



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 726**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99928700 .6**

86 Fecha de presentación : **10.06.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1086236**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2001**

54 Título: **Ácidos grasos poliinsaturados en plantas.**

30 Prioridad: **12.06.1998 US 89043 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Calgene L.L.C.**
1920 Fifth Street
Davis, California 95616, US

72 Inventor/es: **Knutzon, Debbie**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 293 726 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ácidos grasos poliinsaturados en plantas.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a niveles moduladores de enzimas y/o componentes de enzima capaces de alterar la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAS) en una planta huésped.

10 **Introducción****Antecedentes**

15 Tres familias principales de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son los ácidos grasos ω 3, ejemplificados por el ácido araquidónico, los ácidos grasos ω 9 ejemplificados por el ácido Mead, y los ácidos grasos ω 3, ejemplificados por el ácido eicosapentenoico. Los PUFA son componentes importantes de la membrana plasmática de la célula, donde se pueden encontrar en formas tales como fosfolípidos. Los PUFA también actúan como precursores de otras moléculas de importancia en los seres humanos y animales, que incluyen las prostaciclina, leucotrienos y prostaglandinas. Los PUFA son necesarios para el desarrollo propiamente dicho, particularmente en el desarrollo del cerebro del niño, y para la formación y reparación tisular.

20 Los cuatro PUFA de cadena larga principales incluyen el ácido docosahexenoico (DHA) y ácido eicosapentenoico (EPA), que se encuentran fundamentalmente en distintos tipos de aceites de pescado, el ácido gamma-linolénico (GLA), que se encuentra en las semillas de una serie de plantas, que incluyen la primavera (*Oenothera biennis*), la borraja (*Borago officinalis*) y el grosellero negro (*Ribes nigrum*), y el ácido estearidónico (SDA), que se encuentra en aceites marinos y semillas vegetales. El GLA y otro PUFA de cadena larga importante, el ácido araquidónico (ARA), se encuentran en los hongos filamentosos. El ARA se puede purificar a partir de tejidos animales que incluyen el hígado y la glándula suprarrenal. El ácido Mead se acumula en animales que carecen de ácido graso esencial.

30 Para el DHA, existe una serie de fuentes para la producción comercial que incluyen una variedad de organismos marinos, aceites obtenidos de pescado de agua fría, y fracciones de yema de huevo. Para el ARA, se pueden usar microorganismos que incluyen los géneros *Mortierella*, *Entomophthora*, *Phytium* y *Porphyridium* para la producción comercial. Las fuentes comerciales de SDA incluyen los géneros *Trichodesma* y *Echium*. Las fuentes comerciales de GLA incluyen primavera, grosellero negro y borraja. Sin embargo, existen diversos inconvenientes asociados con la producción comercial de los PUFA a partir de fuentes naturales. Las fuentes naturales de los PUFA, tales como animales y plantas, tienden a tener composiciones de aceite altamente heterogéneas. Los aceites obtenidos de estas fuentes pueden por tanto requerir una extensa purificación para aislar uno o más PUFA deseados o para producir un aceite que esté enriquecido en uno o más PUFA. Las fuentes naturales también están sujetas a fluctuaciones incontrolables en la disponibilidad. Las reservas de peces pueden sufrir variación natural o se pueden agotar por sobrepesca. Los aceites de pescado tienen sabores y olores desagradables, que pueden ser económicamente imposibles de separar del producto deseado, y pueden hacer que tales productos resulten inaceptables como suplementos alimenticios. Los aceites animales, y particularmente los aceites de pescado, pueden acumular contaminantes ambientales. El clima y la enfermedad pueden provocar fluctuación en la producción de las fuentes vegetales y de pescado. El terreno de cultivo disponible para la producción de cosechas alternas productoras de aceite está sujeto a competencia a partir de la continua expansión de las poblaciones humanas y la mayor necesidad asociada de producción de alimentos en las tierras de cultivo que quedan. Los cultivos que producen PUFA, tales como la borraja, no han sido adaptados al desarrollo comercial y pueden no rendir bien en monocultivo. Por tanto el desarrollo de tales cultivos no es económicamente competitivo cuando se pueden implantar cultivos mejor establecidos y más aprovechables. La fermentación a gran escala de organismos tales como *Mortierella* también es costosa. Los tejidos animales naturales contienen bajas cantidades de ARA y son difíciles de procesar. Microorganismos tales como *Porphyridium* y *Mortierella* son difíciles de cultivar a escala comercial. Los suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas que contienen PUFA pueden mantener los inconvenientes de la fuente del PUFA. Suplementos tales como cápsulas de aceite de pescado pueden contener bajos niveles del componente particular deseado y por lo tanto requerir dosis grandes. Las dosis elevadas causan la ingestión de altos niveles de componentes no deseados. Se debe tener cuidado al proporcionar suplementos de ácidos grasos, ya que la sobreadición puede desembocar en la supresión de rutas biosintéticas endógenas y llevar a la competencia con otros ácidos grasos necesarios en diversas fracciones lipídicas *in vivo*, llevando a resultados indeseados. Por ejemplo, los esquimales que tienen una dieta alta en ácidos grasos ω 3 tienen una mayor tendencia a sangrar (Patente de EE.UU. N° 4.874.603). Los sabores y olores desagradables de los suplementos pueden volver tales regímenes indeseables, y pueden inhibir la aceptación por el paciente.

65 Una serie de enzimas están implicadas en la biosíntesis de PUFA. El ácido linoleico (LA, 18:2 Δ 9, 12) se produce a partir del ácido oleico (18:1 Δ 9) mediante una desaturasa- Δ 12. El GLA (LA, 18:3 Δ 6, 9, 12) se produce a partir del ácido linoleico (LA, 18:2 Δ 9, 12) mediante una desaturasa- Δ 6. La producción de ARA (20:4 Δ 5, 8, 11, 14) a partir de DGLA (20:3 Δ 8, 11, 14) está catalizada por una desaturasa- Δ 5. Sin embargo, los animales no pueden desaturar más allá de la posición Δ 9 y por lo tanto no pueden transformar ácido oleico (18:1 Δ 9) en ácido linoleico (18:2 Δ 9, 12). Asimismo, el ácido α -linolénico (ALA, 18:3 Δ 9, 12, 15) no puede ser sintetizado por mamíferos. Otros eucariotas, que incluyen hongos y plantas, tienen enzimas que desaturan en las posiciones Δ 12 y Δ 15. Los principales ácidos grasos

poliinsaturados derivan por tanto de la dieta y/o desaturación y elongación del ácido linoleico (ALA, 18:2 Δ 9, 12) o ácido α -linolénico (18:3 Δ 9, 12, 15).

Los ácidos grasos poliinsaturados se consideran útiles para propósitos nutricionales, farmacéuticos, industriales y otros. Un suministro expansivo de ácidos grasos poliinsaturados a partir de fuentes naturales y de síntesis química no basta para las necesidades comerciales. Por lo tanto es de interés obtener material genético implicado en la biosíntesis de PUFA a partir de especies que producen estos ácidos grasos de manera natural y expresar el material aislado por separado o en combinación en un sistema heterogéneo que se puede manipular para permitir la producción de cantidades comerciales de PUFA.

Resumen de la invención

Se proporcionan composiciones y procedimientos nuevos para la preparación de ácido estearidónico y desaturasas en plantas y células vegetales. Los procedimientos implican cultivar una planta que tiene integrado en su genoma un primer constructo de ADN que comprende, en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla vegetal, una secuencia de ADN que codifica una delta-seis desaturasa, y una región de terminación de la transcripción funcional en una célula vegetal, y un segundo constructo que comprende en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla vegetal, y una secuencia de ADN que codifica una delta-15 desaturasa y cultivar dicha planta bajo condiciones mediante las cuales se expresen dicha delta-seis desaturasa y dicha delta-15 desaturasa. Preferiblemente, dicha planta tiene un tercer constructo integrado en su genoma, en el que dicho tercer constructo tiene en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla vegetal, y una secuencia de ADN que codifica una desaturasa delta 12. La expresión del polipéptido de desaturasa proporciona una alteración del perfil de PUFA de las células de la planta huésped como consecuencia de concentraciones alteradas de enzimas implicadas en la biosíntesis de PUFA. Es de particular interés el control selectivo de la producción de PUFA en semillas vegetales. La invención encuentra uso en la producción a gran escala de ácido estearidónico y modificación de la forma del perfil de ácido graso de semillas y/o aceites de semillas vegetales.

La invención proporciona además una planta transgénica o semilla de la misma que tiene integrado en su genoma un primer constructo de ADN que comprende, en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla vegetal, un ADN que codifica una delta-seis desaturasa, y una región de terminación de la transcripción funcional en una célula vegetal, y un segundo constructo que comprende, en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla vegetal, y una secuencia de ADN que codifica una delta-15 desaturasa, que es capaz de expresar la delta-seis desaturasa y la delta-15 desaturasa y de producir aceite de semilla que contenga ácido estearidónico también es parte de la invención. La semilla de la planta transgénica anterior comprende preferiblemente aproximadamente un 5 por ciento en peso del ácido estearidónico mayor como componente de los ácidos grasos totales que se encuentran en el aceite de semilla. La invención proporciona además aceite de semilla obtenido a partir de la semilla de dicha planta transgénica y un tejido de semilla vegetal de dicha planta transgénica que comprende dicho aceite de semilla.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra posibles rutas para la síntesis de ácido Mead (20:3 Δ 5, 8, 11), ácido araquidónico (20:4 Δ 5, 8, 11, 14) y ácido estearidónico (18:4 Δ 6, 9, 12, 15) a partir de ácido palmítico (C_{16}) de una variedad de organismos, que incluyen algas, *Mortierella* y humanos. Estos PUFA pueden actuar como precursores de otras moléculas importantes para humanos y otros animales, que incluyen prostaciclina, leucotrienos, y prostaglandinas, algunas de las cuales se muestran.

