSF), nasledovalo odstránenie nerozpustného materiálu cetrifugáciou pri 1000 ot./min, 10 minút. Lipoxygénázová aktivita v 100  $\mu\text{l}$  extraktu sa testovala pri 25 °C pridaním 2,9 ml 20mM substrátu kyseliny linolovej, pripravenej dispergovaním 35  $\mu\text{l}$  kyseliny linolovej (voľná kyselina, L-1376, Sigma, USA) v 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  obsahujúcej 1% Tween 20. Reakcia sa sledovala spektrofotometricky, kde rýchlosť zvýšenia absorbancie pri 234 nm ( $A_{234}$  nm), v dôsledku vytvorenia konjugovaného diénu v hydroperoxidovom produkte, je úmerná prítomnej enzýmovej aktivite. Jedna jednotka lipoxygénázovej aktivity je definovaná ako  $\Delta A_{234} - 0,001$  na minútu v 3ml reakcii, rovná sa oxidácii 0,12  $\mu\text{mola}$  kyseliny linolovej.

Listové tkanivo zrna klíčiaceho 4 dni v tme malo najvyššie detegovateľné hladiny lipoxygénázovej aktivity (Holtman a ďalší, 1996, Plant Physiology 111: 569-576). Na nedeštruktívny lipoxygénázový skrínigový test sa preto vybrali listové vrcholy zo 4-dňových sadeníc. PH optimálne pre celkovú jačmennú lipoxygénázovú aktivitu sa testovalo v rozmedzí pH 4,5 až pH 9,0 a zistilo sa, že je ním pH 6,5. Takže 25mM HEPES tlmiavý roztok (pH 6,5) obsahujúci 0,2M kyselinu bórovú sa vybral pre skrínovací test.

Keďže v klíčkoch 4-dňových sadeníc bol imunologicky detegovaný tak LOX-1, ako aj LOX-2 enzým, (Holtman a ďalší, 1996, vyššie), použil sa LOX-1 a LOX-2 špecifický test. Zistilo sa, že lipoxygénázový inhibítor, kyselina nordihydroguaretová (NDGA), identifikovaná Eskinom a ďalšími, 1977, Crit. Rev. Food, Science and Nutrition 9: 1-40, je selektívnym inhibítorom jačmenných lipoxygénáz. NDGA v koncentrácii  $1 \times 10^{-5}$  M silno inhibuje purifikovanú jačmennú LOX-2, zatiaľ čo LOX-1 si zachováva 47% aktivitu (obrázok 1). Selektivita tohto inhibítora sa testovala v teste listových vrcholkov prostredníctvom determinácie pomeru 9-hydroperoxyoktadekanoidu (9-HPOD) k 13-hydroperoxyoktadekanoidu (13-HPOD), ktoré sú výsledkami oxidácie kyseliny linolovej prostredníctvom LOX-1, respektíve

LOX-2. V lipoxygénázovom teste cv Vintage listových vrcholov spadal podiel 13-HPOD po pridaní  $1 \times 10^{-5}$  M NDGA do rozsahu 24,5 % až 9,5 %.

Selektívny test na LOX-2 aktivitu v extraktoch z listových vrcholov bol založený na použití LOX-1 špecifickej monoklonálnej protilátky (5D2) (Holtman a ďalší, 1996, vyššie) na imunoprecipitáciu LOX-1 nachádzajúcej sa v extraktoch. Zvyšková lipoxygénázová aktivita detegovaná v extraktoch po LOX-1 precipitácii poskytla mieru LOX-2 aktivity. Účinnosť tejto imunoprecipitácie (opísanej nižšie) sa hodnotila kvantifikáciou zvyškovej LOX-1 a LOX-2 v extraktovom supernatante prostredníctvom ELISA testu použitím špecifických monoklonálnych protilátok proti LOX-1 (označovaná 5D2) a LOX-2 (označovaná 5.8) (Holtman a ďalší, 1996, vyššie). LOX-1 imunoprecipitácia z extraktov cv Vintage listových vrcholov odstránila 85 % LOX-1 proteínu a 15 % LOX-2 proteínu.

Imunoprecipitácia sa uskutočňovala v 96-jamkovej platni s jamkami s dnom v tvare V pridaním 5  $\mu$ l 5D2-potiahnutých Dynabeads (Dyna) a 75  $\mu$ l tlmivého roztoku [20mM Tris-HCl, pH 7,5, 1% v/v hovädzie telacie sérum (HyClone)] k 20  $\mu$ l každého extraktu listových vrcholov. Platňa sa inkubovala na trepačke pre titračné platne (MTS4, IKA, Labor Technik) 1 hodinu pri 4 °C. Imunoprecipitát sa peletoval centrifugáciou pri 4 °C v Sigma 302-K centrifúge 10 minút pri 2000 ot./min. Supernatant (70  $\mu$ l) z každej vzorky sa testoval na lipoxygénázovú aktivitu v 96 jamkovej platni s jamkami s plochým dnom, ako je opísané nižšie, ale s pridaním 100  $\mu$ l testovacieho tlmivého roztoku (25mM HEPES, 0,2M kyselina bórová, pH 6,5).

LOX-1 a LOX-2 testy sa adaptovali pre skriningovú metódu s vysokou účinnosťou. Vrcholy listov (1 cm) z ôsmich 4-dňových klíčiach zrn sa individuálne homogenizovali v 150  $\mu$ l ľadovo vychladeného tlmivého roztoku (20mM Tris-HCl, pH 7,5) 2 x 30 sekúnd v multi-jamkovom homogenizátore (Berg a ďalší, 1992, Electrophoresis 13: 76-81). Po 15 minútovej centrifugácii pri 3000 ot./min. sa 40  $\mu$ l supernatantu každého extraktu prenieslo na 96-jamkovú platňu s plochým dnom. Do každej jamky sa pridalo 170  $\mu$ l tlmivého roztoku (25mM HEPES, 0,2M kyselina bórová, pH 6,5,  $1 \times 10^{-5}$  M NDGA) a 10  $\mu$ l substrátu (20mM kyselina linolová) a potom sa inkubovalo 20 minút pri 25 °C. Reakcia sa ukončila pridaním 20  $\mu$ l

nasýteného roztoku jodidu draselného (KI) a inkubovalo sa ďalších 8 minút pri 25 °C. Výsledkom redoxnej reakcie medzi hydroperoxydiénmi a KI bol I<sub>2</sub>, ktorý bol monitorovaný prostredníctvom jeho extinkčného maxima pri 350 nm v snímači mikroplatí (Multiskan MCC/340).

### 3. Identifikácia potenciálnych lipogénových 1 mutantov v M3 a M4 zrnách mutagenizovaného jačmeňa

Zrná M3 generácie cv Vintage a cv Caruso sa uskladňovali 6,5 dňa pri 45 °C, aby sa ukončila dormancia, čo zaisťuje 95% frekvenciu klíčenia. M3 zrná cv Vintage (9318) a cv Caruso (9633) sa naklíchili a skrínováli sa na línie, ktorých LOX-1 aktivita bola 15% alebo ešte menšia v porovnaní so štandardnými zrnami. Predpokladané mutantné línie (50 cv Vintage a 42 cv Caruso línií) sa rozmnožovali v M4 generácii, zožali sa a naklíčené zrná sa znova skrínováli. Mutantný LOX-1 fenotyp sa potvrdil v jednej cv Vintage línií a v šiestich cv Caruso líniách po meraní lipoxygénovej aktivity v extraktoch 5 listových vrcholov z každej línie. Keď sa skúmali LOX-1 a LOX-2 aktivity v klíčiach embryách týchto 7 pravdepodobných mutantov, len cv Vintage mutant (označený Línia G) vykazoval značnú redukciu v LOX-1. V zrelých pokojných zrnách je lipoxygénovou aktivitou prítomnou v embryu takmer výlučne LOX-1 aktivita v dôsledku diferenciačného expresného vzoru týchto dvoch izoenzýmov (Schmitt a Van Mechelen, 1997, Plant Sci. 128: 141-150). Celková lipoxygénová aktivita v extraktoch embryí zo zrelých suchých zrn línie G (M5 generácia) bola  $0,05 \pm 0,04$  U/mg proteínu v porovnaní s  $0,74 \pm 0,44$  U/mg proteínu v cv Vintage embryových extraktoch, ako bolo determinované spektrofotometrickým lipoxygénovým testom opísaným v časti 2 príkladu 1. Zistilo sa, že zvyšková lipoxygénová aktivita v zrelých embryách línie G tak v M4, ako aj v M5 generácií je približne 9 % rodičovskej línie.

## **Príklad 2**

### **Línia G je cv Vintage mutant s fenotypom nízkej lipoxygénovej aktivity**

Agronomické vlastnosti a mutantný fenotyp línie G sa analyzovali v materiále M5 generácie. Počiatočné analýzy sa uskutočňovali na potvrdenie toho, že

analyzovaný M5 materiál je homozygotný pre mutantný fenotyp. Fenotyp nízkej aktivity LOX-1 v línii G, detegovaný v M3 generácii, by mohol byť výsledkom dominantnej alebo recesívnej mutácie. Ak by bola línia G vyselektovaná v M3 generácii heterozygotná pre dominantnú mutáciu, potom by nasledujúce generácie vykazovali segregáciu vo fenotype. Merala sa lipoxygénázová aktivita v 26 jednotlivých embryách z pokojných zŕn línie G M5 generácie a porovnávala sa s cv Vintage štandardnými embryami. Lipoxygénázová aktivita vo všetkých embryách línie G bola veľmi nízka, s priemerne  $0,06 \pm 0,04$  U lipoxygénázy na mg proteínu v porovnaní s  $0,74 \pm 0,44$  U lipoxygénázy na mg proteínu u štandardných cv Vintage embryí. Tieto údaje potvrdili, že línia G v M5 generácii je homozygotná pre znak nízkej lipoxygénázovej aktivity.

#### 1. Línia G má štandardnú fyziológiu rastu rastliny a vývoja zŕn

Zrná línie G a cv Vintage klíčili a rástli v klimatickej komore pri 16 hodinovom svetle a 15 °C a 8 hodinách tmy pri 12 °C, pri relatívnej vlhkosti 80 %. Rastové vlastnosti línie G a cv Vintage rastlín boli podobné čo sa týka výšky rastliny, počtu výhonkov na rastlinu, nástupu kvitnutia a počtu zŕn na klas. Veľmi podobná bola čerstvá hmotnosť (obrázok 2) a suchá hmotnosť (obrázok 3) zŕn línie G a štandardného cv Vintage v priebehu vývoja od 5 dní po kvitnutí (DAF) po úplnú zrelosť, približne 90 DAF.

#### 2. Zrná línie G majú fenotyp nízkej aktivity lipoxygénázy 1 v priebehu celého vývoja

Lipoxygénázová aktivita sa merala v extraktoch vyvíjajúcich sa jačmenných zŕn línie G (M5 generácie) a štandardného cv Vintage. Zrná sa homogenizovali v ľadovo chladenom 20mM Tris-HCl tlmivom roztoku, pH 7,5, obsahujúcom 0,1 % (v/v) Nonidet P-40, neiónový detergent, ktorý zvyšuje lipoxygénázovú extrakciu, a centrifugovali sa pri 15000 ot./min. 20 minút, aby sa odstránil nerozpustný materiál. Lipoxygénázová aktivita v extraktoch sa merala polarograficky v 200  $\mu$ l kyslíkom nasýteného tlmivého roztoku (0,2M kyselina bórová, 25mM HEPES, pH 6,5) obsahujúcom 1,2 mM kyseliny linolovej pri 25 °C, použitím Clark typu elektródy na meranie spotreby kyslíka. Lipoxygénázová aktivita sa zvýšila v priebehu prvých

20 dní vývoja zrna tak v línii G, ako a v štandardných zrnách, ale len v línii G úroveň aktivity prudko klesla v priebehu zretia zrna (obrázok 4).

Relatívne množstvá 9-HPOD a 13-HPOD vytvorených v priebehu oxidácie kyseliny linolovej, poskytujú mieru úrovni LOX-1 a LOX-2 aktivity v zrnových extraktoch. V tomto prípade bol vynechaný Nonidet P-40 zo zrnových extrakčných tlmivých roztokov, aby sa vylúčila koextrakcia enzýmov spotrebúvajúcich hydroperoxid. Extrakty (100  $\mu$ l), zmiešané s 10 ml 50mM fosfátového tlmivého roztoku, pH 6,5, obsahujúceho 200 $\mu$ M kyselinu linolovú sa inkubovali 20 minút. Reakcia sa ukončila nastavením pH na 3,5 a pridal sa interný štandard. Hydroxyperoxidázy vytvorené v teste sa naviazali na oktadecylovú kolónu na tuhej fáze (Bakerbond, Baker) a eluovali sa s metanolom. 9-HPOD a 13-HPOD sa potom oddelili reverznou fázovou HPLC na C-18 kolóne s izokratickým elučným rozpúšťadlom (zmes tetrahydrofurán:metanol:H<sub>2</sub>O:kyselina octová, 25:30:44,9:0,1 (v/v), ktorej pH bolo nastavené na 5,5 s koncentrovaným amoniakom) pri prietokovej rýchlosti 0,5 ml/minútu, ako je opísané v Aarle a ďalší, 1991, FEBS Letters 280: 159-162. Hydroperoxidy sa detegovali pri 234 nm a v HPOD vrcholoch sa upravovali oproti internému štandardu, prostaglandínu B2.

Obrázok 5 ukazuje, že 13-HPOD bol hlavným produktom lipoxygénázovej aktivity prítomnej v zrnách v priebehu prvých 20 DAF, zatiaľ čo 9-HPOD bol vytvorený prostredníctvom lipoxygénázovej aktivity v priebehu zretia zrn. Hoci tak extrakty zrn línii G, ako aj štandardných zrn zdieľali podobný profil 13-HPOD syntetizujúcej aktivity, línia G nevykazovala štandardné zvýšenie 9-HPOD syntetizujúcej aktivity. Tieto údaje sú v súlade so stratou LOX-1 aktivity u zreých jačmenných zrn línii G.

### 3. Zrná línii G majú fenotyp nízkej lipoxygénázovej 1 aktivity pri klíčení

Celková lipoxygénázová aktivita v extraktoch embryí zrn klíčiacich pri 15 °C sa testovala ako je opísané v príklade 1. Lipoxygénázová aktivita prítomná v pokojných štandardných zrnách klesala v priebehu prvých 4 dní klíčenia a potom sa zvyšovala (obrázok 6). V línii G bola lipoxygénázová aktivita v pokojných zrnách veľmi nízka, ale zvýšila sa po 4 dňoch.

Analýza HPODs vytvorených prostredníctvom lipoxygenázovej aktivity v klíčiach embryách ukázala, že 9-HPOD bol hlavným produktom lipoxygenáz prítomných v pokojových štandardných zrnách (obrázok 7). Úroveň vytvárania 9-HPOD bola v súlade s poklesom lipoxygenázovej aktivity v extraktoch. Zvýšenie lipoxygenázovej aktivity po 4 dňoch bolo sprevádzané vytváraním tak 9-HPOD, ako aj 13-HPOD. Nízka lipoxygenázová aktivita v pokojových zrnách línie G bola spojená s absenciou vytvárania HPOD, zatiaľ čo zvýšenie aktivity po 4 dňoch produkovalo najmä 13-HPOD. Tieto údaje poskytujú dôkaz, že LOX-1 aktivita vedúca k vytváraniu 9-HPOD je značne znížená v embryách tak vyvíjajúcich sa, ako aj pokojových, ako aj klíčiach jačmenných zrn línie G, zatiaľ čo LOX-2 aktivita, vedúca k vytváraniu 13-HPOD, sa v línii G nemení.

### Príklad 3

#### **Línia G má mutantný lipogenázový 1 gén (*lox-1*) čo spôsobuje fenotyp nízkej lipoxygenázovej aktivity**

Skúmal sa molekulárny základ fenotypu nízkej LOX-1 aktivity línie G, aby sa poskytol kompletný opis mutantu. Nasledujúce analýzy sa uskutočňovali na poskytnutie kompletnej charakterizácie fenotypu:

#### 1. Lipoxygenáza 1 sa syntetizuje vo vyvíjajúcich sa a v klíčiach zrnách línie G

Paralelne sa uskutočňovala Western blot analýza extraktov embryí z vyvíjajúcich sa a z klíčiach zrn, pričom sa merala lipoxygenázová aktivita, ako je opísané v príklade 2. Surové extrakty sa separovali polyakrylamidovou gélovou elektroforézou s dodecylsulfátom sodným (SDS-PAGE) podľa Laemmliho, 1970, Nature 227: 680-685. Separované proteíny sa preniesli na nitrocelulózu polosuchým blotom podľa Towbina a ďalších (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354. Blot sa sondoval s LOX-1 špecifickou monoklonálnou protilátkou, 5D2, ako je opísané v Holtman a ďalší, 1996, Plant Physiology 111: 569-576, v 500x riedení, potom nasledovala inkubácia s králičou anti-myšacou protilátkou spojenou s alkalickou fosfatázou a detekcia so substrátmi alkalickéj fosfatázy, nitro blue tetrazolium a 5-bróm-4-chlór-3-indolyl-fosfátom, ako je opísané v Holman a ďalší,

1996, *Plant Physiol.* 111: 569-576. Western analýza odhalila, že LOX-1 proteín bol detegovaný vo vyvíjajúcich sa zrnách od 10 DAV v cv Vintage embryách a hladina sa zvyšovala v priebehu zretia zrn (obrázok 8). Proteín bol prítomný aj v embryách cv Vintage pokojných zrn, ale pomaly klesal v priebehu líčenia (obrázok 9). Hoci LOX-1 je rozoznávaný v extraktoch embryí línie G a migruje v SDS-PAGE ako proteín s podobnou veľkosťou ako cv Vintage LOX-1, imonologicky detegovateľné hladiny proteínu v línii G boli mierne nižšie ako v cv Vintage.

## 2. *Lox-1* gén sa exprimuje vo vyvíjajúcich sa a v klíčiach zrnách línie G

Celková RNA sa izolovala z embryí vyvíjajúcich sa a klíčiach jačmenných zrn podľa postupu Hensgens a Van Os-Ruygrok, 1989, *Rice Genet. Newslett.* 6: 163-168, súčasne s meraním lipoxygénazovej aktivity ako je opísané v príklade 2. RNA vzorky (7,5 µg) sa separovali na denaturujúcich agarózových géloch a uskutočnil sa ich Northern blot, ako je opísané v Sambrook a ďalší, 1989 v *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY. Bloty sa hybridizovali s <sup>32</sup>P-značcou sondou generovanou z jačmennej 3' netranslatovanej oblasti, nukleotidy 2659-2801 [sekv. č. 1] *lox-1* cDNA (EMBL prístupové č. L35931), ako je opísané v Holtman a ďalší, 1996 *Plant Physiol.* 111: 569-576, použitím Amersham Random Prime kitu.

*Lox-1* transkripty kódujúce LOX-1 sa detegovali v embryách vyvíjajúcich sa a zreých cv Vintage zrn a zrn línie G od 30 DAF (obrázok 10). Hladiny *lox-1* transkriptov sa zvyšovali v priebehu klíčenia tak v cv Vintage embryách, ako aj v embryách línie G, z čoho vyplýva *de novo* expresia *lox-1* génu (obrázok 11). Keďže detegovateľné hladiny *lox-1* transkriptov boli podobné v embryách línie G a v cv Vintage embryách, ani zníženie *lox-1* transkripcie, ani stability transkriptu, nemôže byť zodpovedné za fenotyp nízkej lipoxygénazovej aktivity línie G.

## 3. *Lox-1* gén línie G kóduje mutantnú formu lipoxygénázy 1

Nukleotidové sekvencie *lox-1* génu línie G a cv Vintage sa analyzovali a porovnávali, aby sa determinoval molekulárny základ fenotypu nízkej LOX-1 aktivity línie G, ktorá sa vyznačuje normálnou transkripciou *lox-1* génu, ale zníženou akumuláciou a aktivitou exprimovaného lipoxygénazového enzýmu v zrnách.

Genomická DNA z línie G a zo štandardného cv Vintage sa izolovala z listového tkaniva sadeníc spôsobom opísaným v Pich a Schubert 1993, *Nucleic Acids Res.* 21: 3328. *Lox-1* gén v genomických DNA prípravkoch sa amplifikoval polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) použitím primerov založených na sekvencii jačmenného *lox-1* génu (Van Mecheim a ďalší, 1995, *BBA* 1254: 221-225; Rouster a ďalší, 1997, *Plant J.* 11: 513-523). Poloha a sekvencia oligonukleotidových primerov použitých na amplifikáciu *lox-1* promótoru a kódujúcich oblastí, označených na obrázku 12, boli nasledovné:

Priamy primer 5'-GAA AAG CTT GGA GGT AGA CGC TGC-3' [sekv. č. 2] a reverzný primer 5'-TAT AGG ATC CTT GTT CTT GGC CTC CTC TCC TCG-3' [sekv. č. 3] sa použili a PCR amplifikáciu *lox-1* promótorovej domény (-361 až +68) línie G a cv Vintage *lox-1*.