La Figura 2 muestra posibles rutas para la producción de PUFA además de ARA, que incluyen ácido taxoleico y pinolénico, de nuevo reunidos a partir de una variedad de organismos.

Descripción de las formas de realización preferidas

Para asegurar una total comprensión de la invención, se proporcionan las siguientes definiciones:

Δ 5-Desaturasa: La Δ 5-desaturasa es una enzima que introduce un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 desde el extremo carboxilo de una molécula de ácido graso.

Δ 6-Desaturasa: La Δ 6-desaturasa es una enzima que introduce un doble enlace entre los carbonos 6 y 7 desde el extremo carboxilo de una molécula de ácido graso.

Δ 9-Desaturasa: La Δ 9-desaturasa es una enzima que introduce un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 desde el extremo carboxilo de una molécula de ácido graso.

Δ 12-Desaturasa: La Δ 12-desaturasa es una enzima que introduce un doble enlace entre los carbonos 12 y 13 desde el extremo carboxilo de una molécula de ácido graso.

ES 2 293 726 T3

Ácidos grasos: Los ácidos grasos son una clase de compuestos que contienen una cadena hidrocarbonada larga y un grupo carboxilato terminal. Los ácidos grasos incluyen los siguientes:

Ácido graso			
5	12:0	Ácido láurico	
10	16:0	Ácido palmítico	
	16:1	Ácido palmitoleico	
	18:0	Ácido esteárico	
15	18:1	Ácido oleico	$\Delta 9-18:1$
	18:2 $\Delta 5,9$	Ácido taxoleico	$\Delta 5,9-18:2$
	18:2 $\Delta 6,9$	Ácido 6,9-octadecadienoico	$\Delta 6,9-18:2$
20	18:2	Ácido linoleico	$\Delta 9,12-18:2$ (LA)
	18:3 $\Delta 6,9,12$	Ácido gamma-linolénico	$\Delta 6,9,12-18:3$ (GLA)
25	18:3 $\Delta 5,9,12$	Ácido pinolénico	$\Delta 5,9,12-18:3$
	18:3	Ácido alfa-linolénico	$\Delta 9,12,15-18:3$ (ALA)
	18:4	Ácido estearidónico	$\Delta 6,9,12,15-18:4$ (SDA)
30	20:0	Ácido araquídico	
	20:1	Ácido eicosécico	
	20:2 $\Delta 8, 11$		$\Delta 8, 11$
35	20:3 $\Delta 5, 8, 11$	Ácido Mead	$\Delta 5, 8, 11$
	22:0	Ácido behenoico	
40	22:1	Ácido erúcico	
	22:2	Ácido docasadienoico	
	20:4 $\gamma 6$	Ácido araquidónico	$\Delta 5,8,11,14-20:4$ (ARA)
45	20:3 $\gamma 6$	$\gamma 6$ -eicosatrienoico dihomo-gamma linolénico	$\Delta 8,11,14-20:3$ (DGLA)
50	20:5 $\gamma 3$	Eicosapentenoico (Ácido timnodónico)	$\Delta 5,8,11,14,17-20:5$ (EPA)
	20:3 $\gamma 3$	$\gamma 3$ - eicosatrienoico	$\Delta 11,16,17-20:3$
	20:4 $\gamma 3$	$\gamma 3$ - eicosatetraenoico	$\Delta 8,11,14,17-20:4$
55	22:5 $\gamma 3$	Docosapentenoico	$\Delta 7,10,13,16,19-22:5$ ($\gamma 3$ DPA)
	22:6 $\gamma 3$	Docosahexenoico (ácido cervónico)	$\Delta 4,7,10,13,16,19-22:6$ (DHA)
60	24:0	Ácido lignocérico	

65 Teniendo en cuenta estas definiciones, la presente invención está dirigida a constructos de ADN relacionados con la producción de ácidos grasos en plantas. Se proporcionan procedimientos y composiciones que permiten la modificación del contenido en ácido graso poliinsaturado de cadena larga de las células vegetales. Las células vegetales

se transforman con un casete de expresión que comprende un ADN que codifica un polipéptido capaz de aumentar la cantidad de uno o más PUFA en una célula vegetal. Los constructos de integración proporcionan la integración del casete de expresión en el genoma de una célula huésped. Las células huésped se manipulan para expresar un ADN sentido que codifica un(os) polipéptido(s) que tiene(n) actividad desaturasa. Por “desaturasa” se quiere decir un polipéptido que puede desaturar uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso mono- o poli-insaturado o un precursor de interés del mismo. Por “polipéptido” se quiere decir cualquier cadena de aminoácidos, sin tener en cuenta la longitud o modificación post-traducciona, por ejemplo, glicosilación o fosforilación. El/los sustrato(s) para la enzima expresada puede(n) ser producido(s) por la célula huésped o se pueden suministrar exógenamente.

Para conseguir la expresión en una célula huésped, el ADN transformado se asocia operativamente con las regiones reguladoras de iniciación y terminación transcritora y traductora que son funcionales en la célula huésped. Los constructos que comprenden el gen que se va a expresar proporcionan integración en el genoma de la célula huésped. Para la producción de SDA, los casetes de expresión incluyen un casete que proporciona actividad desaturasa $\Delta 6$, particularmente en una célula huésped que produzca o pueda absorber ALA.

Producción de ácidos grasos por plantas transgénicas

La producción de ácidos grasos por plantas transgénicas ofrece diversos inconvenientes sobre la purificación a partir de fuentes naturales tales como el pescado o las plantas. La producción de ácidos grasos a partir de plantas recombinantes proporciona la capacidad de alterar el perfil de ácidos grasos en plantas que aparece de manera natural proporcionando nuevas rutas sintéticas en el huésped, incrementando de este modo los niveles de los PUFA deseados, o formas conjugadas de los mismos, y reduciendo los niveles de los PUFA no deseados. La producción de ácidos grasos en plantas transgénicas también ofrece la ventaja de que la expresión de genes de desaturasa en tejidos y/o partes vegetales particulares significa que se pueden lograr los niveles de los PUFA deseados aumentados en gran parte en esos tejidos y/o partes, haciendo más económica la recuperación a partir de esos tejidos. Los PUFA deseados se pueden expresar en semillas; los procedimientos de aislamiento de aceites de semillas están bien establecidos. Además de proporcionar una fuente para la purificación de los PUFA deseados, los componentes de aceite de semilla pueden manipularse mediante la expresión de genes de desaturasa, por separado o en combinación con otros genes tales como los de elongasas, para proporcionar aceites de semillas que tengan un perfil de PUFA particular en forma concentrada. Los aceites de semillas concentrados que pueden añadirse a leches animales y/o leches sintéticas o semi-sintéticas para actuar como fórmulas para bebés en las que el cuidado humano es imposible o indeseado, o en casos de malnutrición o enfermedad en adultos y bebés.

Para la producción de ácido estearidónico, dependiendo de la célula huésped, la disponibilidad de sustrato, y el/los producto(s) final(es) deseado(s), diversos polipéptidos, particularmente desaturasas, resultan de interés incluyendo aquellos polipéptidos que catalizan la conversión de ALA en SDA, de ácido oleico en LA, o de LA en ALA, que incluyen enzimas que desaturan en las posiciones $\Delta 6$, $\Delta 12$ ó $\Delta 15$. Las consideraciones para elegir un polipéptido específico que tenga actividad desaturasa incluyen el pH óptimo del polipéptido, si el polipéptido es una enzima limitante de la velocidad o un componente de la misma, si la desaturasa usada es esencial para la síntesis de un ácido graso poli-insaturado deseado, y/o cofactores requeridos por el polipéptido. El polipéptido expresado preferiblemente tiene parámetros compatibles con el ambiente bioquímico de su ubicación en la célula huésped. Los análisis de la K_m y la actividad específica del polipéptido en cuestión se consideran por lo tanto en la determinación de la aptitud de un polipéptido dado para modificar la producción de PUFA en una célula huésped dada. Por tanto el polipéptido usado en un situación particular es uno que puede funcionar bajo las condiciones presentes en la célula huésped deseada pero de otra forma puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad desaturasa que tenga las características deseadas de ser capaz de modificar la producción relativa de ácido araquidónico. En la Figura 1 se muestra un esquema ejemplar para la síntesis de ácido araquidónico (20:4 $\Delta 5$, 8, 11, 14) a partir de ácido palmítico (C_{16}). Una enzima clave en esta ruta es una desaturasa- $\Delta 5$ que transforma el ácido DH- γ -linolénico (DGLA, ácido eicosatrienoico) en ARA. También se muestra la conversión de ácido α -linolénico (ALA) en ácido estearidónico por una desaturasa- $\Delta 6$. En la Figura 2 se muestra la producción de los PUFA junto con la de ARA, que incluyen EPA y DHA. Una enzima clave en la síntesis de ácido araquidónico (20:4 $\Delta 5$, 8, 11, 14) a partir de ácido esteárico (C_{18}) es una $\Delta 6$ -desaturasa que transforma el ácido linoleico en ácido γ -linolénico. También se muestra la conversión de ácido α -linolénico (ALA) en ácido estearidónico por una $\Delta 6$ -desaturasa. La elección de la combinación de casetes usados depende en parte del perfil de PUFA de la célula huésped.

Fuentes de polipéptidos que tienen actividad desaturasa

Las fuentes de polipéptidos que tienen actividad desaturasa y de oligonucleótidos que codifican para tales polipéptidos son organismos que producen un ácido graso poliinsaturado deseado. A modo de ejemplo, microorganismos cuyo GLA o SDA se puede usar como fuente de genes de $\Delta 6$ -desaturasa y/o $\Delta 12$ -desaturasa. Tales microorganismos incluyen, por ejemplo, aquellos pertenecientes a los géneros *Mortierella*, *Conidiobolus*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Porphyridium*, *Coidosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, y *Entomophthora*. En el contexto de la invención, la secuencia codificadora de la desaturasa- $\Delta 6$ es preferiblemente de los genes de *Mortierella*. Dentro del género *Porphyridium*, es de particular interés *Porphyridium cruentum*. Dentro del género *Mortierella*, son de particular interés *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella hygrophila*, *Mortierella ramanniana* var. *angulispota*, y *Mortierella alpina*. Dentro del género *Mucor*, son de particular interés *Mucor circinelloides* y *Mucor javanicus*.

ES 2 293 726 T3

Los ADN que codifican para desaturasas deseadas pueden identificarse de una variedad de maneras. A modo de ejemplo, una fuente de la desaturasa deseada, por ejemplo bibliotecas genómicas o de ADNc de *Mortierella*, se explora con sondas sintetizadas enzimática o químicamente detectables, que pueden estar hechas de ADN, ARN, o nucleótidos que no aparecen de forma natural, o de mezclas de los mismos. Las sondas pueden sintetizarse enzimáticamente a partir de ADN de desaturasas conocidas para procedimientos de hibridación normal o de rigor reducido. También pueden usarse sondas de oligonucleótidos para explorar fuentes y pueden basarse en secuencias de desaturasas conocidas, que incluyen secuencias conservadas entre desaturasas conocidas, o en secuencias peptídicas obtenidas a partir de la proteína purificada deseada. Las sondas de oligonucleótidos basadas en secuencias de aminoácidos pueden degenerarse para englobar la degeneración del código genético, o pueden predisponerse a favor de los codones preferidos del organismo fuente. También se pueden usar oligonucleótidos como cebadores para PCR a partir de ARNm transcrito inverso a partir de una fuente conocida o sospechosa; el producto del PCR puede ser el ADNc de longitud completa o se puede usar para generar una sonda para obtener el ADNc de longitud completa deseado. De manera alternativa, se puede secuenciar totalmente una proteína deseada y llevar a cabo la síntesis completa de un ADNc que codifique para ese polipéptido.

Una vez que se ha aislado el genoma o ADNc deseado, se puede secuenciar mediante procedimientos conocidos. Se admite en la técnica que tales procedimientos están sujetos a errores, tales como que la secuenciación múltiple de la misma región es habitual y aún así se espera que produzca tasas medibles de fallos en la secuencia resultante deducida, particularmente en regiones que tienen dominios repetidos, una estructura secundaria extensa, o composiciones e bases inusuales, tales como regiones con elevado contenido en bases GC. Cuando surgen discrepancias, se puede hacer resecuenciación y se pueden emplear procedimientos especiales. Los procedimientos especiales pueden incluir alterar las condiciones de secuenciación usando; distintas temperaturas; distintas enzimas; proteínas que alteren la capacidad de los oligonucleótidos para formar estructuras de orden superior; nucleótidos alterados tales como ITP o dGTP metilado; distintas composiciones de geles, por ejemplo añadiendo formamida; distintos cebadores o cebadores localizados a distintas distancias de la región problema; o distintas plantillas tales como ADN de cadena simple. También puede emplearse secuenciación de ARNm.

Para la mayor parte, algunas o todas las secuencias codificadoras para el polipéptido que tiene actividad desaturasa son de una fuente natural. En algunas situaciones, no obstante, es deseable modificar todos o una parte de los codones, por ejemplo, para mejorar la expresión, empleando codones preferidos del huésped. Se pueden determinar los codones preferidos del huésped a partir de los codones de mayor frecuencia en las proteínas expresadas en la mayor cantidad en una especie huésped particular de interés. Por tanto, la secuencia codificadora para un polipéptido que tenga actividad desaturasa puede sintetizarse completa o en parte. También puede sintetizarse todo o partes del ADN para eliminar secuencias o regiones desestabilizantes cualesquiera de estructura secundaria que aparecieran en el ARNm transcrito. También puede sintetizarse todo o partes del ADN para cambiar la composición de bases a una más preferible en la célula huésped deseada. En la literatura están bien establecidos los procedimientos para sintetizar secuencias y reunir secuencias. Puede emplearse mutagénesis y selección *in vitro*, mutagénesis dirigida al sitio, u otros medios para obtener mutaciones de genes de desaturasa que aparecen de forma natural para producir un polipéptido que tenga actividad desaturasa *in vivo* con parámetros físicos y cinéticos más deseados para operar en la célula huésped, tal como una vida media más larga o una mayor tasa de producción de un ácido graso poliinsaturado deseado.

Los ADNc deseables tienen menos del 60% de composición de A+T, preferiblemente menos del 50% de composición de A+T. Sobre una escala localizada de una ventana móvil de 20 pares de bases, es preferible que haya regiones no localizadas del ADNc con más del 75% de composición de A+T; con una ventana de 60 pares de bases, es preferible que haya regiones no localizadas del ADNc con más del 60%, más preferiblemente regiones no localizadas con más del 55% de composición de A+T.

Desaturasas de *Mortierella alpina*

Son de particular interés la $\Delta 6$ -desaturasa, la $\Delta 12$ -desaturasa y la $\Delta 15$ -desaturasa de *Mortierella alpina*. El gen que codifica la $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina* se puede expresar en plantas o animales transgénicos para efectuar una mayor síntesis de ácido estearidónico (SDA) a partir de ALA. También pueden usarse otros ADN que son sustancialmente idénticos en secuencia al ADN de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina*, o que codifican para polipéptidos que son sustancialmente idénticos en secuencia al polipéptido de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina*.

El gen que codifica la $\Delta 12$ -desaturasa de *Mortierella alpina* se puede expresar en plantas transgénicas para efectuar una mayor síntesis de LA a partir de ácido oleico. También pueden usarse otros ADN que son sustancialmente idénticos al ADN de la $\Delta 12$ -desaturasa de *Mortierella alpina*, o que codifican para polipéptidos que son sustancialmente idénticos al polipéptido de la $\Delta 12$ -desaturasa de *Mortierella alpina*.

Por sustancialmente idénticos en secuencia se quiere decir una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que exhibe en orden de preferencia creciente al menos un 60%, 80%, 90% ó 95% de homología con la secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la desaturasa de *Mortierella alpina*. Para los polipéptidos, la longitud de secuencias de comparación es generalmente de al menos 16 aminoácidos, preferiblemente de al menos 20 aminoácidos, o más preferiblemente de 35 aminoácidos. Para los ácidos nucleicos, la longitud de secuencias de comparación es generalmente de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 60 nucleótidos, más preferiblemente de 75 nucleótidos, y más preferiblemente, 110 nucleótidos. La homología se mide típicamente usando un software de análisis de secuencias, por ejemplo, el paquete de software de

Análisis de Secuencias del Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Centro de Biotecnología, Avenida Universidad 1710, Madison, Wisconsin 53705, MEGAlign (DNASar, Inc., S. Park St. 1228, Madison, Wisconsin 53715), y MacVector (Oxford Molecular Group, Avenida S. Bascom 2105, Suite 200, Campbell, California 95008). Tal software une secuencias similares asignando distintos grados de homología a diversas sustituciones, deleciones, y otras modificaciones. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. También se pueden hacer sustituciones en base a la hidrofobicidad o hidrofilia conservadas (Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157: 105-132, 1982) o en base a la capacidad de asumir una estructura secundaria polipeptídica similar. (Chou y Pasman, *Adv. Enzymol.* 47: 45-148, 1978).

Expresión de genes de desaturasa

Una vez se ha obtenido el ADN que codifica un polipéptido de desaturasa, se sitúa en un vector capaz de replicarse en una célula huésped, o se propaga *in vitro* por medio de técnicas tales como PCR o PCR long. Los vectores replicantes pueden incluir plásmidos, fagos, virus y cósmidos. Los vectores deseables incluyen aquellos útiles para la mutagénesis del gen de interés o para la expresión del gen de interés en células huésped. La técnica del PCR long ha hecho posible la propagación *in vitro* de constructos grandes, para que puedan tener lugar modificaciones del gen de interés, tales como mutagénesis o adición de señales de expresión, y la propagación de los constructos resultantes totalmente *in vitro* sin el uso de un vector replicante o una célula huésped.