Priamy primer 5'-AGT GAA AAA CAG TGT GCT GGT G-3' [sekv. č. 4] a reverzný primer 5'-GGC TTA AAG AGC AAC TGC TGA-3' [sekv. č. 5] sa použili na PCR amplifikáciu *lox-1* kódujúcej oblasti línie G.

Priamy primer 5'-CAA GAT GCA TAT GCT GCT GGG AG-3' [sekv. č. 6] a reverzný primer 5'-CGA TGG TTT AAA TTA GAT GGA GAT GCT GT-3' [sekv. č. 7] amplifikovali prostredníctvom PCR cv Vintage *lox-1* kódujúcu oblasť.

PCR reakcie pozostávali z 250 ng genomickej DNA v 50 $\mu$ l objeme obsahujúcom 50 pmol primeru a 2 U *Pfu* DNA polymerázy (Promega) podľa inštrukcií dodávateľa enzýmov. PCR amplifikácie sa uskutočňovali v Stratagene Robocykleri: 1 minútu pri 94 °C, 1 cyklus; 1 minútu pri 94 °C, 2 minúty pri 62 °C a 5 minút pri 72 °C, 30 cyklov; 10 minút pri 72 °C, 1 cyklus. PCR produkty sa separovali na 1,2% agarózových géloch. DNA fragmenty zodpovedajúce dĺžkou amplifikovanej oblasti, sa purifikovali použitím Qiax II gélového extrakčného kitu (Qiagen) a klonovali sa do plazmidu pcDNA2.1 (Invitrogen). Nukleotidová sekvencia oboch vlákien klonovaného *lox-1* promótoru a kódujúcich oblastí sa determinovala použitím dideoxynukleotidovej reťazcovej terminačnej reakcie so špecifickými oligonukleotidovými primermi a analyzovala sa na ABI PRISM® 310 genetickom analyzátoe (PB Biosystems). Porovnávanie sekvencií sa uskutočňovali použitím

DNA STAR sekvenčného analyzačného softwarového balíka (DNA STAR Inc., USA).

Promótorová oblasť a intrón-exónová štruktúra jačmennej *lox-1* kódujúcej oblasti sú znázornené na obrázku 13 a boli odvodené z porovnávania nukleotidovej sekvencie štandardnej *lox-1* genomickej sekvencie a cDNA sekvencie (obrázok 12). Sekvenovaná oblasť *lox-1* promótorovej oblasti od -363 do +68 (číslované vo vzťahu k determinovanému transkripčnému štartovaciemu miestu; van Mechelen a ďalší, 1995, BBA 1254: 221-225) je dostatočná na riadenie embryo-špecifickej časovo regulovanej génovej expresnej charakteristiky natívneho génu (Rouster a ďalší, 1998, Plant J 15: 435-440). Promótor a transkribovaná oblasť štandardného *lox-1* génu [sekv. č. 8] má dĺžku 4663 nukleotidov a obsahuje 6 intrónov medzi 82. nukleotidom a 634. nukleotidom, ktoré chýbajú v príslušnej cDNA [sekv. č. 10] a musia byť preto odstránené v priebehu zostrihu RNA transkriptu.

Porovnanie nukleotidovej sekvencie *lox-1* línie G so štandardnou sekvenciou (obrázok 12) ukázalo, že *lox-1* alela línie G má dve bodové mutácie. Jedna je tichá C→T substitúcia v polohe 221 v exóne 1, a druhá je G→A substitúcia v polohe 2347 v exóne 3 (obrázok 13). Štandardný jačmenný *lox-1* gén kóduje proteín s 862 aminokyselinovými zvyškami [sekv. č. 9], zatiaľ čo mutácia v polohe 2347 v *lox-1* alele línie G spôsobuje aminokyselinovú substitúciu glycínu na kyselinu asparágovú vo zvyšku 368 v kódovanom proteíne.

Zo zoradenia príbuzných rastlinných lipoxygenáz vyplýva, že glycín 368 v jačmennom LOX-1 je silno konzervatívny. Navyše, tento zvyšok, ktorý zodpovedá glycínu 353 v sójovom LOX-1, je jedným z 51 neutrálnych alebo hydrofóbných zvyškov, ktoré lemujú substrátovú dutinu enzýmu, ako je vidieť na kryštálovej štruktúre (Minor a ďalší, 1996, Biochemistry 35: 10687-10701) a ako je vidieť na obrázku 22. Takže je pravdepodobné, že inzercia nabitého aminokyselinového zvyšku v tejto polohe porušuje štrukturálne a funkčné vlastnosti enzýmu.

4. Mutovaný LOX-1 proteín kódovaný *lox-1* alelou línie G má nízku enzymatickú aktivitu a je zodpovedný za fenotyp nízkej lipoxygenázovej aktivity línie G

Mutagenéza cv Vintage zrn azidom sodným, ktorá indukovala mutovanú *lox-1* alelu v línii G, mohla indukovať ďalšie mutácie v genóme línie G. Uskutočnili sa dva

experimentálne prístupy, aby sa demonštrovalo, že mutantná *lox-1* alela v línii G je zodpovedná za jej fenotyp nízkej lipoxygénazovej aktivity, a nie iné mutácie v genóme. Bola determinovaná enzymatická aktivita LOX-1 kódovaného mutantnou a štandardnou *lox-1* alelou, aby sa potvrdilo, že substitúcia glycín→kyselina asparágová v mutantnom enzýme spôsobuje zníženie stability a aktivity. Dva *lox-1* gény sa prechodne exprimovali v aleurónových protoplastoch izolovaných z napučaných zreých zrn, keďže sa očakávalo, že hladina endogénnej lipoxygénazovej expresie v týchto bunkách je pod detekčnými limitmi. Žiadny z identifikovaných jačmenných lipoxygénazových génov, ktoré sa exprimujú v kľíčiacom jačmeni, sa nedetegoval v aleurónovom tkanive (van Mechelen a ďalší, 1999, vyššie). Na riadenie prechodnej expresie *lox-1* génu v aleurónových protoplastoch sa ich kódujúce oblasti prechodne fúzovali s konštitutívnym promótorom, o ktorom je známe, že je aktívny v týchto protoplastoch.

Kódujúce oblasti mutantného (sekvenčné polohy +1 až +4350) a štandardného *lox-1* génu (sekvenčné polohy +69 až +4230) a štandardnej *lox-1* cDNA (sekvenčné polohy +69 až +2654), z ktorých každý bol klonovaný v plazmide pcDNA2.1 (pozri časť 3), sa vyrezali poštípením v *KpnI* a *EcoRV* miestach vo vektorovom polylinkeri. Kódujúce oblasti sa klonovali do pUBARN plazmidu (Jensen a ďalší, 1998, *Hereditas* 129: 215-225) medzi konštitutívne aktívny kukuričný ubiquitínový *Ubi* promótor (ako je opísaný v US patente č. 005510474A) a *Nos* terminátor, v mieste *bar* génu, ktorý kóduje fosfinotricín acetyltransferázu (obrázok 14).

Protoplasty sa izolovali z aleurónového tkaniva napučaného *Hordeum vulgare* cv Himalaya podľa protokolu podľa Skriver a ďalší 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7266-7270. Alikvoty  $2 \times 10^5$  protoplastov sa transfekovali pri 0 °C približne 100 µg plazmidovej DNA (ekvimolárne množstvá každého plazmidu) prostredníctvom polyetyléglykolom (PEG) sprostredkovaného príjmu DNA (Lee a ďalší, 1997, *Plant Mol. Biol.* 13: 21-29) a potom sa inkubovali v aleurónovom protoplastovom kultivačnom médiu pri 25 °C, ako už bolo opísané (Skriver a ďalší, 1991, vyššie). Po 48 hodinách inkubovania sa kultivačné médium opatrne odstránilo a protoplasty sa resuspendovali a homogenizovali v 300 µl lipoxygénazového testovacieho tlmivého roztoku (0,2mM kyselina bórová, 25mM HEPES, pH 6,5).

Homogenáty sa centrifugovali pri 15000 ot./min 5 minút, aby sa peletoval nerozpustný materiál a supernatanty (10  $\mu$ l) sa následne testovali na celkovú lipoxygenázovú aktivitu použitím rýchleho skriningového testu opísaného v príklade 1, časti 1, ale s vynechaním NDGA inhibítora. Obsah proteínu v protoplastových extraktoch sa meral prostredníctvom Bradfordovho farbičku viažuceho testu (Bradford 1976, Anal. Biochem., 72: 248), dodávaného od Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA, a lipoxygenázová aktivita sa vyjadrila na mg proteínu v extrakte.

Protoplasty transfekované s kontrolným plazmidom, pUBI-GUS, kde kukuričný ubiquitínový-1 promótor riadi expresiu  $\beta$ -glukuronidázového reporterového génu, neposkytli žiadnu detegovateľnú lipoxygenázovú aktivitu. Prechodná expresia štandardného *lox-1* génu ako aj cDNA v protoplastoch poskytli vysoké hladiny lipoxygenázovej aktivity v protoplastových extraktoch (obrázok 15). Vyššia expresia štandardnej *lox-1* cDNA v porovnaní s genomickou sekvenciou môže byť spôsobená vyššou transfekčnou frekvenciou menšieho *lox-1* cDNA expresného plazmidu (4929 bp versus 6505 bp *lox-1* génového konštruktú). Prechodná expresia mutantného *lox-1* génu poskytla nízke hladiny lipoxygenázovej aktivity, približne 10 % štandardnej lipoxygenázovej aktivity. Tieto údaje jasne demonštrujú, že mutantný *lox-1* gén v línii g kóduje lipoxygenázu so značne zníženou aktivitou, ktorá je zodpovedná za fenotyp nízkej lipoxygenázovej aktivity.

#### **Priklad 4**

##### **Test PCR-štiepenia amplifikovaných polymorfných miest (PCR-CAPS):**

##### **Spôsob použitý na identifikáciu mutantného *lox-1* génu**

Na základe PCR-CAPS testu bola vyvinutá analytická metóda umožňujúca identifikáciu mutantného *lox-1* génu línie G na akomkoľvek genetickom pozadí. Test zahŕňa PCR amplifikáciu genomických DNA fragmentov, po ktorej nasleduje štiepenie amplifikovaných sekvencií so špecifickou restriktívou endonukleázou, aby sa prejavil polymorfizmus v dĺžke restriktívnych fragmentov (RFLP).

Kódujúca sekvencia mutantného *lox-1* génu nesie dve bodové mutácie (pozri príklad 3), kde mutácia v polohe 2347 (obrázok 12) zavádza ďalšie *Aat II* miesto štiepené restričnou endonukleázou, ktoré sa nenachádza v štandardnom *lox-1* géne (obrázok 16). Ukázalo sa, že použitie PCR-CAPS testu, na základe polymorfizmu vytvoreného prítomnosťou tohto restričného miesta v *lox-1* géne, rozlišuje medzi štandardným *lox-1* génom a mutantným *lox-1* génom.

Genomická DNA sa izolovala z mladých listov M6 sadeníc *Hordeum vulgare* L. cv Vintage a línie G spôsobom podľa Picha a Schuberta (1993, vyššie). DNA sekvencia zahŕňajúca polohu 2347 (mutované miesto *lox-1* génu línie G) sa amplifikovala prostredníctvom PCR použitím primerov špecifických pre *lox-1* gén [sekv. č. 8]. DNA fragmenty, amplifikované prostredníctvom vybraného priameho primeru 5'-CGCTACGACGTCTACAACGC-3' [sekv. č. 13] a reverzného primeru 5'-CAGACTACTTTTGGCGGGA-3' [sekv. č. 14], sú znázornené na obrázku 17. PCR reakcie sa uskutočňovali s 250 ng genomickej DNA v 50 µl objeme obsahujúcom 50 pmol každého primeru a 1 jednotku Taq DNA polymerázy (Promega) podľa inštrukcií dodávateľov. PCR amplifikácie sa uskutočňovali v Stratagene Robocycleri nasledovne: 1 minúta pri 94 °C, 1 cyklus; 1 minúta pri 94 °C, 1,5 minúty pri 60 °C, a 2 minúty pri 72 °C, 30 cyklov; 10 minút pri 72 °C, 1 cyklus. Amplifikované fragmenty mutantného a štandardného *lox-1* génu majúce približne 650 bp (obrázok 18), zodpovedali očakávanej veľkosti (obrázok 17). PCR produkty, purifikované na centrifugačnej kolóne (Qiagen), sa štiepili s 25 jednotkami *Aat II* restričnej endonukleázy pri 37 °C a analyzovali sa na 1,2% agarózovom géli.

Výsledkom štiepenia štandardného *lox-1* PCR produktu boli DNA fragmenty s veľkosťou 10, 179 a 462 bp a fragmenty z mutantného *lox-1* PCR produktu mali dĺžku 10, 149, 179 a 313 bp, kde ďalší DNA fragment bol výsledkom čiastočného štiepenia *lox-1* PCR produktu (obrázok 19). Vzorka fragmentov zodpovedá očakávanému RFLP, ktorý je výsledkom tejto mutácie, kde 313bp fragment je jedinečný pre mutantný *lox-1*. Tento PCR-CAPS test poskytuje reprodukovateľný a špecifický nástroj na identifikáciu *lox-1* alely v jačmeni a môže tak byť využitý v programoch šľachtenia jačmeňa, ktorých cieľom je zavedenie tohto génu do nových jačmenných odrôd.

### Príklad 5

#### Spätné kríženie fenotypu nízkej lipoxygénázovej aktivity línie G s cv Alexis demonštruje genetickú väzbu na mutantný *lox-1* gén

Opakované spätné kríženie sa použije na prenos fenotypu nízkej lipoxygénázovej aktivity z línie G na rekurentného rodiča (v tomto prípade cv Alexis). Program spätného kríženia znázornený na obrázku 20 je kombinovaný so selekciou na fenotyp nízkej lipoxygénázovej aktivity, pričom sa progresívne substituuje genóm línie G rekurentným rodičovským genómom. Okrem toho sú eliminované iné mutácie zavedené do genómu línie G v priebehu mutagenézy s azidom sodným. V prvom spätnom krížení línie G homozygotnej v nízkej lipoxygénázovej aktivite (genotyp označený *ll*) s cv Alexis (genotyp označený *LL*) sú línie potomkov heterozygotné (genotyp označený *Ll*). Fenotyp nízkej lipoxygénázovej aktivity nebude v dôsledku recesívnej mutácie detegovateľný v líniiach heterozygotných pre mutáciu. Potomstvo je samoopelivé a poskytne populáciu v súlade s normálnou Mendeleovou segregáciou, konkrétne  $1LL:2Ll:1ll$ . Homozygotný *ll* genotyp s nízkym *lox*, ktorý je výsledkom prvého spätného kríženia, bude mať 50% cv Alexis genetické pozadie. Po desiatich kolách spätného kríženia bude rekurentné rodičovské pozadie približne 99,9 %.

*Hordeum vulgare*, L. cv Alexis a línia G sa množili v skleníku programom spätného kríženia. Zrná spätne kríženého potomstva sa nechali naklíčiť v Petriho miskách na filtračnom papieri, nechali sa nasiakávať 4 ml H<sub>2</sub>O 3 dni pri 22 °C v tme. Línie s nízkou lipoxygénázovou aktivitou sa skrínovali prostredníctvom merania celkovej lipoxygénázovej aktivity v extraktoch koleoptilu (vrcholových 7 mm) z klíčiach sadeníc, ako je opísané v príklade 1. Potomstvo 3. a 4. spätného kríženia sa analyzovalo aj na dedičnosť mutantného *lox-1* génu použitím PCR-CAPS testu opísaného v príklade 4.

Očakávaná frekvencia fenotypu s nízkou lipoxygénázovou aktivitou v segregujúcom potomstve štvrtých generácií spätného kríženia bola 25 % pre recesívnu mutáciu. Pozorovaná frekvencia nízkej lipoxygénázovej aktivity v potomstve (24 zrn) štyroch generácií spätného kríženia je v súlade s očakávanou frekvenciou (obrázok 20). Keď sa analyzovalo potomstvo 3. a 4. spätného kríženia,

majúce homozygotný // genotyp nízkej *lox*, s PCR-CAPS testom, pri všetkých sa zistilo, že majú diagnostický 313bp fragment, zatiaľ čo potomstvu so štandardnou lipoxygénázovou aktivitou tento fragment chýbal (obrázok 21).

Program spätného kríženia demonštruje, že mutantná *lox-1* alela sa môže prenášať do nového genetického pozadia a dedí sa recesívnym monofaktoriálnym spôsobom v súlade s Mendeleovou segregáciou. Keďže rekurentné rodičovské pozadie v potomstve 4. spätného kríženia je 93,8 %, spoločné dedenie mutantného *lox-1* génu a fenotypu nízkej lipoxygénázovej aktivity poskytuje potvrdenie ich genetickej väzby.

### Príklad 6

#### **Pivo varené zo sladu z jačmeňa línie G akumuluje menej *trans-2-nonenu* v priebehu uskladňovania, poskytujúc zlepšenú chuťovú stabilitu**

*Hordeum vulgare* L cv Vitage a línia G sa pestovali na poli niekoľko sezón, aby sa poskytlo dostatočné množstvo zrna na priemyselné spracovanie na slad. Na demonštráciu hodnoty jačmeňa línie G s nízkou lipoxygénázovou aktivitou pre zlepšenie chuťovej stability sa uskutočňovali nasledujúce testy výroby sladu a varenia piva v priemyselnom meradle, ako aj analýzy finálneho piva.

#### 1. Priemyselná výroba sladu a sušenie z línie G a cv Vintage

Výroba sladu sa uskutočňovala v 10-tonovom meradle v priemyselnej sladovni v dvoch pokusoch nasledovne:

##### Pokus 1: Jačmenné zrno línie G (žatva 1996)

Podmienky lúhovania: 8 hodín mokro; 14 hodín sucho; 8 hodín mokro; 10 hodín sucho; 4 hodiny mokro v 16°C luhovacej vode. Podmienky výroby sladu: 12 hodín pri 18 °C; 24 hodín pri 16 °C; 24 hodín pri 14 °C; 60 hodín pri 12 °C. Podmienky sušenia: 12 hodín pri 60 °C; 3 hodiny pri 68 °C; 4 hodiny pri 74 °C; 3 hodiny pri 80 °C.

Pokus 2: Jačmenné zrno cv Vintage a línie G (žatva 1996/1997)

Podmienky lúhovania: 8 hodín mokro; 10 hodín sucho; 6 hodín mokro; 15 hodín sucho; 4 hodiny mokro v 15°C luhovacej vode. Podmienky výroby sladu: 5 dní s privádzaním vzduchu pri 15 °C a sprejovanie na udržanie úrovne vlhkosti. Podmienky sušenia: 10 hodín pri 50 °C; 2 hodiny pri 60 °C; 2,5 hodiny pri 80 °C.

Analýzy sladu 2 vzoriek sladu línie G z pokusu 1, porovnávané s kontrolným sladom cv Nevada (tabuľka 1), a z pokusu 2 porovnávané s cv Vintage (tabuľka 2), potvrdili, že slad z línie G je vhodný na pokusy s varením piva.

Tabuľka 1

Výroba sladu Pokus 1				
Odroda jačmeňa		cv Nevada	Línia G	Línia G
Obilie z roku		1996	1996	1996
Analýzy sladu				
Obsah vlhkosti	%	4,7	4,3	4,4
Jemný extrakt ako is.	%ai.	76,9	76,1	75,3
Jemný extrakt d.m.	%dm.	81,4	79,5	78,7
Čas sacharifikácie	min	< 10	< 10	< 10
Diastická sila	%WK	252	373	365
Farba	EBC	2,8	4,4	3,8
pH		6,16	5,97	5,99
Zákal	EBC	9,0	2,5	2,4
Celkový proteín d.m.	%	10,35	10,74	12,03
Rozpustný dusík	mg/l	647	787	765
Rozp. proteín % slad d.m.	%dm.	3,7	4,4	4,3
Kolbach		35,3	40,8	35,4
Voľný aminonitrogén	mg/l	97	125	118
Drobivosť	%	89,5	85,6	89,5
Úplne nemodifikované zrná	%	1,1	0,6	0,5
Čiastočne nemodifikované zrná	%	2,3	1,0	0,6
$\beta$ -glukán v sladine	mg/l	114	66	36
$\beta$ -glukán v slade	% w/w	0,24	0,11	0,05
S-metylmationín/DMS eq.	$\mu$ g/g	2,4	6,4	8,4
Voľný DMS	$\mu$ g/g	1,0	6,6	4,7
NDMA	$\mu$ g/kg	n.d.	0,380,6	0,3/0,3

Tabuľka 2

Výroba sladu Pokus 1				
Odroda jačmeňa		Vintage	Línia G	Línia G
Obilie z roku		1996	1996	1997
Obsah vlhkosti	%	4,1	4,1	4,3
Jemný extrakt ako is.	%ai.	77,0	75,6	77,5
Jemný extrakt d.m.	%dm.	80,3	78,8	80,9
Jemný/hrubý rozdiel	% dm.	0,7	1,6	1,7
Čas sacharifikácie	min			< 10
Diastická sila	%WK	343	342	268
Farba	EBC	2,5	2,8	3,4
PH		6,05	6,01	6,12
Zákal	EBC	1,5	1,3	2,5
Celkový proteín d.m.	%	10,98	12,22	9,82
Rozpusťný dusík	mg/l	696	741	610
Rozp. proteín % slad d.m.	%dm.	3,9	4,1	3,4
Kolbach		35,2	33,7	34,6
Voľný aminonitrogén	mg/l	110	117	100
Drobivosť	%	91,3	81,8	89,5
Úplne nemodifikované zrná	%	0,7	1,1	1,3
Čiastočne nemodifikované zrná	%	1,0	2,7	2,7
$\beta$ -glukán v sladine	mg/l	97	172	117
$\beta$ -glukán v slade	% w/w	-	-	0,3
S-metylmationín/DMS eq.	$\mu$ g/g	-	-	-
Voľný DMS	$\mu$ g/g	-	-	-

## 2. Priemyselné varenie piva so sladom z línie G, cv Vintage sladom a kontrolným sladom cv Nevada

Uskutočnili sa dva varné pokusy použitím sladiny pripravenej z Línie G a kontrolného cv Nevada sladu v pokuse 1 a z línie G a kontrolného cv Vintage sladu v pokuse 2.