Para la expresión de un polipéptido de desaturasa, las regiones funcionales de iniciación y terminación transcritora y traductora están operativamente ligadas al ADN que codifica el polipéptido de desaturasa. Las regiones de iniciación y terminación transcritora y traductora derivan de una variedad de fuentes no exclusivas, que incluyen el ADN que se va a expresar, genes que se sabe o se sospecha que son capaces de expresarse en el sistema deseado, vectores de expresión, síntesis química, o de un locus endógeno en una célula huésped. La expresión en un tejido y/o parte vegetal presenta ciertos aprovechamientos, particularmente cuando el tejido o parte es uno que puede recogerse fácilmente, como una semilla, hojas, frutos, flores, raíces, etc. La expresión puede dirigirse a esa localización dentro de la planta usando secuencias reguladoras específicas, tales como las de los documentos USPN 5.463.174, USPN 4.943.674, USPN 5.106.739, USPN 5.175.095, USPN 5.420.034, USPN 5.188.958, y USPN 5.589.379. De manera alternativa, la proteína expresada puede ser una enzima que produzca un producto que pueda incorporarse, bien directamente o tras modificaciones adicionales, en una fracción de fluido de la planta huésped. En el caso presente, la expresión de genes de desaturasa puede alterar los niveles de ácido estearidónico que se encuentra en la semilla vegetal y/o tejidos de semillas vegetales. La región de iniciación es un promotor funcional en una célula de semilla vegetal. Preferiblemente, el promotor del primer constructo de ADN es un promotor de napina o es de la región de iniciación de la transcripción de la subunidad 7S de la β -conglucina de la soja. La región de terminación es funcional en una célula vegetal. Puede derivar de la región 3' del gen a partir del cual se obtuvo la región de iniciación o de un gen distinto. Se conoce un gran número de regiones de terminación que se ha encontrado que son satisfactorias en una diversidad de huéspedes del mismo y de distintos géneros y especies. La región de terminación se selecciona habitualmente más según un criterio de conveniencia que por alguna propiedad particular.

La elección de una célula huésped viene influida en parte por el perfil de PUFA deseado de la célula transgénica, y el perfil nativo de la célula huésped. A modo de ejemplo, para la producción de ácido linoleico a partir de ácido oleico, la secuencia de ADN usada codifica un polipéptido que tiene actividad $\Delta 12$ -desaturasa, y para la producción de GLA a partir de ácido linoleico, la secuencia de ADN usada codifica un polipéptido que tiene actividad $\Delta 6$ -desaturasa. El uso de una célula huésped que expresa actividad $\Delta 12$ -desaturasa y carece de actividad $\Delta 15$ -desaturasa o está reducida, se puede usar con un casete de expresión que proporcione sobreexpresión de la $\Delta 6$ -desaturasa por separado generalmente es suficiente para proporcionar una producción mejorada de GLA en la célula transgénica. En casos particulares en los que la expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa está emparejada con la expresión de una actividad $\Delta 12$ -desaturasa, es deseable que la célula huésped tenga de forma natural, o sea mutada para que tenga, una baja actividad $\Delta 15$ -desaturasa. De manera alternativa, una célula huésped para la expresión de actividad $\Delta 6$ -desaturasa puede tener, o ser mutada para que tenga, elevada actividad $\Delta 12$ -desaturasa.

La expresión en una célula huésped puede llevarse a cabo de forma temporal o estable. La expresión temporal puede tener lugar a partir de constructos introducidos que contienen señales de expresión funcionales en la célula huésped, pero cuyos constructos no se replican y raramente se integran en la célula huésped, o cuando la célula huésped no se está multiplicando. También puede llevarse a cabo la expresión temporal induciendo la actividad de un promotor regulable ligado operativamente al gen de interés, aunque tales sistemas inducibles frecuentemente exhiben un bajo nivel basal de expresión. La expresión estable se puede conseguir mediante la introducción de un constructo que pueda integrarse en el genoma del huésped o que se replique de forma autónoma en la célula huésped. La expresión estable del gen de interés se puede seleccionar mediante el uso de un marcador seleccionable localizado en o transferido con el constructo de expresión, seguido por la selección de células que expresen el marcador. En la presente invención, la expresión estable en la planta deviene de la integración. La integración de constructos puede suceder aleatoriamente dentro del genoma del huésped o puede dirigirse mediante el uso de constructos que contengan regiones de homología con el genoma del huésped suficientes para dirigir la recombinación con el locus del huésped. Cuando los constructos se dirigen aun locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras transcriptoras y traductoras pueden ser proporcionadas por el locus endógeno.

ES 2 293 726 T3

5 Cuando se desee una mayor expresión del polipéptido de desaturasa en la planta fuente, pueden emplearse diversos procedimientos. Pueden introducirse genes adicionales que codifiquen para el polipéptido de desaturasa en el organismo huésped. También se puede incrementar la expresión del locus de desaturasa nativo mediante recombinación homóloga, por ejemplo insertando un promotor más fuerte en el genoma del huésped para provocar un aumento de la expresión, eliminando secuencias desestabilizantes del ARNm o de la proteína codificada borrando esa información del genoma del huésped, o añadiendo secuencias estabilizantes al ARNm (véanse documentos USPN 4.910,141 y USPN 5.500.365).

10 Cuando es deseable expresar más de un gen distinto, regiones reguladores apropiadas y procedimientos de expresión, se pueden propagar genes introducidos en la célula huésped mediante integración en el genoma del huésped. Cada constructo introducido debería tener un medio diferente de selección y debería de carecer de homología con los otros constructos para mantener la expresión estable y evitar el intercambio de elementos entre constructos. Las elecciones acertadas de regiones reguladoras, medios de selección y procedimiento de propagación del constructo introducido pueden determinarse experimentalmente de modo que todos los genes introducidos se expresen en los niveles necesarios para proporcionar la síntesis de los productos deseados.

15 Los constructos que comprenden el gen de interés se pueden introducir en una célula huésped mediante técnicas de referencia. Estas técnicas incluyen la transfección, infección, impacto bolístico, electroporación, microinyección, raspado, o cualquier otro procedimiento que introduzca el gen de interés en la célula huésped (véanse documentos USPN 4.743.548, USPN 4.795.855, USPN 5.068.193, USPN 5.188.958, USPN 5.463.174, USPN 5.565.346 y USPN 5.565.347). Por conveniencia, una célula huésped que se haya manipulado mediante cualquier procedimiento para originar una secuencia de ADN o constructo aquí será referida como “transformada” o “recombinante”. El huésped sujeto tendrá al menos una copia del constructo de expresión y puede tener dos o más, dependiendo de si el gen solamente está integrado en el genoma o si adicionalmente está amplificado, o si está presente en un elemento extracromosómico que tenga cantidades múltiples de copias.

20 La célula huésped transformada se puede identificar mediante la selección de un marcador contenido en el constructo introducido. De manera alternativa, se puede introducir un marcador distinto con el constructo deseado, puesto que muchas técnicas de transformación introducen muchas moléculas de ADN en las células huésped. Típicamente, los huéspedes transformados se seleccionan por su capacidad para crecer en medios selectivos. Los medios selectivos pueden incorporar un antibiótico o carecer de un factor necesario para el crecimiento del huésped no transformado, tal como un nutriente o un factor de crecimiento. Un gen marcador introducido puede por tanto conferir resistencia a los antibióticos, o codificar para un factor de crecimiento o enzima esencial, y permitir el crecimiento en medios selectivos cuando se expresa en la célula huésped transformada. De forma ideal, son de interés la resistencia a la kanamicina y el aminoglicósido G418 (ver documento USPN 5.034.322). La selección de un huésped transformado puede tener lugar también cuando la proteína marcadora expresada pueda detectarse, directa o indirectamente. La proteína marcadora se puede expresar aislada o fusionada con otra proteína. La proteína marcadora se puede detectar por su actividad enzimática; por ejemplo la β -galactosidasa puede transformar el sustrato X-gal en un producto coloreado, y la luciferasa puede transformar la luciferina en un producto emisor de luz. La proteína marcadora se puede detectar por sus características productoras de luz o modificadoras; por ejemplo la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* fluoresce cuando se le ilumina con luz azul. Se pueden usar anticuerpos para detectar la proteína marcadora o una marca molecular en, por ejemplo, una proteína de interés. Las células que expresan la proteína marcadora o la marca pueden seleccionarse, por ejemplo, visualmente, o mediante técnicas tales como FACS o separando usando anticuerpos.

25 El ácido estearidónico producido usando los procedimientos y composiciones de la invención se puede encontrar en el tejido y/o semilla de la planta huésped como ácidos grasos libres o en formas conjugadas tales como acilgliceroles, fosfolípidos, sulfolípidos o glicolípidos, y se puede extraer de la célula huésped mediante una variedad de medios bien conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir la extracción con disolventes orgánicos, sonicación, extracción de fluido supercrítico usando por ejemplo dióxido de carbono, y medios físicos tales como prensas, o combinaciones de los mismos. Es de particular interés la extracción con hexano o metanol y cloroformo. Cuando se desee, se puede acidificar la capa acuosa para protonar las partículas cargadas negativamente e incrementar de este modo la división de los productos deseados en la capa orgánica. Tras la extracción, se pueden eliminar los disolventes orgánicos mediante evaporación bajo un flujo de nitrógeno. Cuando estén aislados en formas conjugadas, los productos se separan enzimática o químicamente para liberar el ácido graso libre o un conjugado de interés menos complejo, y después se someten a manipulaciones adicionales para producir un producto final deseado. De forma ideal, las formas conjugadas de ácidos grasos se separan con hidróxido potásico.

30 Sorprendentemente, como se demuestra de forma más completa en los ejemplos que siguen, la expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella* conduce a la producción de ácido estearidónico en el aceite extraído del tejido de la semilla de las células de la planta huésped. Además, la expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa con desaturasas adicionales proporcionó la mejora de la producción de SDA en el aceite de semilla.

35 Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos para la producción de ácido estearidónico (C18:4) en semillas de plantas huésped. Los procedimientos permiten la producción de SDA en semillas de plantas huésped que varían del 0,3% en peso hasta al menos el 30% en peso; preferiblemente del 5% en peso hasta al menos el 25% en peso; más preferiblemente del 7% en peso hasta al menos el 25% en peso. El SDA se produce preferiblemente en el aceite de la semilla de plantas huésped que contengan uno o más constructos de expresión como aquí se ha descrito.

Además, la presente invención proporciona una nueva fuente de aceites vegetales que contienen ácido estearidónico. Los aceites se obtienen preferiblemente del tejido de la semilla de la planta o extrayendo el aceite de dicha semilla vegetal. Los aceites de semilla contienen cantidades de SDA que varían del 0,3% en peso hasta al menos el 30% en peso, preferiblemente del 5% en peso hasta al menos el 25% en peso, más preferiblemente del 7% en peso hasta al menos el 25% en peso.

Purificación de ácidos grasos

Si es necesaria una mayor purificación, se pueden emplear procedimientos habituales. Tales procedimientos incluyen extracción, tratamiento con urea, cristalización fraccionaria, HPLC, destilación fraccionaria, cromatografía sobre gel de sílice, centrifugación o destilación de alta velocidad, o combinaciones de estas técnicas. Se puede efectuar la protección de los grupos reactivos, tales como los grupos ácido o alqueno, en cualquier etapa mediante técnicas conocidas, por ejemplo alquilación o yodación. Los procedimientos usados incluyen la metilación de los ácidos grasos para producir ésteres de metilo. De forma similar, se pueden eliminar los grupos protectores en cualquier etapa. De manera ideal, la purificación de fracciones que contengan ARA, DHA y EPA se consigue mediante tratamiento con urea y/o destilación fraccionaria.

Usos de los ácidos grasos

Los usos de los ácidos grasos de la invención temática son diversos. Las sondas basadas en los ADN de la presente invención pueden encontrar uso en procedimientos para aislar moléculas relacionadas o en procedimientos para detectar organismos que expresan desaturasas. Cuando se usan como sondas, los ADN u oligonucleótidos necesitan ser detectables. Esto se consigue habitualmente fijando una marca en cualquier lugar interno, por ejemplo por medio de la incorporación de un residuo modificado, o en el terminal 5' o 3'. Tales marcas pueden detectarse directamente, pueden unirse a una molécula secundaria que esté marcada de forma detectable, o pueden unirse a una molécula secundaria no marcada y a una molécula terciaria que esté marcada de forma detectable; este proceso se puede extender tanto como sea práctico para lograr una señal satisfactoriamente detectable sin niveles inaceptables de señal de fondo. Los sistemas secundarios, terciarios y de puenteado pueden incluir el uso de anticuerpos dirigidos contra cualquier otra molécula, incluyendo marcas u otros anticuerpos, o puede involucrar a moléculas cualesquiera que se unan entre sí, por ejemplo un sistema de biotina-estreptavidina/avidina. Las marcas detectables incluyen típicamente isótopos radiactivos, moléculas que producen o alteran la luz química o enzimáticamente, enzimas que producen productos de reacción detectables, moléculas magnéticas, moléculas fluorescentes o moléculas cuyas características de fluorescencia o de emisión de luz cambian tras la unión. Pueden hallarse ejemplos de procedimientos de marcaje en el documento USPN 5.011.770.

De manera alternativa, la unión de moléculas diana puede detectarse directamente midiendo el cambio de calor de la solución sobre la unión de la sonda al objetivo por medio de calorimetría de titulación isotérmica, o recubriendo la sonda u objetivo sobre una superficie y detectando el cambio con un barrido de luz de la superficie producida por la unión del objetivo o sonda, respectivamente, como se puede hacer con el sistema BIAcore.

La invención se entenderá mejor mediante referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

*Expresión de la ω -3-desaturasa de *C. elegans* en plantas transgénicas*

La actividad $\Delta 15/\omega$ -3 de *Brassica napus* se puede incrementar mediante la expresión de una ω -3-desaturasa de *C. elegans*. El clon de ADNc fat-1 (Genbank accesión L41807; Sychalla, J. P., Kinney, A. J., y Browse, J. 1997. P.N.A.S. 94, 1142-1147) se obtuvo de John Browse en la Washington State University. El ADNc fat-1 se modificó mediante PCR para introducir sitios de clonación usando los siguientes cebadores:

Fat-1 directo:

5'-CUACUACUACUACTGCAGACAATGGTCGCTCATTCTCAGA-3'
(SEC ID NO:1)

Fat-1-inverso:

5 5'-CAUCAUCAUCAUGCGGCCGCTTACTTGGCCTTTGCCTT-3'
(SEC ID NO:2)

10 Estos cebadores permitieron la amplificación de toda la región codificadora y añadieron los sitios PstI y NotI a los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto del PCR se subclonó en pAMP1 (GIBCOBRL) usando el sistema CloneAmp (GIBCOBRL) para crear el pCGN5562. Se comprobó la secuencia secuenciando ambas cadenas para estar seguros de que no se habían introducido cambios mediante el PCR.

15 Se observó una diferencia en un par de bases en la región codificadora fat-1 de pCGN5562 en oposición a la secuencia Genbank fat-1. La C en la posición 705 de la secuencia fat-1 se había cambiado por una A en pCGN5562. Esto genera un cambio de un codón GAC a GAA, cambiando el residuo Asp en la posición 231 de fat-1 a un residuo Glu. Este cambio idéntico se observó en productos de dos reacciones de PCR independientes usando una plantilla de fat-1 y lo más probable es que no sea resultado de una mala incorporación de un nucleótido al PCR. Para la expresión específica de semillas, la región codificadora fat-1 se recortó del pCGN5562 como un fragmento PstI/NotI y se insertó entre los sitios PstI/NotI del vector binario, pCGN8623, para crear pCGN5563. El pCGN5563 se puede introducir en *Brassica napus* por medio de transformación mediada por *Agrobacterium*.

Construcción de pCGN8623

25 La región de poliunión del casete del promotor de napina, pCGN7770, se sustituyó ligando los siguientes oligonucleótidos:

30 5'- TCGACCTGCAGGAAGCTTGCGGCCGCGGATCC-3' (SEC ID NO:3)

y

5'- TCGAGGATCCGCGGCCGCAAGCTTCTGCAGG-3' (SEC ID NO:4)

35 Estos oligonucleótidos se ligaron al pCGN7770 digerido en SalI/XhoI para producir pCGN8619. Estos oligonucleótidos codifican los sitios de restricción BamHI, NotI, HindIII y PstI. pCGN8619 contiene los oligonucleótidos orientados tal que el sitio PstI está más próximo a la región reguladora 5' de la napina. Se retiró un fragmento que contenía la región reguladora 5' de la napina, de poliunión, y la región 3' de la napina del pCGN8619 mediante digestión con Asp7181. Se despuntó el extremo del fragmento rellenando los salientes 5' con fragmento de Klenow, después se ligó al pCGN5139 que había sido digerido con Asp7181 y HindII y se despuntó rellenando los salientes 5' con fragmento de Klenow. Un plásmido que contenía el inserto orientado de modo que el promotor de napina estuviera más próximo al sitio HindIII despuntado del pCGN5139 y el 3' de la napina estuviera más próximo al sitio HindIII despuntado se sometió a análisis de secuencias para confirmar la orientación del inserto y la integridad de las uniones de clonación. El plásmido resultante se designó pCGN8623.

50 Para producir elevados niveles de ácido estearidónico en *Brassica*, se puede combinar la ω -3-desaturasa de *C. elegans* con las Δ 6- y Δ 12-desaturasas y de *Mortierella alpina*. Pueden cruzarse plantas con pCGN5563 transformada con plantas con pCGN5544 transformada que expresen las Δ 6- y Δ 12-desaturasas, descritas en lo que sigue.

Se puede analizar el contenido de ácido estearidónico de las semillas F1 resultantes y pueden usarse las plantas F1 seleccionadas para auto-polinización para producir semillas F2, o como donantes para la producción de dihaploides, o cruces adicionales.