Pivo sa varilo v 30-hl priemyselnom meradle so 475 kg sladu podľa nasledujúcej schémy: Rmutovanie pri 50 °C; 30 minút pri 50 °C; 30 minút zahrievanie z 50 na 70 °C; 15 minút pri 70 °C. Časť sladiny sa zahrievala 20 minút zo 70 na 100 °C a 5 minút na 100 °C, zatiaľ čo zvyšný rmut sa udržiaval na 70 °C ďalších 25 minút a potom sa tieto dva rmuty spojili a udržiavali 10 minút na 76 °C. V súlade so štandardou praxou vo varení piva sa uskutočňovali kroky varenia sladiny, vírivej separácie použitých zŕn, ochladzovania, fermentácie, odležavania a balenia do fliaš z hnedého skla.

## 3. Chuťová stabilita a T2N obsah v pive varenom zo sladu z línie G, cv Vintage sladu a kontrolného cv Nevada sladu

Čerstvo naffaškované pivo sa uskladňovalo pri 5 °C a analyzovalo sa do 2 mesiacov od výroby. Chuťová stabilita čerstvého a skladovaného piva sa hodnotila v dvoch nezávislých laboratóriách po dvoch rozličných typoch skladovacích podmienok pre pivo. V laboratóriu A sa pivo podrobilo rýchlenému zostarovacímu procesu, pri ktorom sa pivo uskladňovalo pri 37 °C 7 dní, zatiaľ čo v laboratóriu B sa pivo uskladňovalo pri 30 °C 6 a 12 týždňov. Hladiny *trans*-2-nonenalu v pive sa determinovali plynovou chromatografiou a hmotnostnou spektrometrickou detekciou po derivatizácii karbonylov v *O*-(2,3,4,5,6-pentánfluórbenzyl)-hydroxylamíne, v podstate ako je opísané v Grönqvist a ďalší, 1993 Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo, 421-428. Panel trénovaný pre chuť piva hodnotil celkové chuťové skóre piva, ktoré zahŕňalo detekciu lepenkovej chuti, ktorá indikuje voľný *trans*-2-nonenal v pive.

#### Laboratórium A: Tolerancia pri rýchlennom starnutí

Porovnanie piva vareného zo sladu línie G a kontrolného cv Nevada sladu, v prvom varnom pokuse (tabuľka 3) demonštruje, že pivo z línie G malo vyššiu chuťovú stabilitu a nižší obsah *trans*-2-nonenalu po rýchlennom starnutí v porovnaní s kontrolami. Druhý pokus, porovnávajúci pivo varené zo sladu z línie G s pivom vareným z cv Vintage sladu, sladu z rodičovského kultivaru, potvrdil prvé údaje (tabuľka 4).

Tabuľka 3

Varný pokus 1		
Jačmenný slad	cv Nevada	línia G
SO <sub>2</sub> obsah (mg/ml)	1	1
T2N** (ppb) – čerstvé pivo	0,009	0,005
T2N** (ppb) –staré pivo (37 °C/7 dní)	0,117	0,025
Chuť* - čerstvé pivo	5,9	5,3
Chuť – staré pivo (37 °C/7 dní)	1,3	5,1

\*Chuťová hodnotová škála 1 až 10 zvyšujúcej sa kvality; \*\**trans*-2-nonenal

Tabuľka 4

Varný pokus 2		
Jačmenný slad	cv Vintage	línia G
SO <sub>2</sub> obsah (mg/ml)	2	2,5
T2N** (ppb) – čerstvé pivo	0,023	0,019
T2N** (ppb) –staré pivo (37 °C/7 dní)	0,078	0,035
Chuť* - čerstvé pivo	5,5	6,1
Chuť – staré pivo (37 °C/7 dní)	2,9	5,9

\*Chuťová hodnotová škála 1 až 10 zvyšujúcej sa kvality; \*\**trans*-2-nonenal

#### Laboratórium B: Tolerancia pri uskladňovaní pri 30 °C

Pivo uvarené zo sladu z línie G malo nižšie hladiny *trans*-2-nonenalu po 6 a 12 týždňov pri zvýšenej skladovacej teplote 30 °C, keď sa porovnávalo z pivom

vareným z jedného z referenčných sladov (tabuľky 5 a 6) a chuťovým panelom bolo posúdené, že malo lepšiu chuťovú stabilitu. Chuťový prah pre *trans*-2-nonenal v týchto analyzovaných pivách je v blízkosti 0,08 ppb.

Tabuľka 5

Varný pokus 1		
Jačmenný slad	cv Nevada	Línia G
<i>trans</i> -2-nonenal (ppb) – čerstvé pivo	0,050	0,044
<i>trans</i> -2-nonenal (ppb) – 30 °C/6 týždňov	0,072	0,037
<i>trans</i> -2-nonenal (ppb) – 30 °C/12 týždňov	0,095	0,046
<i>trans</i> -2-nonenalová chuť* – čerstvé pivo	0,6	0,3
<i>trans</i> -2-nonenalová chuť* – 30 °C/6 týždňov	3,7	1,4
<i>trans</i> -2-nonenalová chuť* – 30 °C/12 týždňov	2,5	0,6

\**trans*-2-nonenalové chuťové detekčné skóre v škále 1 až 10

Tabuľka 6

Varný pokus 2		
Jačmenný slad	cv Vintage	Línia G
<i>trans</i> -2-nonenal (ppb) – čerstvé pivo	0,070	0,062
<i>trans</i> -2-nonenal (ppb) – 30 °C/6 týždňov	0,093	0,070
<i>trans</i> -2-nonenal (ppb) – 30 °C/12 týždňov	0,133	0,080
<i>trans</i> -2-nonenalová chuť* – čerstvé pivo	0,3	0,9
<i>trans</i> -2-nonenalová chuť* – 30 °C/6 týždňov	2,5	1,7
<i>trans</i> -2-nonenalová chuť* – 30 °C/12 týždňov	2,2	1,3

\**trans*-2-nonenalové chuťové detekčné skóre v škále 1 až 10

Z kombinácie údajov z varných pokusov sa ukázalo, že zlepšená chuťová stabilita piva vareného zo sladu línie G, ako bola meraná prostredníctvom hladín *trans*-2-nonenalu detegovaných v pive po skladovaní pri 30 °C, je štatisticky významná (tabuľka 7).

Tabuľka 7

*Trans-2-nonenal* v skladovanom pive

Čerstvé	priemer	št. odch.	rozdiel	2-smer. p	Významnosť ( $p < 0,05$ )
Referencia	0,060	0,012	0,007	0,34	nie
lína G	0,053	0,011			

6 týždňov, 30°C	priemer	št. odch.	rozdiel	2-smer. p	Významnosť ( $p < 0,05$ )
Referencia	0,083	0,013	0,029	0,031	áno
lína G	0,054	0,021			

12 týždňov, 30 °C	priemer	št. odch.	rozdiel	2-smer. p	Významnosť ( $p < 0,05$ )
Referencia	0,114	0,023	0,051	0,003	áno
lína G	0,063	0,020			

Keďže hladiny prirodzeného sulfidu boli v oboch varných pokusoch nízke, hladiny voľného *trans-2-nonenalu* v starom pive tesne odrážajú *trans-2-nonenalový* potenciál rôznych pív, konkrétne hladinu *trans-2-nonenalových* aduktov nachádzajúcich sa v čerstvom pive. Pridanie sulfidu môže dočasne oddialiť proces tuchnutia prostredníctvom vytvárania komplexu s voľným *trans-2-nonenalom*, pokiaľ sú hladiny sulfidu redukované prostredníctvom oxidácie vďaka výmene plynov cez balenie.

Opísané varné pokusy so sladom z jačmeňa s nízkou aktivitou LOX-1 poskytujú prvý jednoznačný dôkaz toho, že LOX-1 aktivita v jačmeni v priebehu výroby sladu a varného procesu je kľúčovým determinantom objavenia sa nežiadúcej chuťovej zlúčeniny *trans-2-nonenalu* v starom pive.

Vyššie uvedený opis zahŕňa citácie mnohých publikácií. Každá publikácia je tu kompletné zahrnutá prostredníctvom jej citácie na všetky účely.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Jačmenná rastlina alebo jej časť, ktorá obsahuje mutovaný LOX-1 proteín, kde LOX-1 aktivita rastliny alebo rastlinnej časti je redukovaná alebo chýba v porovnaní s nemutovanou kontrolou.

2. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 1, kde LOX-1 aktivita zahŕňa katalyzovanie oxidácie voľných a esterifikovaných polynenasýtených mastných kyselín a polynenasýtených oktadekánových mastných kyselín, na vytvorenie derivátov 9-hydroperoxydovej mastnej kyseliny.

3. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 1 alebo 2, kde LOX-1 proteín je kódovaný mutovanou *lox-1* nukleokyselinovou sekvenciou majúcou jednu alebo viacero mutácií.

4. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 3, kde jedna alebo viacero mutácií je indukovaná chemickou mutagenézou alebo žiarením.

5. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 3 alebo nároku 4, kde jedna alebo viacero mutácií je/sú indukovaná/indukované miestne špecifickou mutagenézou.

6. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 3 alebo nároku 4, kde uvedená jedna alebo viacero mutácií je umiestnených vo vnútri promótoru alebo transkribovanej oblasti *lox-1* nukleokyselinovej sekvencie.

7. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 6, kde mutáciou je nukleokyselinová substitúcia v polohe +2347 *lox-1* génu.

8. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde mutovaný LOX-1 proteín obsahuje kyslú, zásaditú alebo polárnu aminokyselinovú substitúciu jedného alebo viacerých konzervovaných neutrálnych

alebo hydrofóbných aminokyselinových zvyškov lemujúcich substrátovú dutinu štandardného jačmenného LOX-1.

9. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde mutovaný LOX-1 proteín obsahuje nekonzervatívne aminokyselinové substitúcie jedného alebo viacerých z nasledujúcich aminokyselinových zvyškov štandardného LOX-1: Y<sub>224</sub>, L<sub>268</sub>, W<sub>355</sub>, E<sub>364</sub>, G<sub>368</sub>, V<sub>369</sub>, N<sub>370</sub>, I<sub>374</sub>, L<sub>424</sub>, L<sub>499</sub>, K<sub>501</sub>, A<sub>502</sub>, V<sub>504</sub>, D<sub>508</sub>, S<sub>509</sub>, H<sub>512</sub>, Q<sub>513</sub>, L<sub>514</sub>, H<sub>517</sub>, W<sub>518</sub>, H<sub>522</sub>, I<sub>556</sub>, L<sub>559</sub>, A<sub>560</sub>, L<sub>564</sub>, I<sub>565</sub>, I<sub>570</sub>, T<sub>574</sub>, S<sub>585</sub>, Q<sub>715</sub>, Y<sub>718</sub>, N<sub>724</sub>, R<sub>725</sub>, P<sub>726</sub>, T<sub>727</sub>, L<sub>772</sub> a I<sub>862</sub>.

10. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 9, kde mutovaný LOX-1 proteín obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú ako sekv. č. 12, kde Xaa znamená kyslú, zásaditú alebo polárnu aminokyselinu.

11. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 10, kde Xaa znamená kyselinu glutámovú alebo kyselinu asparágovú.

12. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 11, kde Xaa znamená kyselinu asparágovú.

13. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, kde mutovaný LOX-1 proteín obsahuje nekonzervatívnu aminokyselinovú substitúciu jedného alebo viacerých nasledujúcich aminokyselinových zvyškov jačmenného LOX-1: H<sub>517</sub>, H<sub>522</sub>, H<sub>708</sub>, 712 a I<sub>862</sub>.

14. Jačmenná rastlina alebo jej časť podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, kde mutovaný LOX-1 proteín obsahuje nekonzervatívnu aminokyselinovú substitúciu jedného alebo viacerých nasledujúcich aminokyselinových zvyškov štandardného jačmenného LOX-1: H<sub>261</sub>, H<sub>512</sub>, H<sub>775</sub>, F<sub>259</sub>, F<sub>267</sub>, F<sub>713</sub>, W<sub>518</sub>, R<sub>551</sub>, R<sub>725</sub>, D<sub>778</sub> a K<sub>273</sub>.

15. Transgénna jačmenná rastlina alebo jej časť, ktorá obsahuje heterologickú nukleokyselinovú sekvenciu exprimujúcu antisense sekvenciu voči aspoň časti transkribovanej oblasti jačmenného *lox-1* génu, pričom táto heterologická sekvencia je operatívne spojená s génovou promótorovou sekvenciou a transkripčnou terminátorovou sekvenciou.

16. Transgénna jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 15, kde uvedený génový promótor riadi konštitutívnu expresiu antisense sekvencie.

17. Transgénna jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 15 alebo 16, kde uvedený génový promótor riadi tkanivovo špecifickú alebo časovo regulovanú expresiu operatívne pripojenej antisense sekvencie v tkanivách rastliny.

18. Transgénna jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 17, kde tkanivom je vyvíjajúce sa, klíčiace alebo zrelé embryotické tkanivo.

19. Transgénna jačmenná rastlina alebo jej časť podľa nároku 18, kde génovou promótorovou sekvenciou je promótor jačmenného *lox-1* génu alebo jeho časť.

20. Zrnové alebo rastlinné potomstvo produkované z jačmennej rastliny alebo jej časti podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 19.

21. Rastlinný produkt, vyznačujúci sa tým, že je vyrobený z jačmennej rastliny alebo jej časti podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 19 alebo zo zrnového alebo rastlinného potomstva podľa nároku 20.

22. Rastlinný produkt podľa nároku 21, vyznačujúci sa tým, že je ním slad.

23. Nápoj, vyznačujúci sa tým, že je vyrábaný použitím rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 22.

24. Pivo, vyznačujúce sa tým, že je vyrábané použitím rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 22.

25. Použitie rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 22 na prípravu nápoja vykazujúceho organoleptické kvality, ktoré ostávajú stabilné počas meranej periódy alebo pri zvýšených uskladňovacích teplotách, v porovnaní s nápojom pripraveným z rastlinného produktu nemutovanej kontroly.

26. Použitie jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 22 na výrobu nápoja.

27. Použitie jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 22 na výrobu sladu alebo piva.

28. Použitie jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 22 na stabilizáciu organoleptických vlastností vareného produktu v priebehu meranej časovej periódy v porovnaní s kontrolným vareným produktom produkovaným použitím nemutovanej jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu.

29. Použitie jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 22 na výrobu vareného produktu majúceho znížené hladiny voľného trans-2-nonenalu v priebehu meranej časovej periódy alebo v podmienkach zvýšenej skladovacej teploty, v porovnaní s kontrolným vareným produktom produkovaným použitím nemutovanej jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu.

30. Nápoj vyrobený z jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 22, vyznačujúci sa tým, že má znížený obsah *trans*-2-nonenalu v priebehu meranej časovej periódy alebo v podmienkach zvýšenej skladovacej teploty, v porovnaní s kontrolným vareným produktom produkovaným použitím nemutovanej jačmennej rastliny alebo jej časti, zrnového alebo rastlinného potomstva alebo rastlinného produktu.

31. Nápoj podľa nároku 30, vyznačujúci sa tým, že ním je pivo.

32. Spôsob výroby piva z jačmeňa, vyznačujúci sa tým, že jačmeň alebo jeho časť obsahuje mutovaný LOX-1 proteín, pričom LOX-1 aktivita uvedenej rastliny alebo rastlinnej časti je znížená alebo chýba v porovnaní s nemutovanou kontrolou.

33. Spôsob podľa nároku 32, vyznačujúci sa tým, že mutovaný LOX-1 proteín zahŕňa kyslú, zásaditú alebo polárnu aminokyselinovú substitúciu jedného alebo viacerých konzervovaných neutrálnych alebo hydrofóbných aminokyselinových zvyškov lemujúcich substrátovú dutinu štandardného LOX-1.

34. Spôsob podľa nároku 32 alebo 33, vyznačujúci sa tým, že mutovaný LOX-1 proteín obsahuje nekonzervatívne aminokyselinové substitúcie jedného alebo viacerých z nasledujúcich aminokyselinových zvyškov štandardného LOX-1: Y<sub>224</sub>, L<sub>268</sub>, W<sub>355</sub>, E<sub>364</sub>, G<sub>368</sub>, V<sub>369</sub>, N<sub>370</sub>, I<sub>374</sub>, L<sub>424</sub>, L<sub>499</sub>, K<sub>501</sub>, A<sub>502</sub>, V<sub>504</sub>, D<sub>508</sub>, S<sub>509</sub>, H<sub>512</sub>, Q<sub>513</sub>, L<sub>514</sub>, H<sub>517</sub>, W<sub>518</sub>, H<sub>522</sub>, I<sub>556</sub>, L<sub>559</sub>, A<sub>560</sub>, L<sub>564</sub>, I<sub>565</sub>, I<sub>570</sub>, T<sub>574</sub>, S<sub>585</sub>, Q<sub>715</sub>, Y<sub>718</sub>, N<sub>724</sub>, R<sub>725</sub>, P<sub>726</sub>, T<sub>727</sub>, L<sub>772</sub> a I<sub>862</sub>.

35. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 32 až 34, vyznačujúci sa tým, že mutovaný LOX-1 proteín obsahuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú ako sekv. č. 12, kde Xaa znamená kyslú, zásaditú alebo polárnu aminokyselinu.

36. Spôsob podľa nároku 35, vyznačujúci sa tým, že Xaa znamená kyselinu glutámovú alebo kyselinu asparágovú.

37. Spôsob podľa nároku 36, vyznačujúci sa tým, že Xaa znamená kyselinu asparágovú.

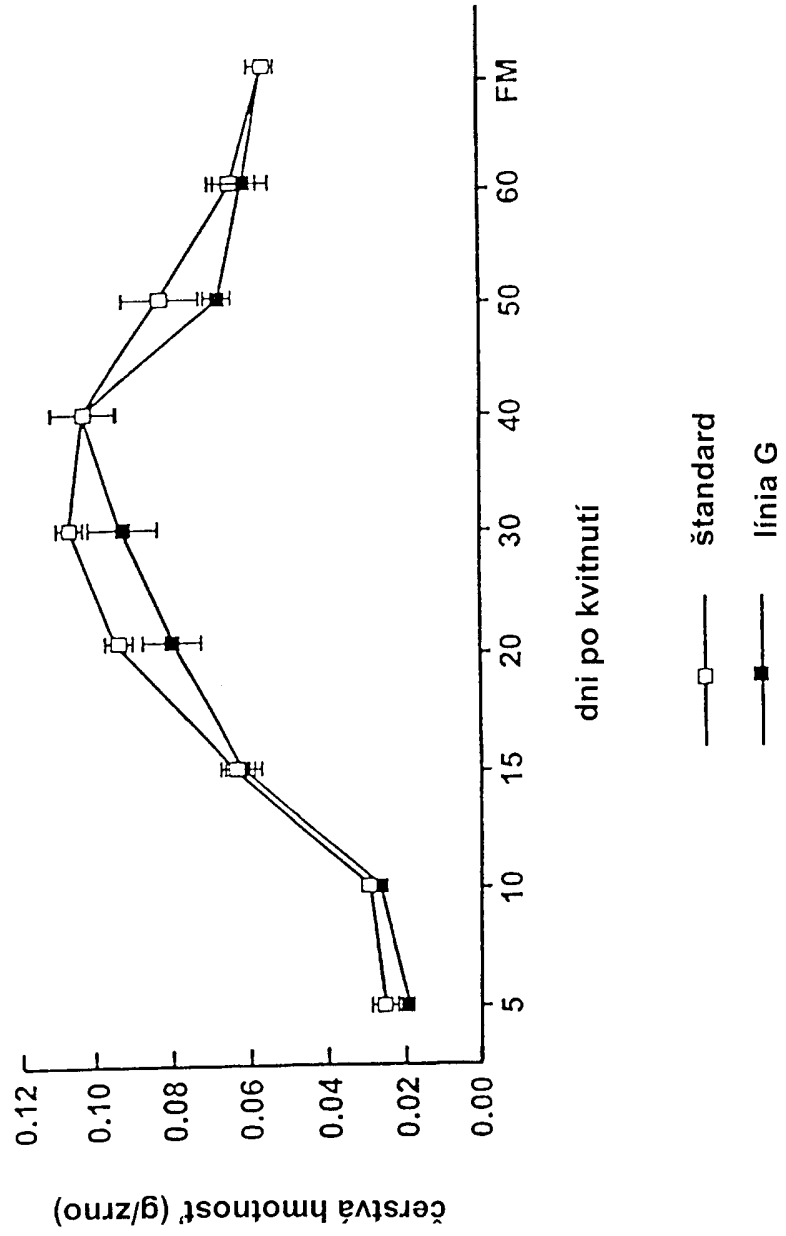
38. Spôsob podľa nároku 32, vyznačujúci sa tým, že mutovaný LOX-1 proteín obsahuje nekonzervatívnu aminokyselinovú substitúciu jedného alebo viacerých nasledujúcich aminokyselinových zvyškov jačmenného LOX-1: H<sub>517</sub>, H<sub>522</sub>, H<sub>708</sub>, 712 a I<sub>862</sub>.