55 Un procedimiento alternativo para combinar el ADNc fat-1 con las Δ 6- y Δ 12-desaturasas de *M. alpina* es combinarlos en un ADN-T para transformación. La región codificadora fat-1 de pCGN5562 se puede recortar como un fragmento PstI/NotI e insertarse en pCGN8619 digerido en PstI/NotI. La unidad transcritora constituida por la región reguladora 5' de la napina, la región codificadora fat-1, y la región reguladora 3' de la napina se pueden recortar como un fragmento Sse83871 e insertarse en el tramo pCGN5544 con el Sse83871. El plásmido resultante contendría tres unidades transcriptoras de napina que contienen la ω -3-desaturasa de *C. elegans*, la Δ 6-desaturasa de *M. alpina*, y la Δ 12-desaturasa de *M. alpina*, todas orientadas en la misma dirección que la unidad transcritora 35S/nptII/tml usada para la selección del tejido transformado.

65

ES 2 293 726 T3

Ejemplo 2

Sobre-expresión de la Actividad $\Delta 15$ -Desaturasa en Canola Transgénica

5 La actividad de la $\Delta 15$ -desaturasa de *Brassica napus* puede incrementarse mediante sobre-expresión del clon de ADNc de la $\Delta 15$ -desaturasa.

Se obtuvo un clon de ADNc de la $\Delta 15$ -desaturasa de *B. napus* mediante amplificación de PCR del ADNc de la primera cadena derivado de la variedad 212/86 de *B. napus*. Los cebadores se basaron en la secuencia publicada:
10 Genbank # L01418 Arondel *et al*, 1992 Science 258:1353-1355.

Se usaron los siguientes cebadores:

15 **Bnd15-DIRECTO**

5'-CUACUACUACUAGAGCTCAGCGATGGTTGTTGCTATGGAC-3'
20 (SEC ID NO:5)

25 **Bnd15-INVERSO**

5'-CAUCAUCAUCAUGAATTCTTAATTGATTTTAGATTTG-3'
30 (SEC ID NO:6)

Estos cebadores permitieron la amplificación de toda la región codificadora y añadieron los sitios SacI y EcoRI a los extremos 5' y 3', respectivamente.

El producto del PCR se subclonó en pAMP1 (GIBCOBRL) usando el sistema CloneAmp (GIBCOBRL) para crear pCGN5520. Se comprobó la secuencia secuenciando ambas cadenas para asegurarse de que la estructura de lectura abierta permanecía intacta. Para la expresión específica de semillas, la región codificadora de la $\Delta 15$ -desaturasa se recortó del pCGN5520 como un fragmento BamHI/Sall y se insertó entre los sitios BglIII y XhoI del pCGN7770, para crear el pCGN5557. El fragmento PstI de pCGN5557 que contiene la región reguladora 5' de la napina, la $\Delta 15$ -desaturasa de *B. napus*, y la región reguladora 3' de la napina se insertan en el sitio PstI del vector binario, pCGN5138, para producir pCGN5558. El pCGN5558 se introdujo en *Brassica napus* por medio de transformación mediada por *Agrobacterium*.

Para producir elevados niveles de ácido estearidónico en *Brassica*, se puede combinar la $\Delta 15$ -desaturasa con las $\Delta 6$ - y $\Delta 12$ -desaturasas de *Mortierella alpina*. Pueden cruzarse plantas con pCGN5558 transformada con plantas con pCGN5544 transformada que expresen las $\Delta 6$ - y $\Delta 12$ -desaturasas. Se analiza el contenido de ácido estearidónico de las semillas F1 resultantes. El análisis GC-FAME de las medias semillas F1 reveló una acumulación significativa de SDA en el aceite de semilla de las líneas de *Brassica*. Los niveles de SDA (18:4) superiores a aproximadamente el 25% se obtuvieron en líneas hemizigóticas y se proporcionan en la Tabla 1. Las plantas F1 seleccionadas se pueden usar para auto-polinización para producir semillas F2, o como donantes para la producción de dihaploides, o cruces adicionales.

55

60

65

Tabla 1

ID Cepa	16:0	18:0	18:1	18:2	18:2	18:3	18:3	18:3	18:3	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	22:2
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	6	1,34	2,97	9,58	9,58	52,79	34,76	18,03	18,03	25,21	0,7	0,56	0,16	0,41	0,03	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	4,45	0,86	10,42	9,06	9,06	49,08	25,68	23,04	23,45	23,45	0,5	0,84	0,55	0,49	0	0,03
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	5,8	2,36	12,5	11,13	11,13	47,47	18,86	28,61	17,55	17,55	1,01	0,86	0,3	0,85	0	0,07
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	3,65	0,66	14,26	14,97	14,97	50,94	23,3	27,64	13,22	13,22	0,43	0,88	0,23	0,48	0,04	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	4,86	2,42	18,74	14,23	14,23	46,22	23	23,22	10,67	10,67	0,89	0,92	0,18	0,7	0,02	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	6,57	1,07	16,79	14	14	48,98	32,88	16,09	10,24	10,24	0,52	0,94	0,22	0,39	0,02	0,01

ES 2 293 726 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	5,85	2,09	8,81	19,12	19,12	50,89	12,03	38,86	9,09	1,39	0,78	0,45	1,23	0	0,04
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	4,69	2,04	17,46	21,1	21,1	43,38	24,28	19,1	8,5	0,73	0,96	0,37	0,56	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	5,43	1,69	16,59	22,2	22,2	44,4	16,57	27,83	6,34	0,9	1,03	0,32	0,81	0,03	0,05
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	4,28	1,34	18,83	27,24	27,24	40,54	20,91	19,63	5,03	0,73	0,88	0,27	0,7	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	4,47	1,38	21,43	26,89	26,89	39,04	18,78	20,26	4,06	0,73	0,91	0,41	0,48	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	4,77	1,12	18,4	31,1	31,1	38,51	19,62	18,88	3,52	0,64	0,8	0,21	0,7	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16- 1-3)	4,34	1,86	24,73	35,49	35,49	28,79	10,79	18	1,91	0,67	1,07	0,45	0,48	0	0,02

ES 2 293 726 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	5,24	1,44	22,2	20,02	20,02	42,76	28,69	14,07	5,98	0,67	0,79	0,26	0,45	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	5,34	2,2	22,68	18,6	18,6	43,14	31,45	11,69	5,5	0,82	0,87	0,25	0,53	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,98	2,9	25,23	21,21	21,21	38,78	24,6	14,18	4,98	1,02	1,04	0,24	0,57	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,94	1,77	28,92	20,89	20,89	37,02	21,71	15,32	4,96	0,64	1,09	0,3	0,43	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	5,12	1,24	27,7	19,02	19,02	40,2	31,05	9,16	4,76	0,48	0,77	0,23	0,35	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	4,16	1,52	28,59	21,99	21,99	36,85	23,33	13,53	4,55	0,6	0,98	0,27	0,41	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	4,91	1,32	30,46	18,01	18,01	38,59	30,23	8,36	4,34	0,58	0,93	0,25	0,4	0	0

ES 2 293 726 T3

65	(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,66	1,52	29,52	20,52	20,52	36,61	20,09	16,52	5,63	0,67	1,12	0,14	0,52	0	0
55	(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	5,09	1,81	25,81	21,54	21,54	38,2	22,52	15,68	4,92	0,75	0,96	0,12	0,57	0,02	0
60	(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,77	1,5	29,79	22,36	22,36	35,46	14,84	20,62	4,39	0,74	1,17	0,18	0,59	0,02	0
55	(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,71	1,45	32,18	23,86	23,86	32,32	17	15,32	3,92	0,63	1,12	0,15	0,5	0,02	0
60	(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,55	1,56	33,27	25,21	25,21	30,69	16,63	14,06	3,08	0,68	1,2	0,16	0,54	0,03	0
55	(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	4,04	1,52	33,63	24,47	24,47	30,72	18,19	12,53	3,07	0,63	1,17	0,14	0,46	0	0
60	(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,67	1,58	31,98	26,13	26,13	30,89	15,92	14,97	3,05	0,69	1,21	0,16	0,51	0	0

ES 2 293 726 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,58	1,8	30,2	27,22	27,22	31,42	15,48	15,94	2,85	0,79	1,21	0,17	0,61	0,02	0,01
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	4,68	1,41	28,32	28	28	32,22	14,92	17,3	2,74	0,65	1,1	0,18	0,53	0,01	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,5	1,46	34,13	25,92	25,92	29,7	16,77	12,93	2,65	0,67	1,26	0,15	0,51	0,01	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,9	1,68	33,44	26,18	26,18	29,43	16,11	13,31	2,6	0,72	1,23	0,18	0,5	0,02	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- 1-1)	3,82	1,71	31,84	27,78	27,78	29,49	15,28	14,2	2,59	0,73	1,19	0,16	0,55	0,02	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16- i-j)	3,6	1,78	29,45	28,14	28,14	31,64	12,83	18,81	2,57	0,76	1,21	0,17	0,58	0	0

ES 2 293 726 T3

Un procedimiento alternativo para combinar la $\Delta 15$ -desaturasa de *B. napus* con las $\Delta 6$ - y $\Delta 12$ -desaturasas de *M. alpina* es combinarlas en un ADN-T para transformación. El casete de transcripción constituido por la región reguladora 5' de la napina, la región codificadora de la $\Delta 15$ -desaturasa, y la región reguladora 3' de la napina se pueden recortar del pCGN5557 como un fragmento de SwaI e insertarse en el pCGN5544 digerido en SwaI. El plásmido resultante, pCGN5561, contiene tres unidades transcriptoras de la napina que contienen las $\Delta 6$ - y $\Delta 12$ -desaturasas de *M. alpina*, la $\Delta 15$ -desaturasa de *B. napus*, y las $\Delta 6$ - y $\Delta 12$ -desaturasas de *M. alpina*, todas orientadas en la misma dirección que la unidad transcritora 35S/nptII/tml usada para la selección del tejido transformado. Además, la secuencia codificadora de la ω -3-desaturasa de *C. elegans* también se clonó en el pCGN5544 para crear el constructo pCGN5565.

Semillas T2 agrupadas de plantas que contienen 5561 contienen cantidades significativas de SDA (18:4), como se muestra en la Tabla 2. En semillas que segregan 5561 se obtienen niveles mayores de aproximadamente el 7% de SDA. Además, se obtuvieron niveles significativos de SDA de semillas agrupadas de líneas 5565 de *Brassica*, como también se muestra en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, con los constructos 5561 y 5565, pueden obtenerse niveles de SDA que oscilan desde aproximadamente el 0,8% en peso hasta más del 7% en peso.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 2

ID CEPA	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:2	18:2	18:3	18:3	18:3	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	22:2
5561-6	4,46	0,21	3,5	22,85	0	18,33	18,71	21,61	7,79	1,04	0,76	0,19	0,47	0	0	0	0
5561-4	4,14	0,15	2,62	33,07	0	21,07	17,61	14,56	4,39	0,87	0,92	0,14	0,39	0	0,02	0	0,02
5561-2	4,26	0,15	2,21	30,42	0	22,02	21,06	12,88	4,25	0,89	0,98	0,2	0,51	0	0,02	0	0,02
5561-8	4,29	0,18	2	33,05	0	22,44	16,23	15,3	3,95	0,84	0,96	0,19	0,43	0	0,04	0	0,04
5561-3	3,95	0,12	2,04	32,93	0	24,48	17,42	13,33	3,27	0,79	0,94	0,21	0,4	0,03	0,03	0,03	0,03
5561-7	4,26	0,17	2,02	38,4	0	23,3	13,35	13,3	2,73	0,75	1,06	0,16	0,41	0	0	0	0
5561-13	4,38	0,18	1,86	58,94	0,65	13,98	7,1	8,26	1,88	0,77	1,27	0,29	0,35	0,03	0,03	0,03	0
5561-15	4,29	0,15	2,3	40,96	0	26,63	8,58	12,98	1,51	0,83	1,07	0,19	0,45	0	0,02	0	0,02
5561-1	4,25	0,15	1,91	47,41	0	24,46	5,56	12,81	1	0,72	1,14	0,15	0,39	0	0	0	0
5561-5	4,07	0,16	1,96	52,29	0	20,88	5,02	12,17	0,97	0,72	1,16	0,21	0,28	0	0,06	0	0,06
CONTROL	3,89	0,21	1,65	58,48	0	22,44	0	11,03	0	0,6	1,15	0,16	0,27	0,01	0,01	0,01	0

Tabla 2 Continuación

ID CEPA	16:0	18:0	18:1	18:2_C69	18:2-LA	18:3-GLA	18:3-ALA	18:4	20:0
5565-SP30021-7	4,03	1,93	41,24	0,43	14,46	21,39	6,62	7,38	0,68
5565-SP30021-12	3,95	2,46	40,19	0	30,35	7,3	10,92	2,57	0,7
5565-SP30021-9	4,03	1,82	35,76	0	33,49	8,63	11,58	2,54	0,51
5565-SP30021-3	3,86	1,8	32,3	0	35,57	11,3	10,05	2,37	0,61
5565-SP30021-1	3,98	1,92	59,99	1,84	11,24	8,07	7,46	2,32	0,76
5565-SP30021-8	4,67	1,72	38,95	0	30,38	8,99	10,83	2,25	0,52
5565-SP30021-10	4,03	1,43	47,04	0	26,96	5,97	11,1	1,35	0,52
5565-SP30021-6	3,87	1,77	46,73	0	28,79	5,31	10,4	0,79	0,56
CONTROL	3,89	1,65	58,48	0	22,44	0	11,03	0	0,6

Ejemplo 3

(Ejemplo de Referencia)

5 *Expresión de la $\Delta 15$ -desaturasa en la Expresión de Plantas en Hojas*

La Ma29 es una $\Delta 15$ -desaturasa putativa de *M. alpina* según se determinó mediante homología de secuencias. Este experimento se diseñó para determinar si las hojas que expresan la Ma29 (determinado mediante análisis Northern) podían transformar el DGLA (20:3) aplicado exógenamente en ARA (20:4).

10

Se modificó el ADNc de la Ma 29-desaturasa mediante PCR para introducir sitios de restricción convenientes para clonación. Se ha insertado la región codificadora de la desaturasa en un casete d35 bajo el control del promotor doble 35S para la expresión en hojas de *Brassica* (pCGN5525) siguiendo protocolos habituales (ver los documentos USPN 5.424.200 y USPN 5.106.739). Se generaron plantas transgénicas de *Brassica* que contenían el pCGN5525 siguiendo protocolos habituales (ver los documentos USPN 5.188.958 y USPN 5.463.174).

15

En el primer experimento, se usaron tres plantas: una control, LP004-1, y dos transgénicas, 5525-23 y 5525-29. LP004 es una variedad de *Brassica* baja en linolénico. Se seleccionaron hojas de cada una para uno de entre tres tratamientos: agua, GLA o DGLA. El GLA y DGLA se adquirieron como sales sódicas en NuChek Prep y se disolvieron en agua a razón de 1 mg/ml. Se taparon alícuotas bajo N_2 y se almacenaron a $-70^\circ C$. Se trataron las hojas aplicando una gota de $50\mu l$ a la superficie superior y extendiendo suavemente con un dedo enguantado para cubrir toda la superficie. Se hicieron aplicaciones aproximadamente 30 minutos antes del final del ciclo de luz para minimizar cualquier fotooxidación de los ácidos grasos aplicados. Después de 6 días de tratamiento se recogió una hoja de cada tratamiento y se cortó por la mitad por el nervio medio. Una mitad se lavó con agua para tratar de eliminar el ácido graso no incorporado. Las muestras foliares se liofilizaron durante toda la noche, y se determinó la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (CG). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 3
Análisis de Ácidos Grasos de Hojas de Plantas Transgénicas Ma29 de Brassica

Tratamiento	SPL #	16:00 %	16:01 %	18:00 %	18:01 %	18:02 %	18:3g %	18:03 %	18:04 %	20:00 %	20:01 %
Agua	33	12,95	0,08	2,63	2,51	16,76	0	45,52	0	0,09	0
	34	13,00	0,09	2,67	2,56	16,86	0	44,59	0	0,15	0
	35	14,13	0,09	2,37	2,15	16,71	0	49,91	0	0,05	0,01
	36	13,92	0,08	2,32	2,07	16,16	0	50,25	0	0,05	0
	37	13,79	0,11	2,10	2,12	15,90	0,08	46,29	0	0,54	0,01
	38	12,80	0,09	1,94	2,08	14,54	0,11	45,61	0	0,49	0,01
GLA	39	12,10	0,09	2,37	2,10	14,85	1,63	43,66	0	0,53	0
	40	12,78	0,10	2,34	2,22	15,29	1,72	47,22	0	0,50	0,02
	41	13,71	0,07	2,68	2,16	15,92	2,12	46,55	0	0,09	0
	42	14,10	0,07	2,75	2,35	16,66	1,56	46,41	0	0,09	0,01
	43	13,62	0,09	2,22	1,94	14,68	2,42	46,69	0	0,51	0,01
	44	13,92	0,09	2,20	2,17	15,22	2,30	46,05	0	0,53	0,02
DGLA	45	12,45	0,14	2,30	2,28	15,65	0,07	44,62	0	0,12	0,01
	46	12,67	0,15	2,69	2,50	15,96	0,09	42,77	0	0,56	0,01
	47	12,56	0,23	3,40	1,98	13,57	0,03	45,52	0	0,51	0,01
	48	13,07	0,24	3,60	2,51	13,54	0,04	45,13	0	0,50	0,01
	49	13,26	0,07	2,81	2,34	16,04	0,04	43,89	0	0,59	0
	50	13,53	0,07	2,84	2,41	16,07	0,02	44,90	0	0,60	0,01