39. Spôsob podľa nároku 32, vyznačujúci sa tým, že mutovaný LOX-1 proteín obsahuje nekonzervatívnu aminokyselinovú substitúciu jedného alebo viacerých nasledujúcich aminokyselinových zvyškov štandardného jačmenného LOX-1: H<sub>261</sub>, H<sub>512</sub>, H<sub>775</sub>, F<sub>259</sub>, F<sub>267</sub>, F<sub>713</sub>, W<sub>518</sub>, R<sub>551</sub>, R<sub>725</sub>, D<sub>778</sub> a K<sub>273</sub>.

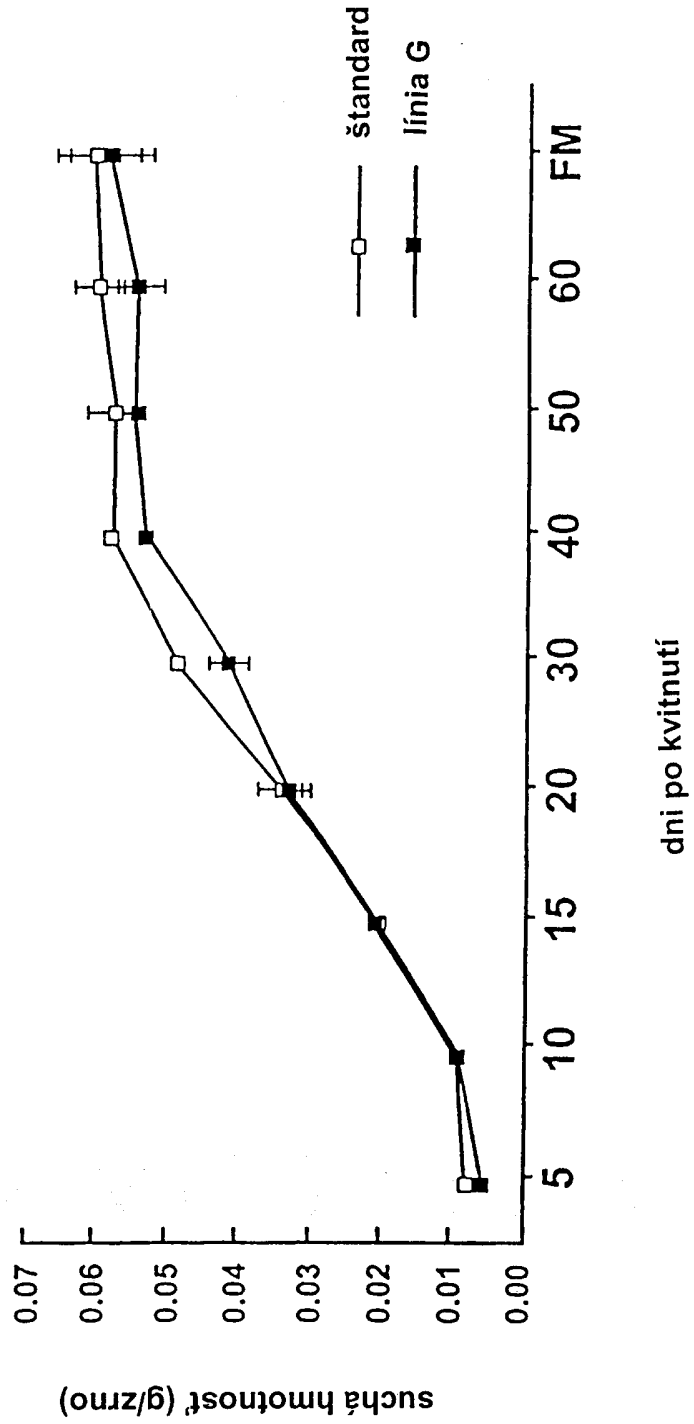
Obrázok 1



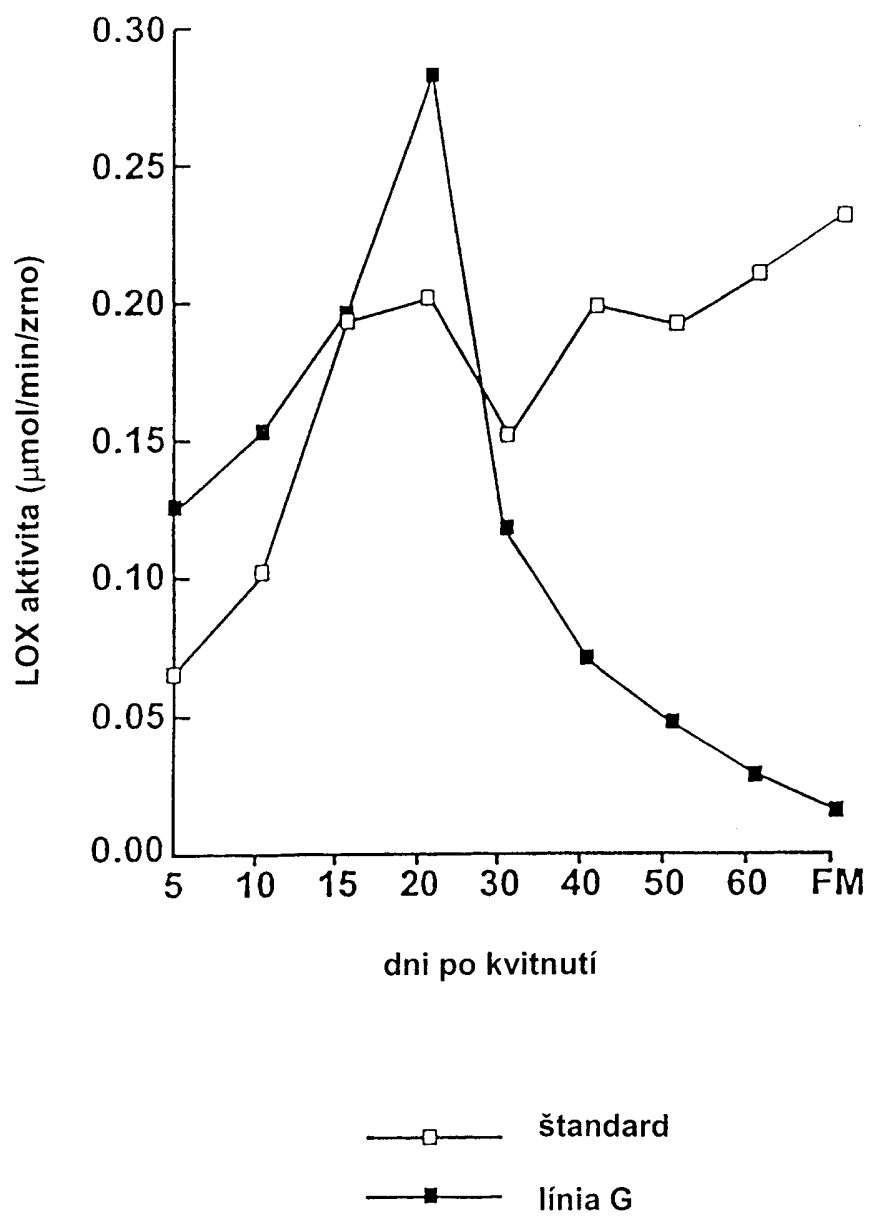
Obrázok 2



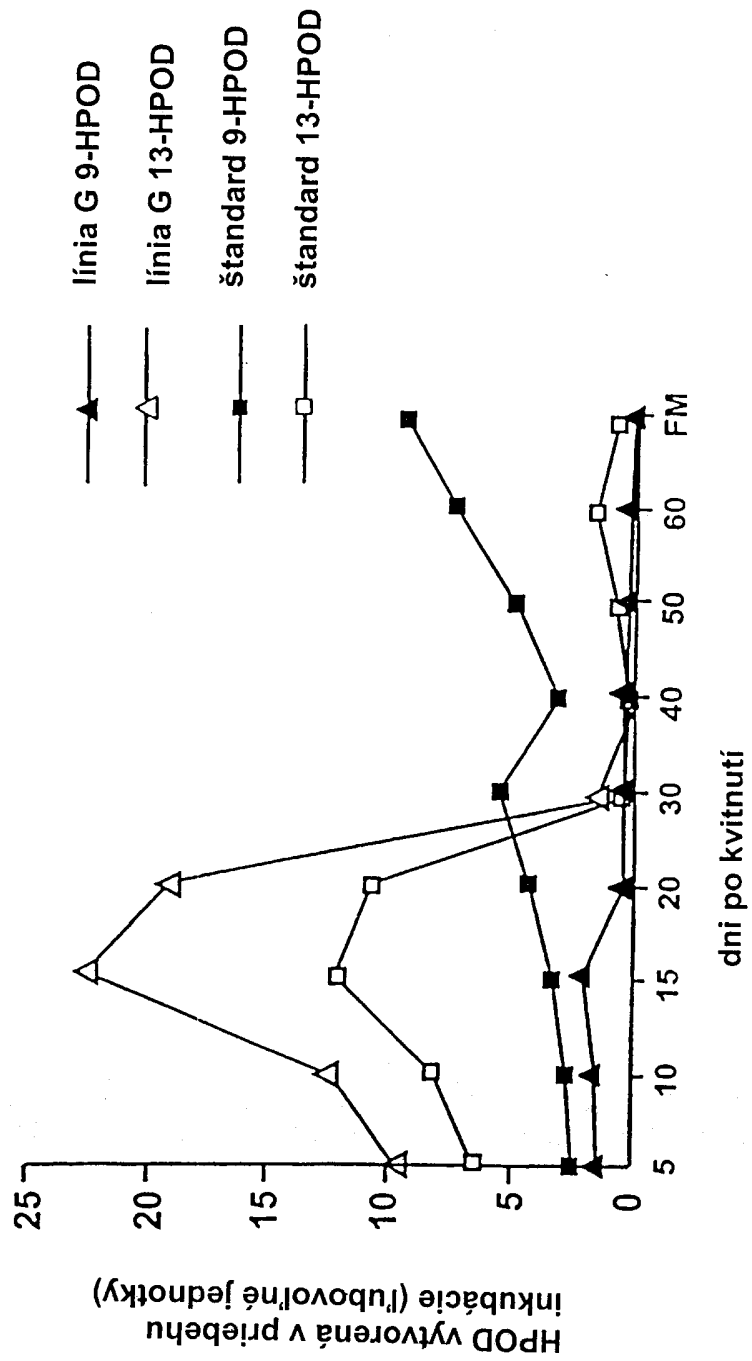
Obrázok 3



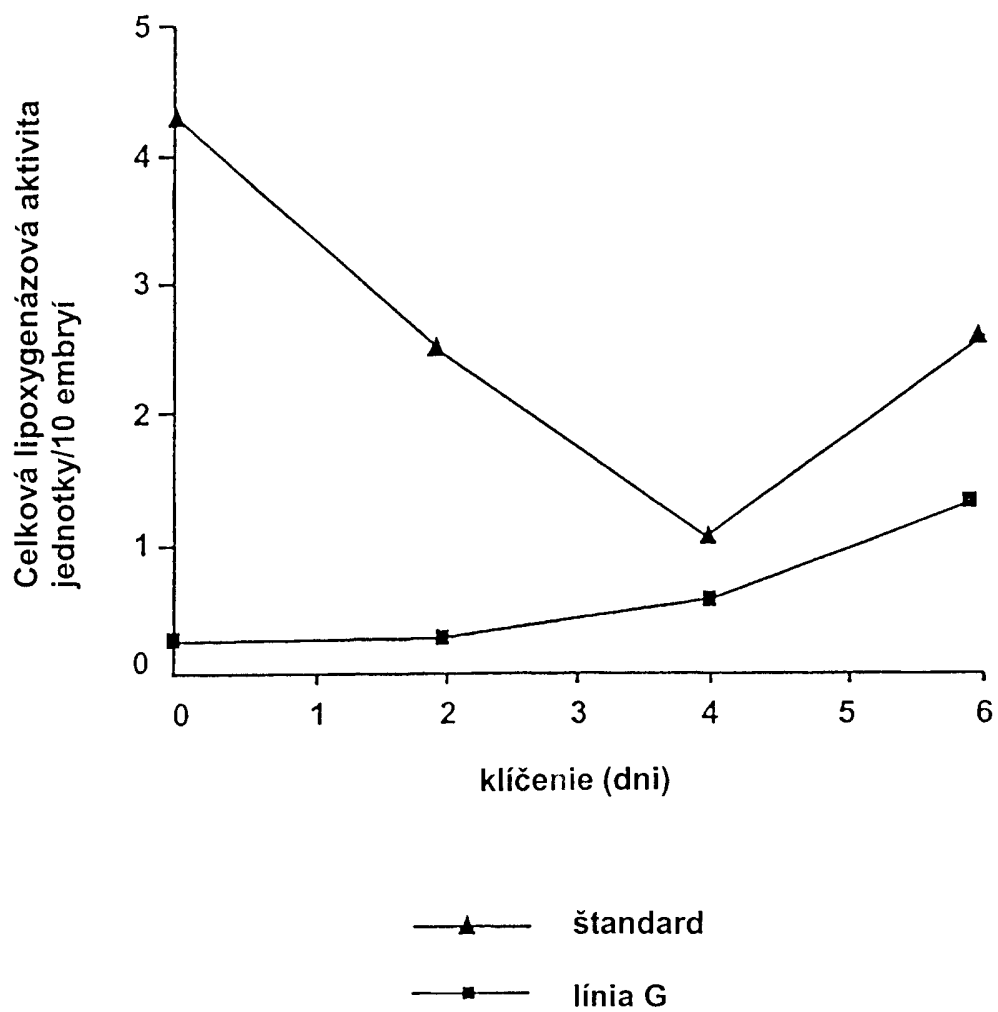
Obrázok 4



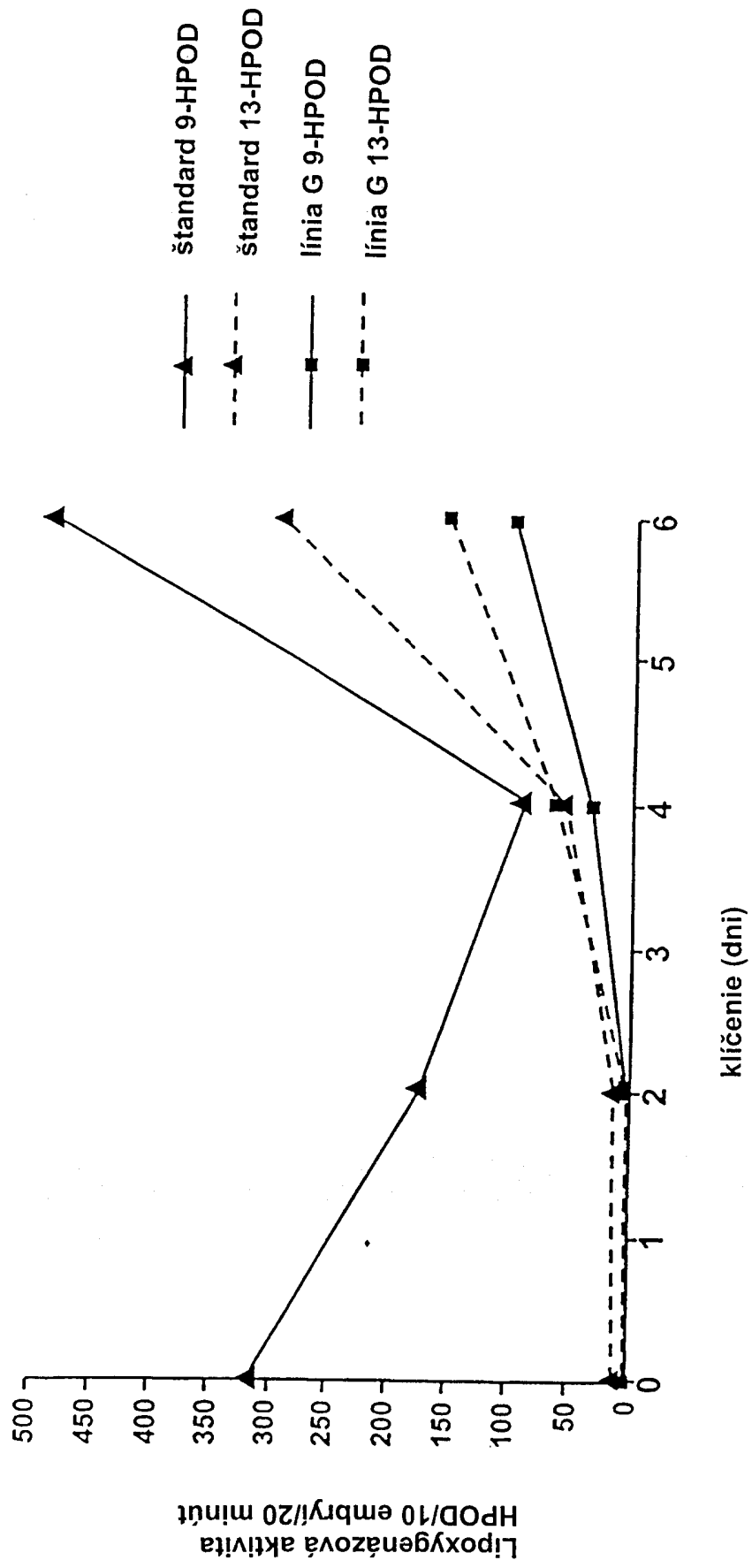
Obrázok 5



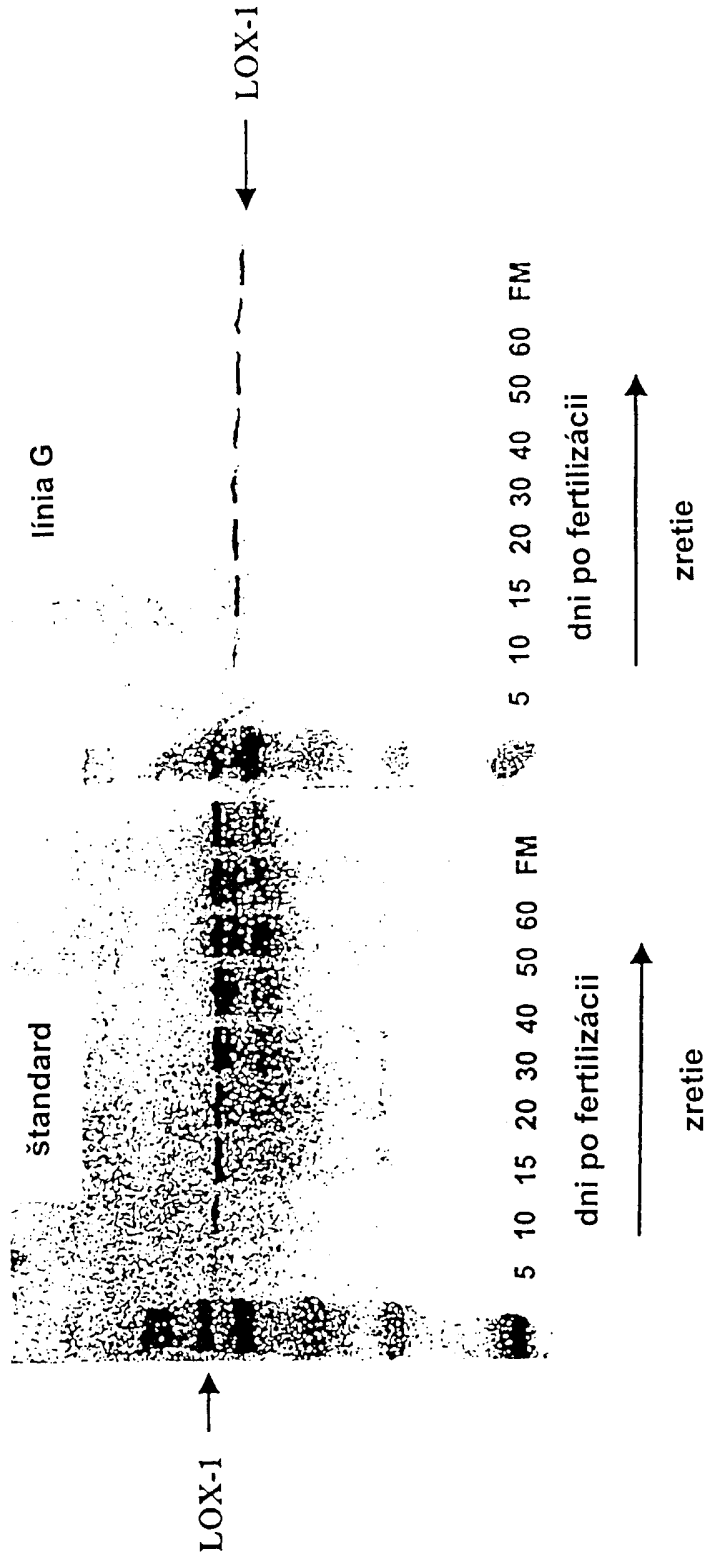
Obrázok 6



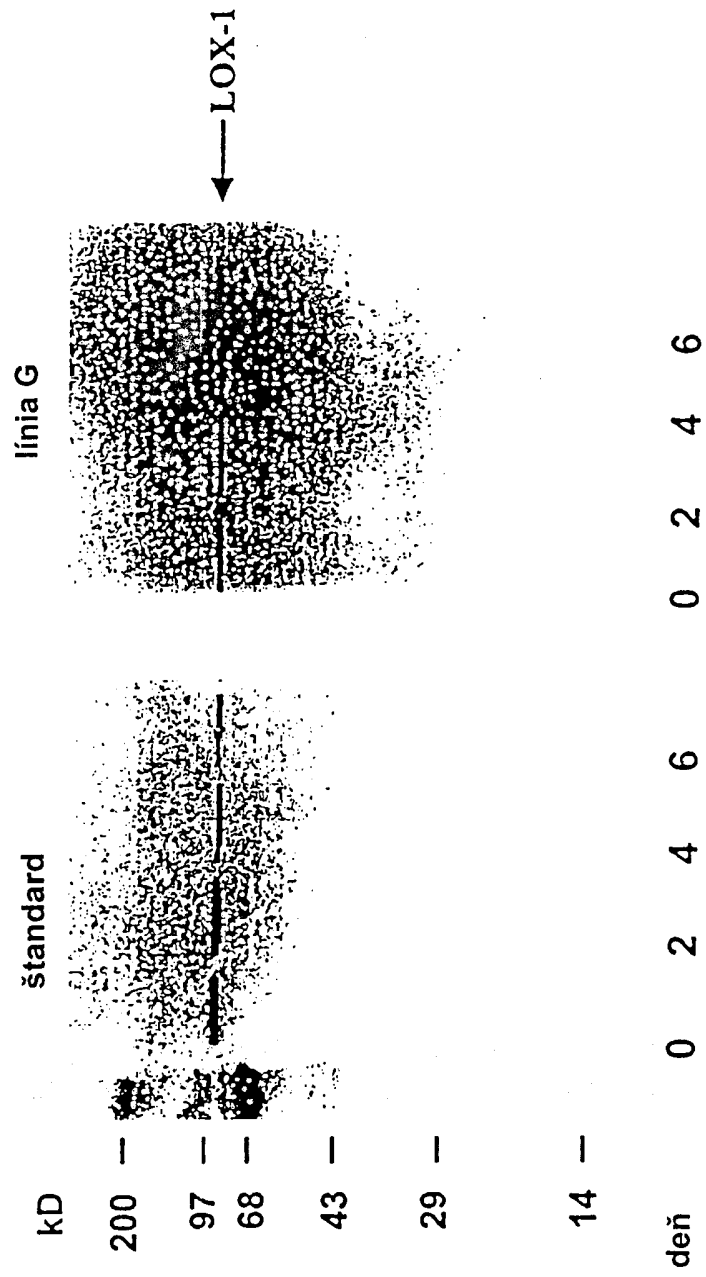
Obrázok 7



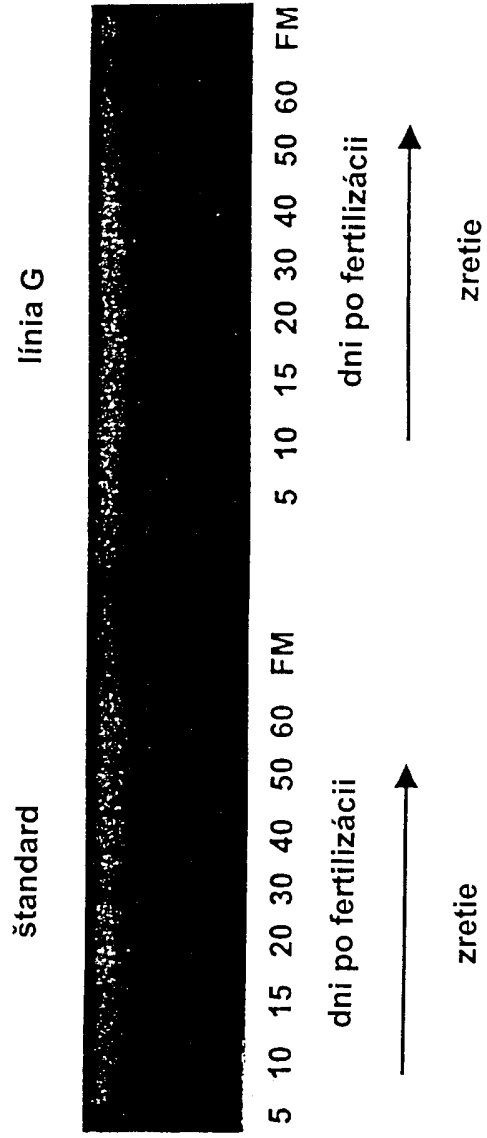
Obrázok 8



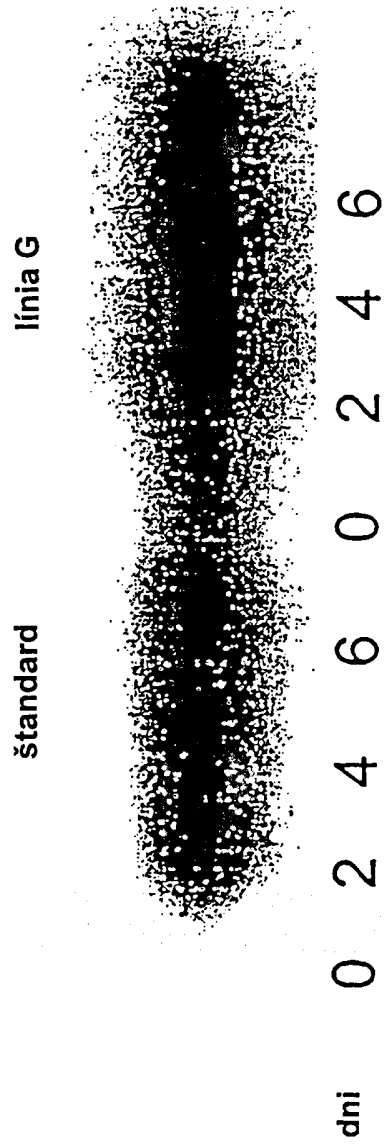
Obrázok 9



Obrázok 10



Obrázok 11



Obrázok 12A

(-288)      **promótor**

LG CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCACATGCAGTGCAGCCCAAGCACCGCTCGATGGCGGATCACCCGTCACG -208  
WT CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCACATGCACATGCAGTGCAGCCCAAGCACCGCTCGATGGCGGATCACCCGTCACG

LG GGACCCGGAGCGCCATGCCAAGCACGAGGGCACCGTCCCGCCGCGACCGTGGAGAGCACGTCGCCCGTCCG -128  
WT GGACCCGGAGCGCCATGCCAAGCACGAGGGCACCGTCCCGCCGCGACCGTGGAGAGCACGTCGCCCGTCCGCGCGTCCG

LG ATCCATCTCCAAAGCCGAGGCCACACCCGGACCCGGACCCGGCCCTATAAATTGCCCCGGACCCGAGCTGCAA -48  
WT ATCCATCTCCAAAGCCGAGGCCACACCCGGACCCGGACCCGGCCCTATAAATTGCCCCGGACCCGAGCTGCAA

**transkripčné štartovacie miesto (+1)**

LG GCAGCTCCTCACACACTCAGCAACACACATCCATCTTCACTGAAAAGTGA AAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG 32  
WT GCAGCTCCTCACACACTCAGCAACACACATCCATCTTCACTGAAAAGTGA AAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG

**translačné štartovacie miesto (+69) →**

LG GAGCAGTGAAAGCGGAGAGGAGGCCAAGAACAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGCGAACA 112  
WT GAGCAGTGAAAGCGGAGAGGAGGCCAAGAACAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGCGAACA

LG GAGCGCCCGGCTCAAGGCCACGGTGGTCTCATGCCCAAGAACGGTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG 192  
WT GAGCGCCCGGCTCAAGGCCACGGTGGTCTCATGCCCAAGAACGGTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG·

**(tichá mutácia)\***

LG ACGGCATCGGCGAGTTCCTCGGCAAGGGTGTCACTGCCAGCTTATCAGCTCCACCGCCGTCGACCAAGGTAATCACTAC 272  
WT ACGGCATCGGCGAGTTCCTCGGCAAGGGCGTCACTGCCAGCTTATCAGCTCCACCGCCGTCGACCAAGGTAATCACTAC

LG CCTCCTCCGGCCTTCTCCTCTGTTTACAAGATAATAGTATTTCTTCTGTGGCCGGCCCATGGATGGATGGATGTGT 352  
WT CCTCCTCCGGCCTTCTCCTCTGTTTACAAGATAATAGTATTTCTTCTGTGGCCGGCCCATGGATGGATGGATGTGT

Obrázok 12B

LG CTGGATCGGCTAAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCTTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAAA 432  
WT CTGGATCGGCTAAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCTTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAAA

LG GAGACAACAGCATGCATGGTGGCGGCCACAGACCAGAGACCCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAACAAGC 512  
WT GAGACAACAGCATGCATGGTGGCGGCCACAGACCAGAGACCCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAACAAGC

LG AAGGACGACCGTCAAAAAGCAACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAAGCAACAACAACCTAAACTAAAGCACAAAGA 592  
WT AAGGACGACCGTCAAAAAGCAACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAAGCAACAACAACCTAAACTAAAGCACAAAGA

LG CGTAAAGAGCAACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTTCATCAAAAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAAAGGAA 672  
WT CGTAAAGAGCAACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTTCATCAAAAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAAAGGAA

LG GTAGTAGCCATGAAAAATTAATCAACCGGGGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG 752  
WT GTAGTAGCCATGAAAAATTAATCAACCGGGGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGGTACGTGGCATGTATAG

LG TTCTTGTAAAGTAAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGGTGCAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGCGCG 832  
WT TTCTTGTAAAGTAAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGGTGCAGACAACGGCGGTGCGGGGAAGGTGGCGCG

LG GAGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTCGGCCTCACCTTCGACTG 912  
WT GAGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGGAGTCCAAGTTCGGCCTCACCTTCGACTG

LG GGAGGTGGAGAAGCTCGGGGTGCCGGGGCCATCGTTCGTAACAACACTACCACAGCTCCGAGTTCCTGCTTAAAAACCATCA 992  
WT GGAGGTGGAGAAGCTCGGGGTGCCGGGGCCATCGTTCGTAACAACACTACCACAGCTCCGAGTTCCTGCTTAAAAACCATCA

LG CCCCTCCACGACGTCCCCGGCCGAGGGCAACCTCACCTTCGTCCGCCAACTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA 1072  
WT CCCCTCCACGACGTCCCCGGCCGAGGGCAACCTCACCTTCGTCCGCCAACTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA

Obrázok 12C

LG TACAGCCGGCTCTTCTCGCCAACGACGTGCGTGGATTTCCCTCTACTTTCCCTCTCCTTTTCATTTTCCACCGCCTTCGGTCA 1152  
WT TACAGCCGGCTCTTCTCGCCAACGACGTGCGTGGATTTCCCTCTACTTTCCCTCTCCTTTTCATTTTCCACCGCCTTCGGTCA

LG TTCATGGTCGATCAATTAAGTCTTGCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT 1232  
WT TTCATGGTCGATCAATTAAGTCTTGCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT

LG TTATTCCGTGTTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAAGTTGCACCCGTGGCACCCGTG 1312  
WT TTATTCCGTGTTGGTAGAAAAGGATATGGTTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAAGTTGCACCCGTGGCACCCGTG

LG GCAGCGGTAGGTGAAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCACATGATTTGTTTTCATGAAATAAACTTTTAAAGGATGTGT 1392  
WT GCAGCGGTAGGTGAAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCACATGATTTGTTTTCATGAAATAAACTTTTAAAGGATGTGT

LG CTAGCCACATCTAGATGCATGTCCATAAATTAATGTCATACCAAAAACGATTAATAAAGCATAAAAAGAAAAGGAAAAAAA 1472  
WT CTAGCCACATCTAGATGCATGTCCATAAATTAATGTCATACCAAAAACGATTAATAAAGCATAAAAAGAAAAGGAAAAAAA

LG TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTTCAT 1552  
WT TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTTCAT

LG TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCCACTATGGACAACATACGAAAACAAAATCAGTGGATCTCTATGCATTTCATT 1632  
WT TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCCACTATGGACAACATACGAAAACAAAATCAGTGGATCTCTATGCATTTCATT

LG ATGTAGTCTATAATAAAAATCTTTAAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGAGTAAAAACATAAACTTTTAAATAGTAATGT 1712  
WT ATGTAGTCTATAATAAAAATCTTTAAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGAGTAAAAACATAAACTTTTAAATAGTAATGT

## Obrázok 12D

LG TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACTGCTCCGAGCCAGATGCCGGCGCTGAAGCCGTACCCGGACGACGAGCTCCG 1792  
 WT TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACTGCTCCGAGCCAGATGCCGGCGGCTGAAGCCGTACCCGGACGACGAGCTCCG

LG GAACTGCGTGGCAGCACCAGAGGCCCGTACCAGGACGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG 1872  
 WT GAACTGCGTGGCAGCACCAGAGGCCCGTACCAGGACGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG

LG GCGAGGGCCGCCCATCTCGCGGCAACTCCGACCACCCTTACCCGGCCCGCCGACGAGCCGCAAGCCCAACGCC 1952  
 WT GCGAGGGCCGCCCATCTCGCGGCAACTCCGACCACCCTTACCCGGCCCGCCGACGAGCCGCAAGCCCAACGCC

LG AGGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGTCGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCCGGGACGAGAAGTTCGGCCACCTCAA 2032  
 WT AGGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGTCGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCCGGGACGAGAAGTTCGGCCACCTCAA

LG GACGTCCGACTTCTGGGTACTCCATCAAGCCATCAGCAGGGCATCCTGCCGGCCGTGCGCACCTACGTGGACACCA 2112  
 WT GACGTCCGACTTCTGGGTACTCCATCAAGCCATCAGCAGGGCATCCTGCCGGCCGTGCGCACCTACGTGGACACCA

LG CCCCCGGGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG 2192  
 WT CCCCCGGGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG

LG GAGGAGTCCGTAAGCAGTTCCCGTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCCGGCGGACTCCCTGCTTAAGCTCCC 2272  
 WT GAGGAGTCCGTAAGCAGTTCCCGTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCCGGCGGACTCCCTGCTTAAGCTCCC

LG CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAAAGCAGGCCGTGGAGGACCGACGAGGAGTTGCGACGGGAGGTGCTCGCCGA 2352  
 WT CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAAAGCAGGCCGTGGAGGACCGACGAGGAGTTGCGACGGGAGGTGCTCGCCGGGTCA

(mutantné miesto)\*

Obrázok 12E

LG ACCCGGTCAATGATCAGCGGTCTCACGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCAATGTTGTGTGTATGGTGTCCATGGTGAGAAAG 2432  
WT ACCCGGTCAATGATCAGCGGTCTCACGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCAATGTTGTGTGTATGGTGTCCATGGTGAGAAAG

LG TGCAGATCTTGATTTGGGTTGGGTGCGATGCAACGCGATGCTGCATGCATGCAAGGAGTTCCCGCCAAAAAAGTAGTCTGGACC 2512  
WT TGCAGATCTTGATTTGGGTTGGGTGCGATGCAACGCGATGCTGCATGCATGCAAGGAGTTCCCGCCAAAAAAGTAGTCTGGACC

LG CTAGCAAAGTTGGTGACCAACAGCACCATCACGGGGAGCACATAGAGAAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG 2592  
WT CTAGCAAAGTTGGTGACCAACAGCACCATCACGGGGAGCACATAGAGAAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGCAGCAG

LG GTAATTTGGTCCAAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCAGGATGATTTGGTAGCTGTAGATAAATTTGGCTTCGTTGCA 2672  
WT GTAATTTGGTCCAAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCAGGATGATTTGGTAGCTGTAGATAAATTTGGCTTCGTTGCA

LG ATTAATTTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTGCAGGGCTGGAAAAGCAACAGGCTGTACATCC 2752  
WT ATTAATTTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAATTTGCAGGGCTGGAAAAGCAACAGGCTGTACATCC

LG TTGATCACCATGACCGGTTTCATGCCGTTCCCTGATCGACGTCACAAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC 2832  
WT TTGATCACCATGACCGGTTTCATGCCGTTCCCTGATCGACGTCACAAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC

LG CTCCTTCTTCCCTGGCGGGGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGGGCCCTTAC 2912  
WT CTCCTTCTTCCCTGGCGGGGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGGGCCCTTAC

LG CACGGCCAAAGAGCAAGGTTTACAGCCCGGTGCCAGCGGCTCCGTGCAAGGCTGGGTGGGAGCTGCCAAGGCCCTACG 2992  
WT CACGGCCAAAGAGCAAGGTTTACAGCCCGGTGCCAGCGGCTCCGTGCAAGGCTGGGTGGGAGCTGCCAAGGCCCTACG

LG TCGCCGTCAAATGACTCCGGGTGGCAACAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCAGGGTCGATGTGATTCAGTCAGTCGA 3072  
WT TCGCCGTCAAATGACTCCGGGTGGCAACAGCTCGTCAGCCACTGGTACGTTCTCCAGGGTCGATGTGATTCAGTCAGTCGA

Obrázok 12F

LG TGCACAACAACTGATCGAAAATATGATTGAAACCGCGCAGGCTGAACACTCACGGGGTGTGAGCCGTTCCGTGATCT 3152  
WT TGCACAACAACTGATCGAAAATATGATTGAAACCGCGCAGGCTGAACACTCACGGGGTGTGAGCCGTTCCGTGATCT

LG CGACGAAACGGGCACCTTAGCGTGACGCCACCCGGGTGCAAAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC 3232  
WT CGACGAAACGGGCACCTTAGCGTGACGCCACCCGGGTGCAAAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC

LG GCGCTGGCGGGCAGACGCTCATCAACGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCCTGGGCAAGTTCGCGTTGGGGAT 3312  
WT GCGCTGGCGGGCAGACGCTCATCAACGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCCTGGGCAAGTTCGCGTTGGGGAT

LG GTCGGCCGTGGTGTACAAGGACTGGAAGTTCACCGAGCAGGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA 3392  
WT GTCGGCCGTGGTGTACAAGGACTGGAAGTTCACCGAGCAGGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA

LG AATGTTATGAATGTGTAAAACAAATGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCATGGCCG 3472  
WT AATGTTATGAATGTGTAAAACAAATGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCATGGCCG

LG TGGAGGACCCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTCTGGACTACCCGTACGCGCGGACGGGCTGGCGATCTGG 3552  
WT TGGAGGACCCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTCTGGACTACCCGTACGCGCGGACGGGCTGGCGATCTGG

LG CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTCTCAGGGCGGATACGGAGGT 3632  
WT CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTCTCAGGGCGGATACGGAGGT

LG GCAGGCGTGGTAGGAGACGCGCGGAGTCCGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCCAAGATGCCAAAGTG 3712  
WT GCAGGCGTGGTAGGAGACGCGCGGAGTCCGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCCAAGATGCCAAAGTG

Obrázok 12G

LG TGCCGGAGCTGGCCAAAGGCGTGCACCAACCATCATCTGGATCGGGTGGCCGCTGCATGCGGCAGTCAACTTCGGGCAGTAC 3792  
WT TGCCGGAGCTGGCCAAAGGCGTGCACCAACCATCATCTGGATCGGGTGGCCGCTGCATGCGGCAGTCAACTTCGGGCAGTAC

LG CCCTACGGGGGTTCCTCCCGAACCGGGCCGACGGTGAGCCGGCCCGCATGCCGGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCCGA 3872  
WT CCCTACGGGGGTTCCTCCCGAACCGGGCCGACGGTGAGCCGGCCCGCATGCCGGAGCCCGGCACGGAGGAGTACGCCGA

LG GCTGGAGCGGACCCGGAGCGGGCCCTTCATCCACACCATCACGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTGCTGCTGG 3952  
WT GCTGGAGCGGACCCGGAGCGGGCCCTTCATCCACACCATCACGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCGTGTGCTGCTGG

LG AGGTGCTGTCGAAAGCACTCCTCCGACGAGCTGTACCTCGGGCAGCCGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCCAAAGGCC 4032  
WT AGGTGCTGTCGAAAGCACTCCTCCGACGAGCTGTACCTCGGGCAGCCGGACACGCCGGAGTGGACCTCGGACCCCAAAGGCC

LG CTGGAGGTGTTCAAGCGGTTACGCGACCCGGCTGGTGGAGATCGAGCAAGGTGGTGGCATGAACCATGACCCGGAGCT 4112  
WT CTGGAGGTGTTCAAGCGGTTACGCGACCCGGCTGGTGGAGATCGAGCAAGGTGGTGGCATGAACCATGACCCGGAGCT

LG CAAGAACCAGGACCCGGCTAAGTTTCCCTACATGCTGCTTACCCCAACACCTCCGACCCACAAGGGCCGCCGCTGCCG 4192  
WT CAAGAACCAGGACCCGGCTAAGTTTCCCTACATGCTGCTTACCCCAACACCTCCGACCCACAAGGGCCGCCGCTGCCG

**translačný stop kodón (429)**

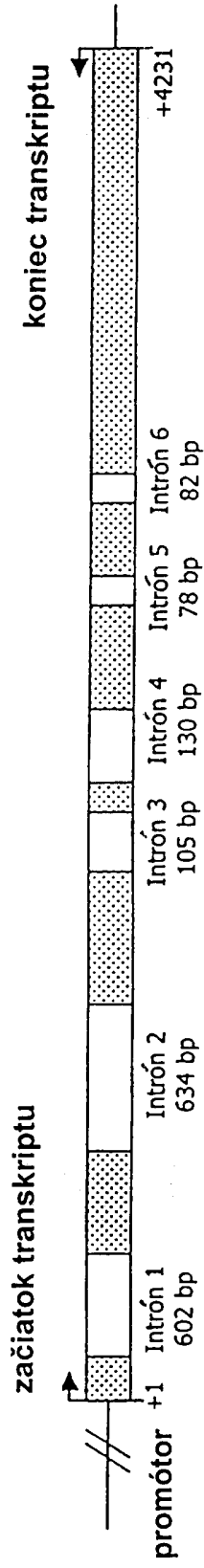
LG GGCTTACGGCCAAAGGCATCCCCAACAGCATCTCCATCTAATCTAAGCCATCGGCAACCATGGA TGAATAAAGGGCGTTC 4272  
WT GGCTTACGGCCAAAGGCATCCCCAACAGCATCTCCATCTAATCTAAGCCATCGGCAACCATGGATGAATAAAGGGCGTTC

LG GCCACGTACGAAACTTGTGAGAGATTGGTGTAGTGTGTGTGACAGTACTATGTCAGCAGTTGCTCTTTAAGCCGA 4352  
WT GCCACGTACGAAACTTGTGAGAGATTGGTGTAGTGTGTGTGACAGTACTATGTCAGCAGTTGCTCTTTAAGCCGA

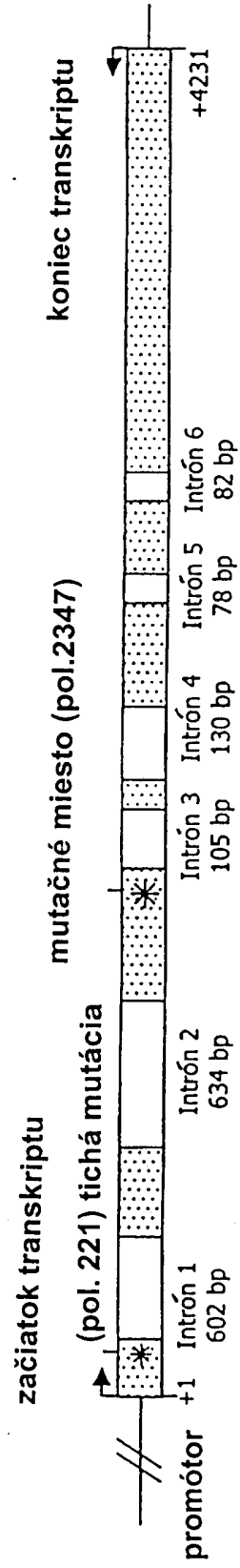
LG ATAAATAAAGCAGATTTGCTTCC 4375  
WT ATAAATAAAGCAGATTTGCTTCC

Obrázok 13

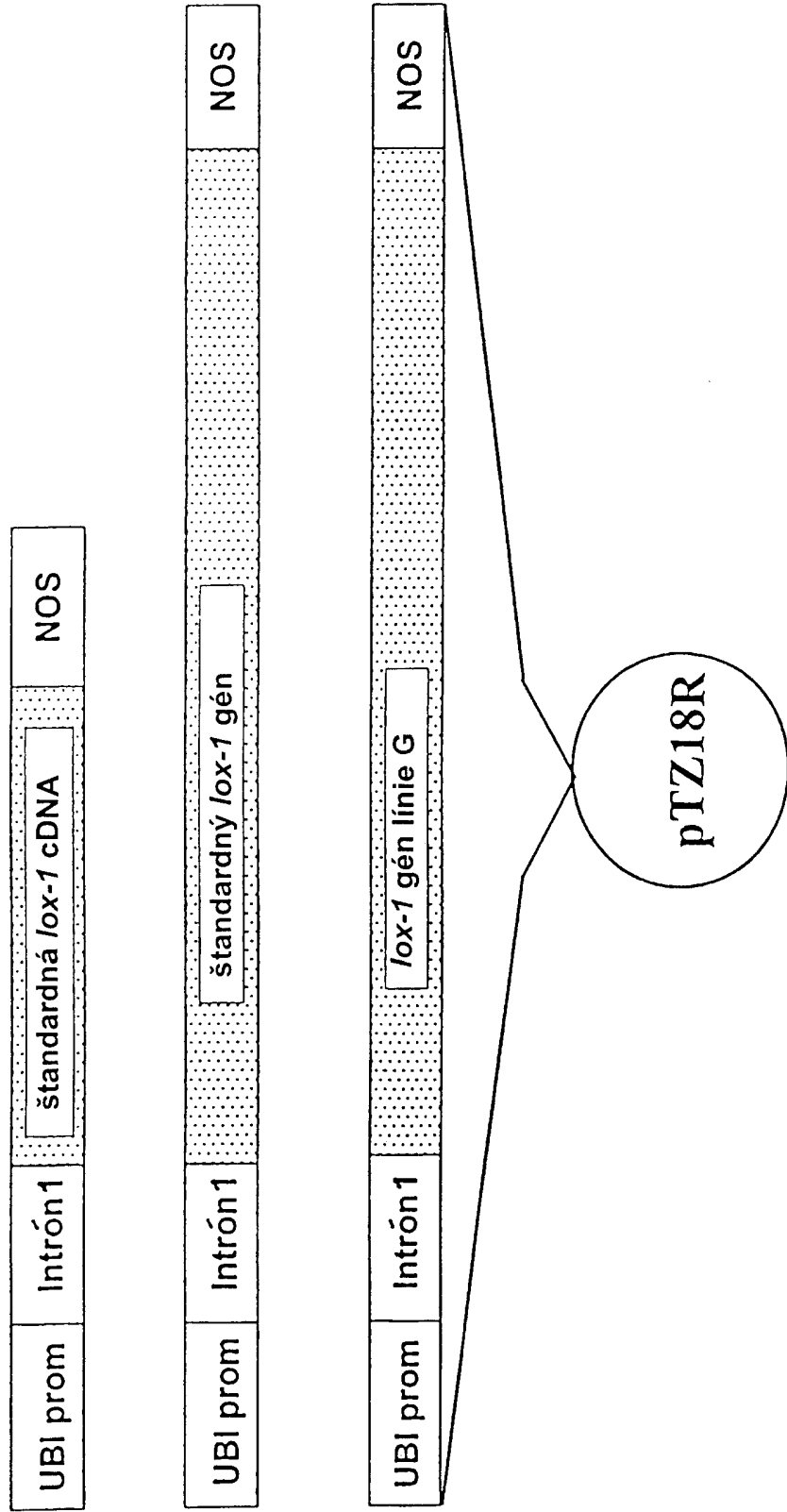
Štruktúra štandardného *lox-1* génu:

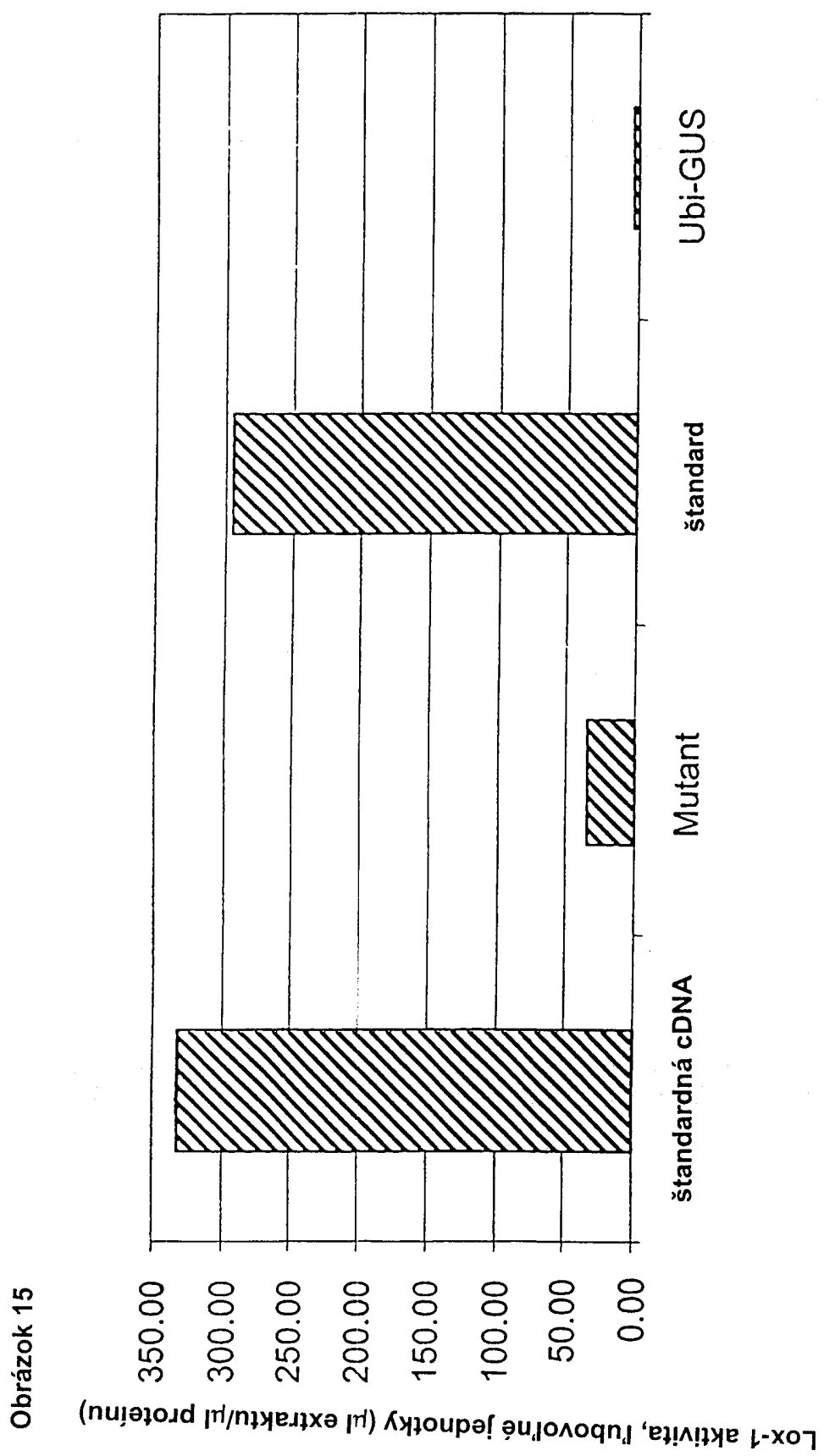


Štruktúra *lox-1* génu línie G:

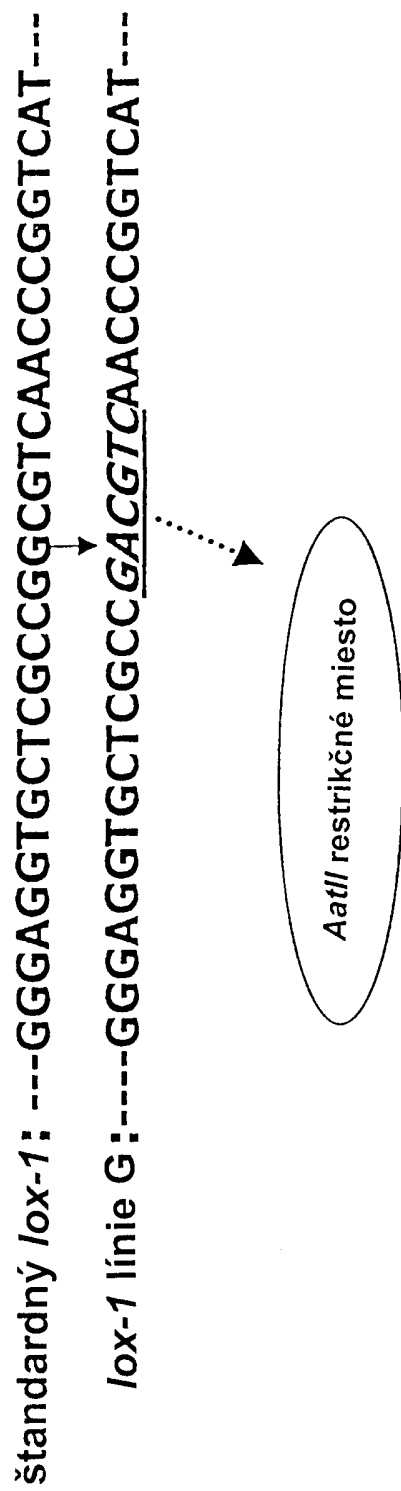


Obrázok 14

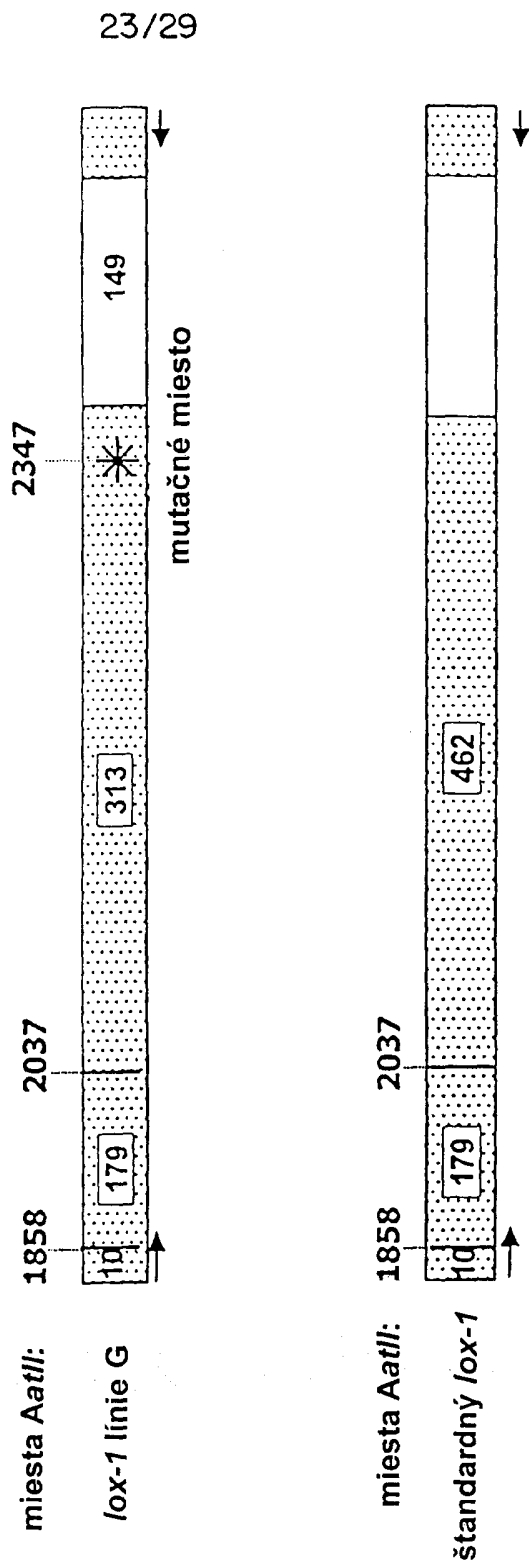




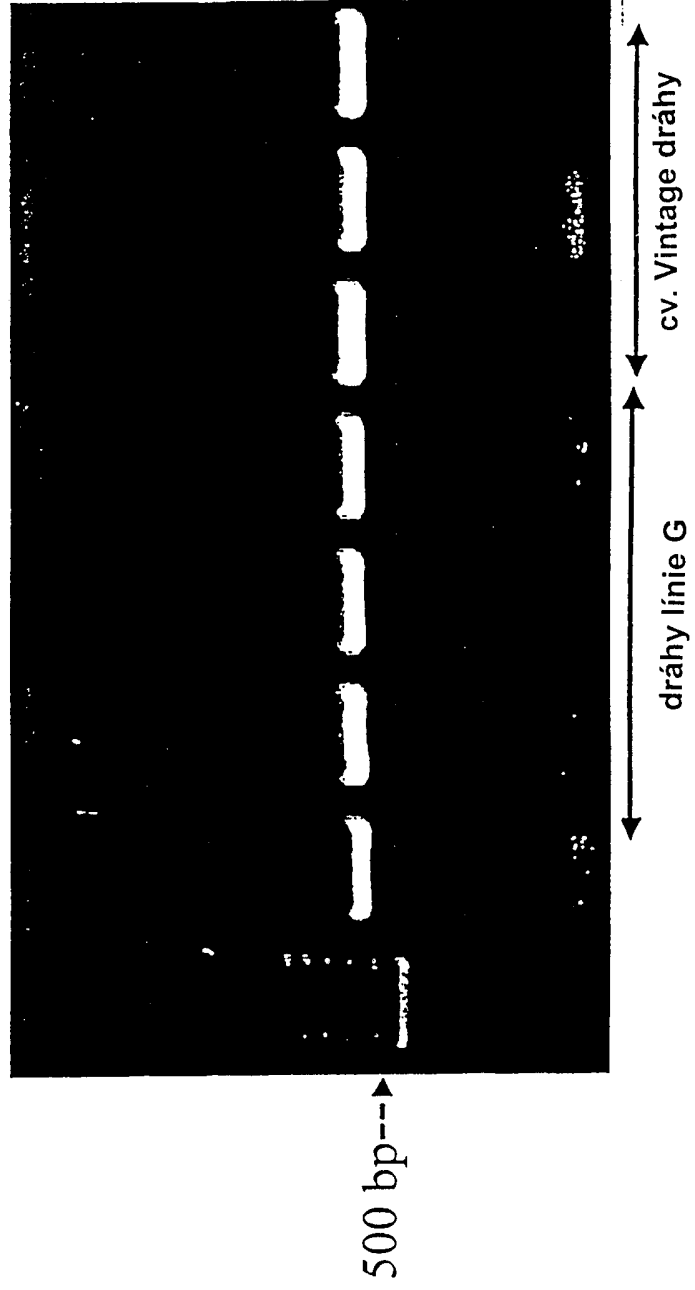
Obrázok 16



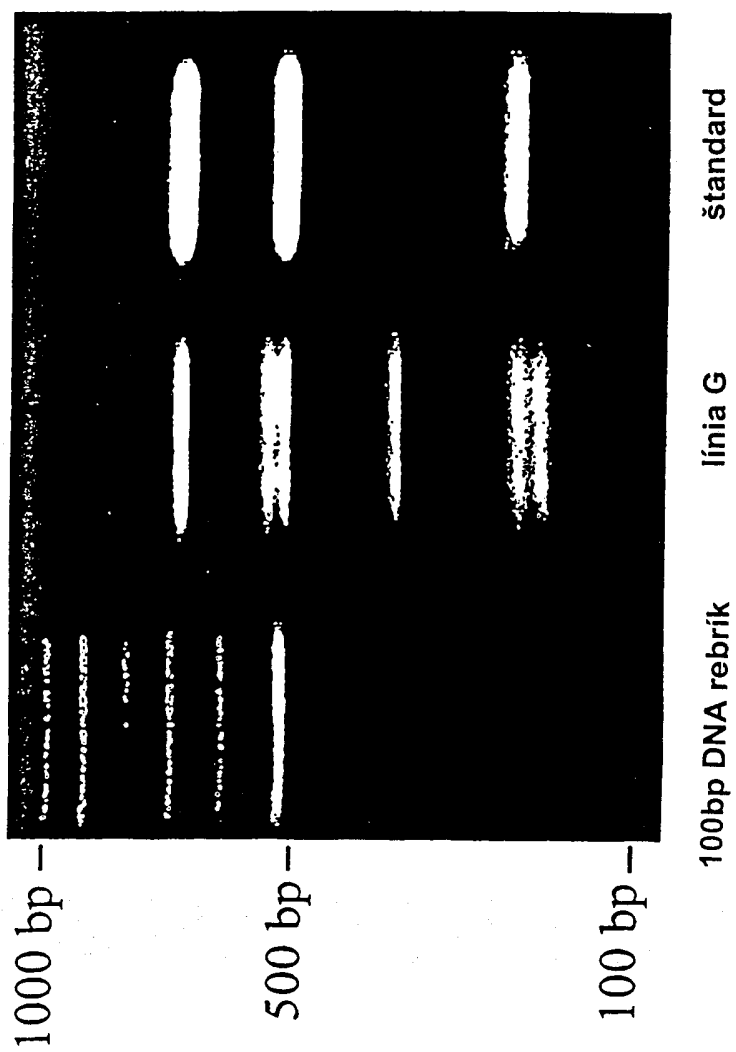
Obrázok 17



Obrázok 18

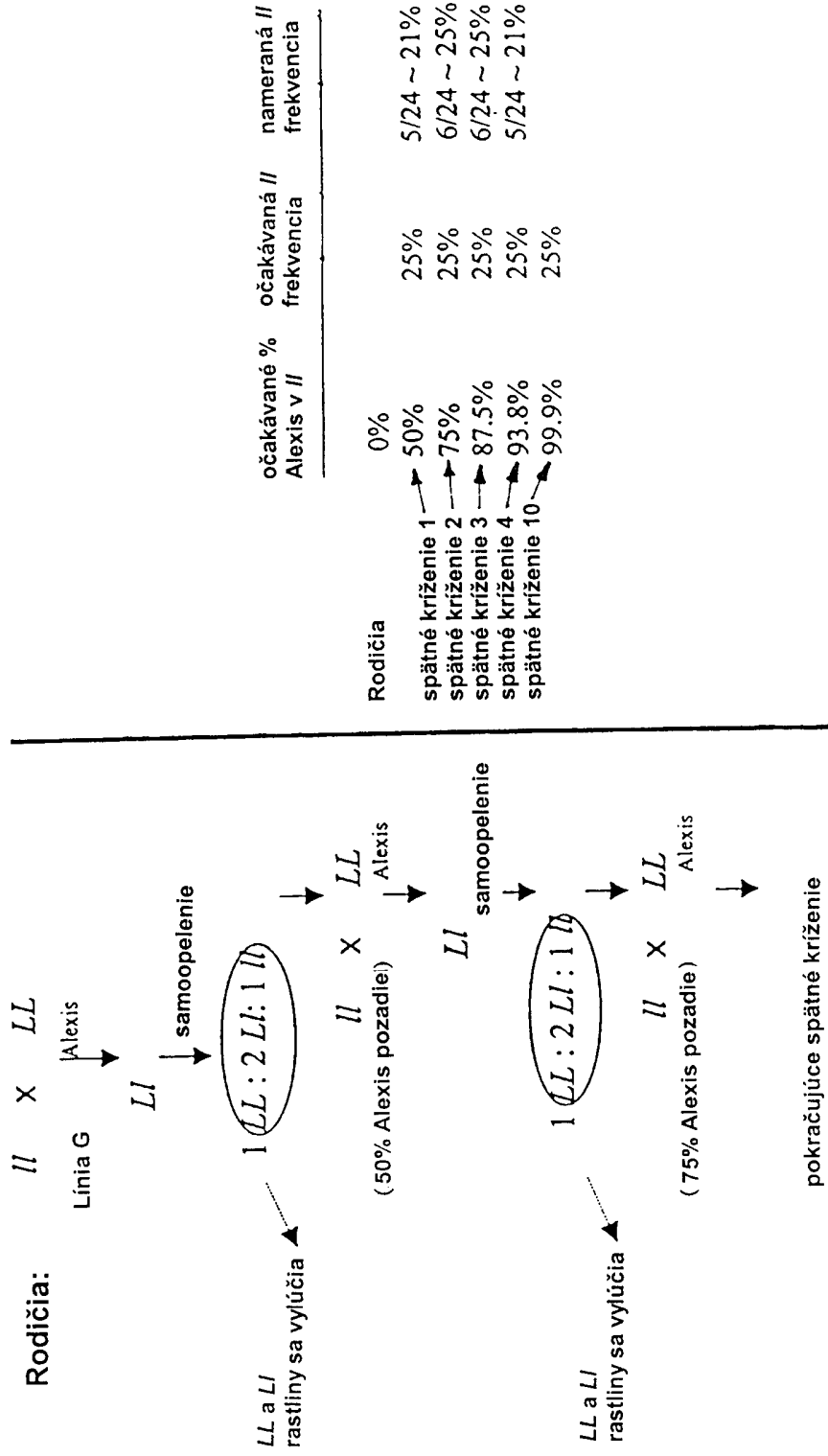


Obrázok 19



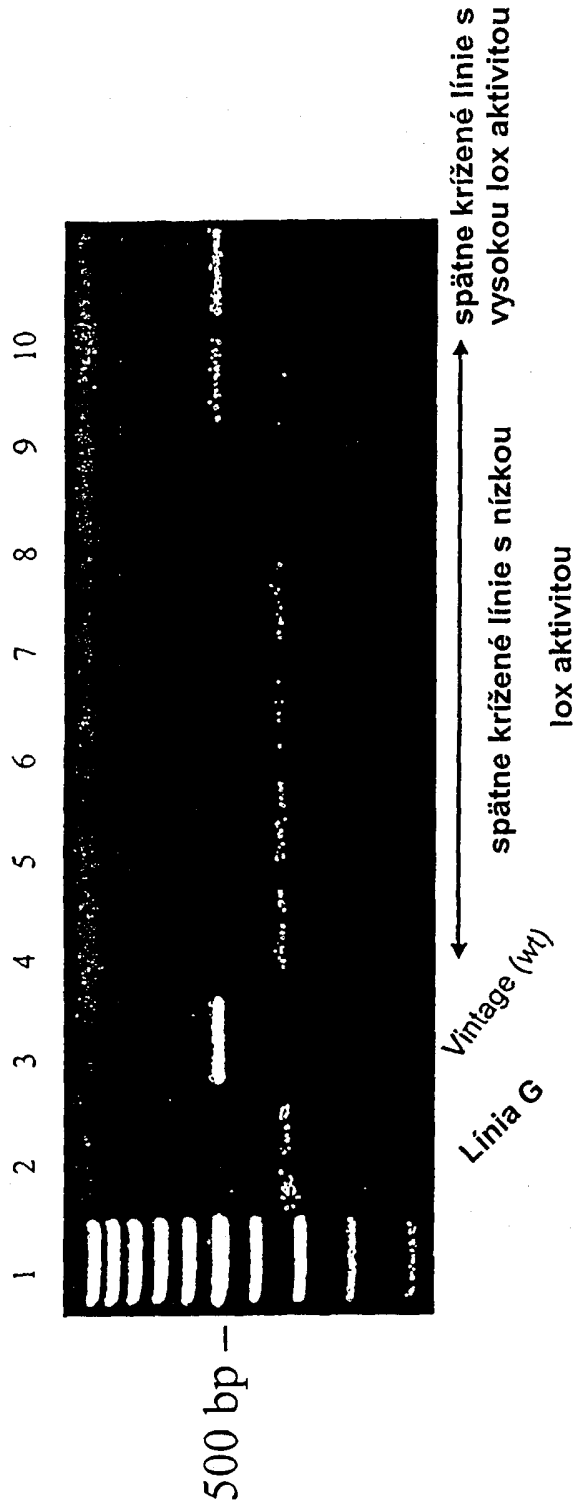
Obrázok 20

Program spätného kríženia línie G s cv Alexis



Rodičia	očakávané % Alexis v //	očakávaná // frekvencia	nameraná // frekvencia
spätne kríženie 1	0%	25%	5/24 ~ 21%
spätne kríženie 2	50%	25%	6/24 ~ 25%
spätne kríženie 3	75%	25%	6/24 ~ 25%
spätne kríženie 4	87.5%	25%	5/24 ~ 21%
spätne kríženie 10	93.8%	25%	
	99.9%	25%	

Obrázok 21



## Obrázok 22A

## Zoradenie lipoxygenázových aminokyselinových sekvencií

1 E1 H 60  
Gm1 MFS.....A.GHKIKGTVVLMRPKNELE.....VNPDGSAV  
Gm2 MFSVPGVSGILNRGG.GHKIKGTVVLMRKNVLDFN SVADLTGKNVGG LIGTGLNVVGSTL  
Gm3 M....LGGLLHRG...HKIKGTVVLMRKNVLDVNSVT.....SVGGIIGQGLDLVGSTL  
Hv2 MLGVGGIVSDLTGGIRGAHLKGSVVL<sup>1</sup>MRKNALDFN.....DFGAHVM  
Hv1 ML.LGGLIDTLTGANKSARLKGTVVLMRKNVLDLN.....DFGATII  
61 + E2 ++ + E3 + E4 120  
Gm1 DNLNAFLGRSVSLQLISATKADAH..GKGKVGKDTFLEG..INTSLPTLGAGESAFNIHF  
Gm2 DNLTAFLGRSVALQLISATKPLAN..GKGKVGKDTFLEG..IIVSLPTLGAGESAFNIQF  
Gm3 DTLTAFLGRSVSLQLISATKADAN..GKGKLGKATFLEG..IITSLPTLGAGQSAFKINF  
Hv2 DGVTELLGRGVTCQLISS<sup>2</sup>TNV<sup>3</sup>DHN<sup>4</sup>NG<sup>5</sup>GR<sup>6</sup>GK<sup>7</sup>VGA<sup>8</sup>EAN<sup>9</sup>LE<sup>10</sup>QW<sup>11</sup>LL<sup>12</sup>PT<sup>13</sup>NL<sup>14</sup>PF<sup>15</sup>IT<sup>16</sup>TG<sup>17</sup>EN<sup>18</sup>KFA<sup>19</sup>VT<sup>20</sup>F  
Hv1 DGIGEF<sup>1</sup>L<sup>2</sup>GK<sup>3</sup>GV<sup>4</sup>TC<sup>5</sup>QL<sup>6</sup>ISS<sup>7</sup>TAV<sup>8</sup>DQ<sup>9</sup>D<sup>10</sup>NG<sup>11</sup>GR<sup>12</sup>GK<sup>13</sup>VGA<sup>14</sup>EAE<sup>15</sup>LE<sup>16</sup>QW<sup>17</sup>..TSLPSLT<sup>18</sup>TG<sup>19</sup>ES<sup>20</sup>KF<sup>21</sup>GL<sup>22</sup>TF  
121 + + E5 E6 + E7 E8 180  
Gm1 EWD.GSMGIPGAFYIKNYMQVEFFL<sup>1</sup>KS<sup>2</sup>L<sup>3</sup>TLE<sup>4</sup>AI<sup>5</sup>SN<sup>6</sup>Q.GTIRFVCNSWVYNTKLYKSVRI<sup>7</sup>F  
Gm2 EWD.ESMGIPGAFYIKNYMQVEFFL<sup>1</sup>KS<sup>2</sup>L<sup>3</sup>TLE<sup>4</sup>DV<sup>5</sup>PN<sup>6</sup>Q.GTIRFVCNSWVYNTKLYKSVRI<sup>7</sup>F  
Gm3 EWD.DGSGIPGAFYIKNFMQTEFFL<sup>1</sup>VS<sup>2</sup>L<sup>3</sup>TLE<sup>4</sup>DIP<sup>5</sup>NH.GSIHFVCNSWIYNAKLFKSDRI<sup>6</sup>F  
Hv2 DWSVOKLGVPGAIIVKNNHASEFFL<sup>1</sup>KTI<sup>2</sup>LD<sup>3</sup>NV<sup>4</sup>PGR.GTIVFVANSWVYPOAKYRYNRV<sup>5</sup>F  
Hv1 DWEVEKLGVPGAIVVNNYHSSEFFL<sup>1</sup>KTIT<sup>2</sup>L<sup>3</sup>H<sup>4</sup>DV<sup>5</sup>PGRSGNLT<sup>6</sup>FVANSWIYPAANYRYSRV<sup>7</sup>F  
181 + + H1 + + E + 240  
Gm1 FANHTYVPSETPAPLVSYREEELKSLRNGT.GERKEYDRIYDYDVYNDLGNPDKSEKLA  
Gm2 FANHTYVPSETPAALVGYREEELK<sup>1</sup>NLR<sup>2</sup>GD<sup>3</sup>GK.GERKEHDRIYDYDVYNDLGNPDHGENFA  
Gm3 FANQTYLPSETPAPLVKYREEELHNLRGDGT.GERKEWERIYDYDVYNDLGD<sup>1</sup>PD<sup>2</sup>KGENHA  
Hv2 FANDTYLPHQMPAALKPYRDEELRNLRGDDQ<sup>1</sup>QGPYLD<sup>2</sup>HDRVYRYDVYNDLGD.....S  
Hv1 FANDTYLPSQMPAALKPYRDEELRNLRGDDQ<sup>1</sup>QGPYQEH<sup>2</sup>DRIYRYDVYNDLGE.....G  
241 ++ + + ••• • 300  
Gm1 R<sup>1</sup>PV<sup>2</sup>L<sup>3</sup>G<sup>4</sup>S<sup>5</sup>S<sup>6</sup>T<sup>7</sup>F<sup>8</sup>P<sup>9</sup>Y<sup>10</sup>PRR<sup>11</sup>GRT<sup>12</sup>GR<sup>13</sup>GPT<sup>14</sup>VT<sup>15</sup>DP<sup>16</sup>TEK<sup>17</sup>Q...GEV<sup>18</sup>FY<sup>19</sup>VP<sup>20</sup>RDEN<sup>21</sup>L<sup>22</sup>G<sup>23</sup>H<sup>24</sup>L<sup>25</sup>K<sup>26</sup>SD<sup>27</sup>AE<sup>28</sup>IE<sup>29</sup>G  
Gm2 R<sup>1</sup>P<sup>2</sup>I<sup>3</sup>L<sup>4</sup>G<sup>5</sup>S<sup>6</sup>S<sup>7</sup>TH<sup>8</sup>P<sup>9</sup>Y<sup>10</sup>PRR<sup>11</sup>GRT<sup>12</sup>GR<sup>13</sup>Y<sup>14</sup>TR<sup>15</sup>KD<sup>16</sup>Q<sup>17</sup>SEK<sup>18</sup>P...GEV<sup>19</sup>.Y<sup>20</sup>VP<sup>21</sup>RDEN<sup>22</sup>F<sup>23</sup>G<sup>24</sup>H<sup>25</sup>L<sup>26</sup>K<sup>27</sup>SS<sup>28</sup>DF<sup>29</sup>L<sup>30</sup>AY<sup>31</sup>G  
Gm3 R<sup>1</sup>P<sup>2</sup>V<sup>3</sup>L<sup>4</sup>G<sup>5</sup>GN<sup>6</sup>DT<sup>7</sup>F<sup>8</sup>P<sup>9</sup>Y<sup>10</sup>PRR<sup>11</sup>GRT<sup>12</sup>GR<sup>13</sup>K<sup>14</sup>TR<sup>15</sup>KD<sup>16</sup>PN<sup>17</sup>SESR...SND<sup>18</sup>VY<sup>19</sup>L<sup>20</sup>PR<sup>21</sup>DE<sup>22</sup>A<sup>23</sup>F<sup>24</sup>G<sup>25</sup>H<sup>26</sup>L<sup>27</sup>K<sup>28</sup>SS<sup>29</sup>DF<sup>30</sup>L<sup>31</sup>TY<sup>32</sup>G  
Hv2 R<sup>1</sup>D<sup>2</sup>V<sup>3</sup>L<sup>4</sup>G<sup>5</sup>SK<sup>6</sup>DL<sup>7</sup>P<sup>8</sup>Y<sup>9</sup>PRR<sup>10</sup>CR<sup>11</sup>T<sup>12</sup>GR<sup>13</sup>K<sup>14</sup>PS<sup>15</sup>DS<sup>16</sup>K<sup>17</sup>PD<sup>18</sup>HES<sup>19</sup>R<sup>20</sup>LL<sup>21</sup>LV<sup>22</sup>Q<sup>23</sup>N<sup>24</sup>V<sup>25</sup>Y<sup>26</sup>VL<sup>27</sup>R<sup>28</sup>DEL<sup>29</sup>F<sup>30</sup>G<sup>31</sup>H<sup>32</sup>L<sup>33</sup>K<sup>34</sup>Q<sup>35</sup>SD<sup>36</sup>L<sup>37</sup>GY<sup>38</sup>T  
Hv1 R<sup>1</sup>P<sup>2</sup>I<sup>3</sup>L<sup>4</sup>G<sup>5</sup>NS<sup>6</sup>D<sup>7</sup>H<sup>8</sup>P<sup>9</sup>Y<sup>10</sup>PRR<sup>11</sup>GR<sup>12</sup>TER<sup>13</sup>K<sup>14</sup>PN<sup>15</sup>AS<sup>16</sup>PS<sup>17</sup>LES<sup>18</sup>RL<sup>19</sup>S<sup>20</sup>LL.EQ<sup>21</sup>IY<sup>22</sup>VP<sup>23</sup>RD<sup>24</sup>E<sup>25</sup>K<sup>26</sup>F<sup>27</sup>G<sup>28</sup>H<sup>29</sup>L<sup>30</sup>K<sup>31</sup>T<sup>32</sup>S<sup>33</sup>DF<sup>34</sup>L<sup>35</sup>GY<sup>36</sup>S  
• H2 + H3 ++ + H4 + 360  
Gm1 TK<sup>1</sup>SL<sup>2</sup>SQ<sup>3</sup>IV<sup>4</sup>Q<sup>5</sup>PAFESAFDLKSTPIEFH<sup>6</sup>S<sup>7</sup>FQ<sup>8</sup>DV<sup>9</sup>HD<sup>10</sup>LYEGG<sup>11</sup>IK<sup>12</sup>L<sup>13</sup>PR...DVISTIIPLPVIK  
Gm2 IK<sup>1</sup>SL<sup>2</sup>SQ<sup>3</sup>YV<sup>4</sup>LPAFESVFDLNF<sup>5</sup>TPNE<sup>6</sup>FDS<sup>7</sup>FQ<sup>8</sup>DV<sup>9</sup>RD<sup>10</sup>LHEGG<sup>11</sup>IK<sup>12</sup>L<sup>13</sup>PT...EVISTIMPLPVVK  
Gm3 L<sup>1</sup>K<sup>2</sup>S<sup>3</sup>V<sup>4</sup>SQ<sup>5</sup>NV<sup>6</sup>LPLLQSAFDLNF<sup>7</sup>TPREF<sup>8</sup>DS<sup>9</sup>FDEVHGLYSGG<sup>10</sup>IK<sup>11</sup>L<sup>12</sup>PT...DIISKISPLPVLK  
Hv2 L<sup>1</sup>K<sup>2</sup>GW<sup>3</sup>LDG<sup>4</sup>IILAIRTYVDL..SPGE<sup>5</sup>FDS<sup>6</sup>FAD<sup>7</sup>IL<sup>8</sup>KLYEGG<sup>9</sup>IK<sup>10</sup>L<sup>11</sup>PNIPALEEVRKR<sup>12</sup>F<sup>13</sup>PL<sup>14</sup>Q<sup>15</sup>L<sup>16</sup>VK  
Hv1 I<sup>1</sup>KAITQ<sup>2</sup>GILPAVRTYVDT..TPGE<sup>3</sup>FDS<sup>4</sup>FQ<sup>5</sup>DIINLYEGG<sup>6</sup>IK<sup>7</sup>L<sup>8</sup>PKVAALEELR<sup>9</sup>K<sup>10</sup>Q<sup>11</sup>F<sup>12</sup>PL<sup>13</sup>Q<sup>14</sup>L<sup>15</sup>IK  
E10 + E11 + + H6 ♦ + E12 ++ 420  
Gm1 ELYRTD<sup>1</sup>GQHILK<sup>2</sup>FPQPHVV<sup>3</sup>QVSQSAW<sup>4</sup>MTDEEFAREM<sup>5</sup>IAGV<sup>6</sup>NP<sup>7</sup>CVIRGLEEFPPKSNLDP<sup>8</sup>PA  
Gm2 ELFRTD<sup>1</sup>G<sup>2</sup>EQVLK<sup>3</sup>FPPPHVIQVSKSAW<sup>4</sup>MTDEEFAREM<sup>5</sup>VAGV<sup>6</sup>NP<sup>7</sup>CVIRGLQEFPPKSNLDP<sup>8</sup>T  
Gm3 E<sup>1</sup>IFRTD<sup>2</sup>G<sup>3</sup>E<sup>4</sup>QAL<sup>5</sup>K<sup>6</sup>FPPPKVIQVSKSAW<sup>7</sup>MTDEEFAREM<sup>8</sup>LAGV<sup>9</sup>NP<sup>10</sup>NIIRCLKDFPPRSK<sup>11</sup>LDS<sup>12</sup>Q  
Hv2 DL<sup>1</sup>IPKGGDFLLK<sup>2</sup>LPKPEI<sup>3</sup>IKVDQKAW<sup>4</sup>MTDEEFAREM<sup>5</sup>LAGV<sup>6</sup>NP<sup>7</sup>PM<sup>8</sup>MIKRLTEFPPKSTLD<sup>9</sup>PS  
Hv1 DLLPVGGDSLLK<sup>1</sup>LPVPHIIQENKQAW<sup>2</sup>MTDEEFAREM<sup>3</sup>VLAGV<sup>4</sup>NP<sup>5</sup>PM<sup>6</sup>MIIRLTEFPPKSSLD<sup>7</sup>PS  
+ + H7 E13 H8 480  
Gm1 IYGDQSSKITADSLD..LDGYTMDEALGSRRLFM<sup>1</sup>LDYHDI<sup>2</sup>FMPYVRQINQLNSAKTYATR  
Gm2 IYGEQTSKITADALD..LDGYTVDEALASRRLFM<sup>1</sup>LDYHDV<sup>2</sup>FMPYIRRI<sup>3</sup>NO.TYAKAYATR  
Gm3 VYGDHTSQITKEHLEPNLEGLTVDEAIQNKRLFL<sup>1</sup>LDHHD<sup>2</sup>PIMPYLRRINA.TSTKAYATR  
Hv2 KYGDHTSTMTEEHVAKSLEGLTVQ<sup>1</sup>QALAGNRLYI<sup>2</sup>VDQHDNLM<sup>3</sup>PF<sup>4</sup>LIDINNLDAS<sup>5</sup>FVYATR  
Hv1 KFGDHTSTITAEHIEKNLEGLTVQ<sup>1</sup>QALESNRLYI<sup>2</sup>LDH<sup>3</sup>HDRF<sup>4</sup>MP<sup>5</sup>FLIDVNNLPGNF<sup>6</sup>IYATR

## Obrázok 22B

```

E14 + E15 + E16 + H9 540
Gm1 TILFLREDGTLKPVAVIELSLPHSAGDLSAAVSQVVLPAKEG.VESTIWLAKAYMIVNDS
Gm2 TILFLRENGTLKPVAVIELSLPHSAGDLSGAVSQVILPAKEG.VESTIWLAKAYMIVNDS
Gm3 TILFLKNDGTLRPLAVIELSLPHSAGDLSGAVSQVFLPADEG.VESSIWLAKAYMIVNDS
Hv2 TLLFLRGDGTLPVAVIELSSPLIQGELTTAKSAVYTPQHAG.VEGWIWQLAKAYASVNDY
Hv1 TLFFLRGDGRLTPLAVIELSEPIIQGLTTAKSKVYTPVPSGSGVEGWVWELAKAYMIVNDS

541• * * H9 +H10 + * H11 600+
Gm1 CYHQLMSHWLNTHAAMEPFVIATHRHLSVLHPIYKLLTPHYRNMNINALARQSLINANG
Gm2 CYHQLMSHWLNTHAVIEPFIATNRHLSALHPIYKLLTPHYRDTMNIINALARQSLINADG
Gm3 CYHQLMSHWLNTHAVVEPFIATNRHLSVHPIYKLLHPHYRDTMNINGLARLSLVNDGG
Hv2 GWHQLISHWLNTHAVMEPFVIATNRQLSVTHPVYKLLHPHYRDTMNIINARARGLLINAGG
Hv1 GWHQLVSHWLNTHAVMEPFVISTNRHLSVTHPVHKLSPHYRDTMTINALARQTLINAGG

601 H12 H13 + H14 + E + E +660
Gm1 IIEETFLPSKYSVEMSSAVYKNWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPHGVRLLIEDYPYA
Gm2 IIEKSFPLPSKHSVEMSSAVYKNWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSAPHGLRLLIEDYPYA
Gm3 VIEQTFLWGRYSVEMSSAVVYKDWVFTDQALPADLIKRGMAIEDPSCPHGIRLVIEDYPYT
Hv2 VIEMTVFPKHAMPSSSMVYKHWNFTEQALPADLIKRGMAVEDASSPHKVRLLIKDYPIYA
Hv1 IIEEMTVFPGKFGALGMSAVVYKDWKFTEQGLPDDLIKRGMAVEDPSSPYKVRLLVSDYPIYA

661 H15 H16 H17 + + + 720
Gm1 ADGLEIWAAIKTWVQYVPLYARDDDVKNDSSELQHWKKEAVEKGGDLKDKPWWPKLOT
Gm2 VDGLEIWAAIKTWVQYVSLYARDDDVKPDSSELQQWKEAVEKGGDLKDKPWWPKLOT
Gm3 VDGLEIWDIAIKTWVHEYVFLYKSDDTLREDPELQACWKEVVEVGHGDKKNEPWWPKMQT
Hv2 TDGLAVWDAIEQWVSDYLTIIYPNDGVLQGDVELQAWWKEVREVGHGDLKDAAWPKMQT
Hv1 ADGLAIWHAIEQYVSEYLAIYYPNDGVLQGDTEVQAWWKEVREVGHGDLKDAFPWWPKMQS

721 H18 * * + * + H19 780
Gm1 LEDLVEVCLIIIWIASALHAAVNEGOYFYGGILINRPTASRRLLPEKGTPEYEEMINNHE
Gm2 IEELVEICTIIIWIASALHAAVNEGOYFYGGFILLNRPTSSRRLLPEKGTPEYEEMVKS HQ
Gm3 REELVEACAIIWIASALHAAVNEGOYFYGGILINRPTLSRRFMPEKGS AEYEELRKNPQ
Hv2 VAELIKACATIIWIGSALHAAVNEGOYFYSGYHFNKPSASRRPMPVQGS EYAELE RDPE
Hv1 VPELAKACTIIWIGSALHAAVNEGOYFYAGFLPNRPTVSRRRMPEPGTEYAELE RDPE

781 H20 H21• * * + + H22 840
Gm1 KAYLRTITSKLPTLISLSVIEIILSTHASDEVYLGQRDNPHWTS DSKALQAFQKFGNKLKE
Gm2 KAYLRTITSKFQTLVDLSVIEIILSRHASDEVYLGQRDNPHWTS DSKALQAFQKFGNKLKE
Gm3 KAYLKTITPKFQTLIDLSVIEIILSRHASDEVYLGQRDNPNWTS DTRALEAFKRFGNKLAQ
Hv2 KAFIRTTITSQFHALVGISLMEIILSKHSSDEVYLGQHDTPAWTS DAKALEAFKRFGAKLEG
Hv1 RAFIHTTITSQIQTIIGVSLLEVLISKHSSDELYLGQRDTPWTS DPKALEVFKRFS DRLVE

841 ++ + + + ++ 895*
Gm1 IEEKLVRRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLYPSSEE.....GLTFRGIPNSISII
Gm2 IEEKLARKNNDQSL.SNRLGPVQLPYTLLHPNSE.....GLTCRGIPNSISII
Gm3 IENKLSERNNDEKLR.NRCGPVQMPYTLLLPSSKE.....GLTFRGIPNSISII
Hv2 IEKQVVAMNSDPQLK.NRTGPAKFPYMLLYPNTSDHTGQAEGLTARGIPNSISII
Hv1 IESKVVGMNHDPELK.NRNGPAKFPYMLLYPNTSDHKGAAAGLTAKGIPNSISII

```

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

**Systém číslovania použitý nad zoradením sekvencií nezodpovedá skutočnému číslu aminokyseliny žiadnej lipoxygenázovej sekvencií v zoradení**

1/27

Zoznam sekvencií

<110> Douma, Anneke

Doderer, Albert

Cameron-Mills, Verena

Skadhauge, Birgitte

Bech, Lene

<120> Jačmeň s nízkou lipoxygenázovou 1 aktivitou

<130> 11225.12w001

<160> 18

<170> Patentová verzia 3.0

<210> 1

<211> 143

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 1

ctaagccatc ggcaaccatg gatgaataaa gggcgttcgc cacgtacgaa acttgctcgag 60

agattggtgt agtgtgtgtc tgtgacagta ctatgtcagc agttgctctt taagccgaat 120

aaataaagca gatttgcttc caa 143

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

gaaaagcttg gaggtagacg ctgc 24

<210> 3  
<211> 33  
<212> DNA  
<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> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 5  
ggcttaaaga gcaactgctg a 21

<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 6  
caagatgcat atgctgctgg gag 23

<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 7  
cgatggttta aattagatgg agatgctgt 29

<210> 8

<211> 4663

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 8  
cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60  
atgggcatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgag aagcacgagg agggcacgtc 120  
accgtccgag cgcagcacgt ggagagcagc tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180  
gcgccacacc accgggaccg gaccgggacc ggcctataaa ttgccgggac cgagctgcaa 240  
gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300  
tgtgctggtg ccattggttg gagcagttaa agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360  
tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccgg ctcaagggca 420  
cggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480  
acggcatcgg cgagttcctc ggcaagggcg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccc 540  
tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ctttctcctc tgtttacaag atatagtatt 600  
tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660  
aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa 720  
gagacaacag catgcacatg tgggtgcgagc accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780  
gacaaagcaa cacacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840  
cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat 900  
cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960  
gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020  
agggtagctg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtacg 1080  
tggtggtgca gacaacggcg gtcgagggaa ggtgggagc gaggcggagc tggagcagtg 1140  
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg 1200  
ggaggtggag aagctcgggg tgccgggagc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga 1260  
gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc gcgagcggca acctcacctt 1320  
cgtcgccaac tcatggatct accccgcccgc caactaccga tacagccgag tcttcttcgc 1380  
caacgacgtg cgtggatgtt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca 1440

ttcattggtcg 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 caaaaacgatt aaattaagca 1740  
 taaaaagaaa aggaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt 1800  
 agatatgcaa tttttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaatat 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 aacgacctg 2160  
 gcgagggccg ccccatcctc ggcggcaact ccgaccacc ttaccgcgc cgcgccgca 2220  
 cggagcgcaa gcccaacgcc agcgaccgca gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc 2280  
 agatctacgt gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct 2340  
 actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca 2400  
 cccccggcga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcatacaagc 2460  
 tgcccaaggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg 2520  
 acctcctccc cgctcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg 2580  
 agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggaggtgctc gccggcgtca 2640  
 acccggctcat gatcacgcgt ctacaggtga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta 2700  
 tggtgtccat ggtgagaaaag tgcagatctt gatattgcgtt gggtcgcagc cacgcatgct 2760  
 gcatgcatgc aggagtccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac 2820  
 accagacca tcacggcggg gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag 2880  
 gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta 2940  
 gataatttg cttcgttgca attaatgtga tgctggccga tcaagtgatc gtattggggt 3000  
 tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc 3060  
 atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cacgaggacc 3120  
 ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc 3180  
 atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggt gccagcggc 3240  
 tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcg aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg 3300  
 tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacggt cttcacggtc gatgtgattc agtcagtcga 3360

tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420  
 gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cggtgcacaa 3480  
 gctgctgagc ccgcactacc gcgacacccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540  
 catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccg ggcaagtctg cgttggggat 3600  
 gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660  
 caagaggtac gtacctggtg aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720  
 ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcgg tggaggaccg gtcgagcccg 3780  
 tacaaggtgc ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg 3840  
 cacgccattg agcagtagct gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900  
 ctgcagggcg atacggagggt gcaggcgtgg tggaaggaga cgcgcgagggt cgggcacggc 3960  
 gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020  
 tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtag 4080  
 ccctacgcgg ggttcctccc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc 4140  
 ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc gggccttcat ccacaccatc 4200  
 acgagccaga tccagacccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260  
 tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgccggagt ggacctcggg cccaaaggcc 4320  
 ctggagggtg tcaagcggtt cagcgaccgg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc 4380  
 atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggccccg ctaagtttcc ctacatgctg 4440  
 ctctacccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500  
 cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560  
 gccacgtacg aaacttgtcg agagattggt gtagtggtg 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





8/27

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> 10

<211> 2818

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 10  
agtgaaaaac agtgtgctgg tgccattggt tggagcagtg aaagcgagga gaggaggcca 60  
agaacaagat gctgctggga gggctgatcg acaccctcac gggggcgaac aagagcgccc 120  
ggctcaaggg cacggtggtg ctcatgcgca agaacgtgct ggacctcaac gacttcggcg 180  
ccaccatcat cgacggcatc ggcgagttcc tcggcaaggg cgtcacctgc cagcttatca 240  
gctccaccgc cgtcgaccaa gacaacggcg gtcgcgggaa ggtggggcgc gaggcggagc 300  
tggagcagtg ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca 360  
ccttcgactg ggaggtggag aagctcgggg tgccgggcgc catcgtcgtc aacaactacc 420  
acagctccga gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcggca 480  
acctcacctt cgtcgccaac tcatgatct accccgccgc caactaccga tacagccgcg 540  
tcttcttcgc caacgacacg tacctgccga gccagatgcc ggcggcgctg aagccgtacc 600  
gcgacgacga gctccggaac ctgctggtggc acgaccagca gggccccgtac caggagcacg 660  
accgcatcta ccgctacgac gtctacaacg acctcggcga gggccgcccc atcctcggcg 720  
gcaactccga ccacccttac ccgcgccgcg gccgcacgga gcgcaagccc aacgccagcg 780

acccgagcct ggagagccgg ctgtcgtgc tggagcagat ctacgtgccg cgggacgaga 840  
 agttcggcca cctcaagacg tccgacttcc tgggctactc catcaaggcc atcacgcagg 900  
 gcatcctgcc ggccgtgcmc acctacgtgg acaccacccc cggcgagttc gactccttcc 960  
 aggacatcat caacctctat gagggcggca tcaagctgcc caaggtggcc gccctggagg 1020  
 agctccgtaa gcagttcccc ctccagctca tcaaggacct cctccccgtc ggcggcgact 1080  
 ccctgcttaa gctccccgtg cccacatca tccaggagaa caagcaggcg tggaggaccg 1140  
 acgaggagtt cgcacgggag gtgctcggc gcgtcaacc ggtcatgac acgcgtctca 1200  
 cggagttccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac accagcacca 1260  
 tcacggcggg gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag gcgctggaaa 1320  
 gcaacaggct gtacatcctt gatcaccatg accggttcat gccgttcctg atcgacgtca 1380  
 acaacctgcc cggcaacttc atctacgcca cgaggacct cttcttctg cgcggcgacg 1440  
 gcaggctcac gccgctcggc atcgagctga gcgagccat catccagggc gcccttacca 1500  
 cggccaagag caaggtttac acgccggtgc ccagcggctc cgtcgaaggc tgggtgtggg 1560  
 agctcgccaa ggcctacgtc gccgtcaatg actccgggtg gcaccagctc gtcagccact 1620  
 ggctgaacac tcacgcggtg atggagccgt tcgtgatctc gacgaaccgg caccttagcg 1680  
 tgacgcaccc ggtgcacaag ctgctgagcc cgcactaccg cgacaccatg accatcaacg 1740  
 cgctggcgcg gcagacgtc atcaacgccg gcggcatctt cgagatgacg gtgttccccg 1800  
 gcaagttcgc gttggggatg tcggccgtgg tgtacaagga ctggaagttc accgagcagg 1860  
 gactgccgga c gatctcatc aagaggggca tggcgggtgga ggaccgctc agcccgtaca 1920  
 aggtgcgggt gctggtgtcg gactaccctg acgcggcggg cgggctggcg atctggcacg 1980  
 ccattgagca gtacgtgagc gagtacctgg ccatctacta cccgaacgac ggcgtgctgc 2040  
 agggcgatac ggaggtgcag gcgtggtgga aggagacgcg cgaggtcggg cacggcgacc 2100  
 tcaaggacgc cccatggtgg cccaagatgc aaagtgtgcc ggagctggcc aaggcgtgca 2160  
 ccaccatcat ctggatcggg tcggcgtgc atgcggcagt caacttcggg cagtaccct 2220  
 acgcgggggt cctcccgaac cggccgacgg tgagccggcg ccgcatgccg gagcccggca 2280  
 cggaggagta cgcggagctg gagcgcgacc cggagcgggc cttcatccac accatcacga 2340  
 gccagatcca gaccatcatc ggcgtgtcgc tgctggaggt gctgtcgaag cactcctccg 2400  
 acgagctgta cctcgggagc cgggacacgc cggagtggac ctcggacca aaggccctgg 2460  
 aggtgttcaa gcggttcagc gaccggctgg tggagatcga gagcaaggtg gtgggcatga 2520  
 accatgacct ggagctcaag aaccgcaacg gcccggttaa gttccctac atgctgtctt 2580  
 accccaacac ctccgaccac aagggcggc ctgccgggct taccgccaag ggcattccca 2640  
 acagcatctc catctaactt aagccatcgg caaccatgga tgaataaagg gcgttcgcca 2700

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

<210> 11

<211> 4663

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> variant

<222> (2346)..(2348)

<223> „n“ znamená a, c, t alebo g kódujúci kyslí, zásaditú alebo polárnu  
 aminokyselinu

<400> 11

cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60  
 atgggcgatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgcg aagcacgagg agggcacgtc 120  
 accgtccgcy cgcagcacgt ggagagcacy tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180  
 gcgccacacc accgggaccg gaccggacc ggccataaaa ttgcccggac cgagctgcaa 240  
 gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300  
 tgtgtggtg ccattggttg gagcagtga aagcaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360  
 tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcggcccg ctcaagggca 420  
 cgggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480  
 acggcatcgg cgagttcctc ggcaagggtg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccc 540  
 tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ccttctcctc tgtttacaag atatagtatt 600  
 tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660  
 aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcataatgcc atcgaaaaaa 720  
 gagacaacag catgcatgca tgggtgcgcy accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780  
 gacaaagcaa cacacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840  
 cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat 900  
 cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960  
 gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020  
 agggtagctg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtagc 1080

tggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc tggagcagtg	1140
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg	1200
ggaggtggag aagctcgggg tgccgggagc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga	1260
gttcctgctt aaaaccatca cctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt	1320
cgtcgccaac tcatggatct accccgccgc caactaccga tacagccgag tcttcttcgc	1380
caacgacgtg cgtggatctt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca	1440
ttcatggctg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca	1500
cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga	1560
tcgacacaag attgaaatga agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat	1620
aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt	1680
ctagccacat ctgatgcat gtcacataat tattgcatac caaaacgatt aaattaagca	1740
taaaaagaaa aggaaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt	1800
agatatgcaa tttttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaatat aagacatttg	1860
taagatttca ctatggacaa catacgaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt	1920
atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca	1980
taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga	2040
tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgctg ggcgacgacc	2100
agcagggccc gtaccaggag cacgaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg	2160
gcgagggccg ccccatcctc ggcggcaact ccgaccacc ttaccgcgc gcgagccgca	2220
cggagcgcaa gcccaacgcc agcgaccgca gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc	2280
agatctacgt gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct	2340
actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca	2400
ccccggcga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcataagc	2460
tgcccaaggt ggccgcccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg	2520
acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg	2580
agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgcacg ggaggtgctc gccnngtca	2640
accggctcat gatcacgctg ctcacggtga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta	2700
tggtgtccat ggtgagaaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct	2760
gcatgcatgc aggagttccc gccaaaaagt agtctggacc cttagcaagt ttggtgaccac	2820
accagcacca tcacggcggg gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag	2880
gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta	2940
gataatttgg cttcgttgca attaatttga tgctggccga tcaagtgatc gtattggggt	3000

tgaaatTTgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc 3060  
 atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cacgaggacc 3120  
 ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc 3180  
 atcatccagg gcgcccttac 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 cgggtgacaa 3480  
 gctgctgagc ccgcactacc gcgacaccat gaccatcaac gcgctggcgc ggagacgct 3540  
 catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccc ggcaagttcg cgttggggat 3600  
 gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660  
 caagaggtag gtacctggtg aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720  
 ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggacc gtcgagcccg 3780  
 tacaaggtag ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg 3840  
 cacgccattg agcagtacgt gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900  
 ctgcagggcg atacggagggt gcaggcgtgg tggaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960  
 gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020  
 tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtag 4080  
 ccctacgcgg ggttctctcc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgat gccggagccc 4140  
 ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc gggccttcat ccacaccatc 4200  
 acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260  
 tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgccggagt ggacctcga cccaaaggcc 4320  
 ctggagggtg tcaagcgggt cagcgaaccg ctggtggaga tcgagagcaa ggtgggtggc 4380  
 atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgg ctaagtttcc ctacatgctg 4440  
 ctctacccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500  
 cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560  
 gccacgtacg aaacttgtcg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca 4620  
 gcagttgctc ttaagccga ataaataaag cagatttgc tcc 4663

<210> 12

<211> 862

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; variant

&lt;222&gt; (368)..(368)

&lt;223&gt; „Xaa“ znamená kyslí, zásaditú alebo polárnu aminokyselinu

&lt;400&gt; 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

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

15/27

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  
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> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 13

cgctacgacg tctacaacga

20

<210> 14

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Hordeum vulgare

<400> 14  
 cagactactt tttggcggga

20

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

<400> 15

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

17/27

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  
 225 230 240

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				18/27						560
										555						
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					640	
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> Glycine max

&lt;400&gt; 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

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



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

23/27

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



25/27

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  
 545 550 555 560 565  
 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 Ile  
850 855 860