ES 2 293 726 T3

Tratamiento	SPL	20:02	20:03	20:04	20:05	22:00	22:01	22:02	22:03	22:06	24:0	24:1
	#	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Agua	33	0	0	0,29	0	0,01	0,09	16,26	0	0	0,38	0,18
	34	0,01	0	0,26	0	0,14	0,10	16,82	0,02	0,05	0,36	0,27
	35	0,01	0	0,25	0	0,12	0,06	11,29	0,04	0,05	0,29	0,25
	36	0	0,01	0,26	0	0,07	0,04	11,82	0,03	0,36	0,28	0,21
	37	0,02	0	0,21	0	0,18	0,08	15,87	0,06	0,20	0,30	0,17
	38	0,01	0	0,24	0	0,15	0,07	13,64	0,09	0,08	5,89	0,23
GLA	39	0,02	0,01	0,27	0	0,10	0,08	16,25	3,42	0,19	0,37	0,17
	40	0,01	0	0,27	0	0,10	0,10	14,74	0,05	0,10	0,36	0,14
	41	0	0	0,27	0	0,20	0,10	13,15	0,13	0,29	0,33	0,20
	42	0	0	0,28	0	0,11	0,11	12,60	0,02	0,24	0,38	0,13
	43	0,01	0	0,28	0	0,10	0,03	14,73	0,01	0,24	0,34	0,14
	44	0,02	0	0,26	0	0,13	0,07	14,43	0,05	0,16	0,33	0,17
DGLA	45	0,06	1,21	0,26	0	0,07	0,07	18,67	0,02	0,21	0,36	0,13
	46	0	1,94	0,27	0	0,11	0,09	17,97	0,09	0,39	0,41	0,11
	47	0,01	0,69	0,96	0	0,11	0,07	17,96	0	0,22	0,49	0,20
	48	0,01	0,70	0,74	0	0,14	0,09	17,14	0,05	0,32	0,52	0,10
	49	0	0,35	1,11	0	0,10	0,07	17,26	0,07	0,23	0,39	0,18
	50	0	0,20	0,87	0	0,21	0,07	15,73	0,04	0,15	0,37	0,18

ES 2 293 726 T3

Las hojas tratadas con GLA contenían del 1,56 al 2,4% en peso total de GLA. El análisis de ácidos grasos mostró que la composición lipídica de las hojas control y transgénicas era esencialmente el mismo. Las hojas de las plantas control tratadas con DGLA contenían un 1,2-1,9% en peso de DGLA y cantidades traza de ARA (0,26-0,27% en peso total).

Las hojas transgénicas sólo contenían un 0,2-0,7% en peso total de DGLA, pero los niveles de ARA se vieron incrementados (0,74-1,1% en peso total) indicando que el DGLA se transformó en ARA en estas hojas.

Expresión en Semillas

El objeto de este experimento fue determinar si un constructo con el promotor de napina específico de semilla haría posible la expresión en la semilla.

Se modificó el ADNc de la Ma29 mediante PCR para introducir sitios de clonación XhoI hacia arriba y hacia debajo de los codones de iniciación y terminación, respectivamente, usando los siguientes cebadores:

Madxho-directo:

5'-CUACUACUACUACTCGAGCAAGATGGGAACGGACCAAGG (SEC ID NO:7)

Madxho-inverso:

5'-CAUCAUCAUCAUCTCGAGCTACTCTTCCTTGGGACGGAG (SEC ID NO:8)

Se subclonó el producto del PCR en pAMP1(GIBCOBRL) usando el sistema CloneAmp (GIBCOBRL) para crear el pCGN5522 y se comprobó la secuencia de la $\Delta 5$ -desaturasa secuenciando ambas cadenas.

Para la expresión específica de semillas, la región codificadora de la Ma29 se recortó del pCGN5522 como un fragmento *XhoI* y se insertó en el sitio *Sall* del casete de expresión de napina, pCGN3223, para crear el pCGN5528. Se insertó el fragmento *HindIII* de pCGN5528 que contiene la región reguladora 3' de la napina, la región codificadora de la Ma29, y la región reguladora 3' de la napina en el sitio *HindIII* del pCGN1557 para crear el pCGN5531. Se insertaron dos copias de la unidad de transcripción de la napina en tándem. Este constructo en tándem puede permitir una mayor expresión de las desaturasas por loci genéticos. Se introdujo el pCGN5531 en la variedad LP004 de *Brassica napus* por medio de transformación mediada por *Agrobacterium*.

Se analizó la composición de ácidos grasos de semillas maduras T2 en grupos de veinte mediante CG. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos con líneas independientes transformadas comparadas con semillas LP004 no transformadas. Las semillas transgénicas que contienen pCGN5531 contienen dos ácidos grasos que no aparecen en las semillas control, identificados como ácido taxoleico (5,9-18:2) y ácido pinolénico (5,9,12-18:3), en base a su elución relativa al ácido oleico y linoleico. Éstos serían los productos esperados de la desaturación $\Delta 5$ de los ácidos oleico y linoleico. No se observaron otras diferencias en la composición de ácidos grasos en las semillas transgénicas.

Ejemplo 4

(Ejemplo de Referencia)

Producción de Ácidos Grasos Desaturados con $\Delta 5$ en Plantas Transgénicas

En el Ejemplo 3 se describe la construcción del pCGN5531 ($\Delta 5$ -desaturasa) y la composición de ácidos grasos de grupos de semillas T2. Este ejemplo toma las semillas a través de una generación más y discute vías para maximizar los ácidos grasos desaturados en $\Delta 5$.

El ejemplo 3 describe la composición de ácidos grasos de grupos de semillas T2 de plantas de la variedad LP004 de *B. napus* con pCGN5531 transformadas. Se hizo un análisis de medias semillas para investigar la segregación de ácidos grasos desaturados en $\Delta 5$ en las semillas T2 e identificar plantas individuales para tomar en las generaciones siguientes. Se hicieron germinar las semillas durante la noche en oscuridad a 30 grados sobre papel de filtro remojado. Se hizo una incisión del cotiledón externo para hacer análisis CG y el resto de la plántula se plantó en el suelo. En la Tabla 4 adjunta se muestran los resultados de algunos de estos análisis. $\Delta 5,9-18:2$ acumuló hasta el 12% de los ácidos grasos totales y $\Delta 5,9,12-18:3$ acumuló hasta el 0,77% de los ácidos grasos. Éstas y otras plantas T2 seleccionadas individualmente se cultivaron en el invernadero para producir semillas T3.

Tabla 4
Composición de Grupos de Semillas T2

	16:0 %	16:1 %	18:0 %	18:1 %	$\Delta 5,9$ 18:2 %	18:2 %	$\Delta 5,9,12$ 18:3 %	18:3 %	20:0 %	20:1 %	20:2 %	22:0 %	22:1 %	24:2 %
LP004 control	3,86	0,15	3,05	69,1	0	18,51	0,01	1,65	1,09	1,40	0,03	0,63	0,05	0,42
5531-1	4,26	0,15	3,23	62,33	4,07	21,44	0,33	1,38	0,91	1,04	0,05	0,41	0,03	0,27
5531-2	3,78	0,14	3,37	66,18	4,57	17,31	0,27	1,30	1,03	1,18	0	0,47	0,01	0,30
5531-6	3,78	0,13	3,47	63,61	6,21	17,97	0,38	1,34	1,04	1,14	0,05	0,49	0,02	0,26
5531-10	3,96	0,17	3,28	63,82	5,41	18,58	0,32	1,43	0,98	1,11	0,02	0,50	0	0,31
5531-16	3,91	0,17	3,33	64,31	5,03	18,98	0,33	1,39	0,96	1,11	0	0,44	0	0
5531-28	3,81	0,13	2,58	62,64	5,36	20,95	0,45	1,39	0,83	1,15	0,01	0,36	0,05	0,21

Tabla 4
Análisis de Ácidos Grasos de medias semillas T2 seleccionadas de ejemplos de pCGN5531-LP004

ID CICLO	Nº SPL	ID CEPA	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 Δ5,9	18:2 Δ9,12	18:3 Δ5,9,12	18:3 Δ9,12,15
97XX1539	93	5531-LP004-6	0,03	0,07	3,92	0,17	3,5	61,32	12,22	15,36	0,77	1,36
97XX1539	29	5531-LP004-6	0,01	0,04	3,6	0,09	3,23	63,77	10,63	14,47	0	1,22
97XX1539	38	5531-LP004-6	0,01	0,05	3,71	0,09	3,02	65,13	10,57	13,98	0	1,06
97XX1539	41	5531-LP004-6	0,01	0,05	3,64	0,07	3,22	62,51	9,7	16,63	0	1,28
97XX1539	18	5531-LP004-6	0,02	0,05	3,69	0,09	3,36	63,79	9,63	15,29	0,63	1,15
97XX1539	85	5531-LP004-6	0,01	0,06	3,6	0,09	3,54	64,81	9,54	13,69	0,6	1,26
98GC0023	98	5531-LP004-23	0,01	0,05	3,5	0,09	3,12	64,97	9,92	13,62	0,55	1,25
98GC0023	32	5531-LP004-23	0,01	0,05	3,43	0,08	2,62	65,21	9,83	14,28	0,59	1,15
98GC0023	78	5531-LP004-23	0,01	0,05	3,45	0,07	2,78	64,97	9,34	14,69	0,58	1,17
98GC0023	86	5531-LP004-23	0,01	0,05	3,32	0,08	2,7	64,18	9,08	15,99	0,68	1,18
98GC0023	67	5531-LP004-23	0,01	0,04	3,49	0,08	3,03	64,14	8,78	15,95	0,62	1,08
98GC0023	52	5531-LP004-23	0,01	0,03	3,38	0,07	2,56	67,44	8,65	13,55	0,5	1,02

ES 2 293 726 T3

Para maximizar la acumulación de $\Delta 5,9$ 18:2 en aceite de semillas, se podría introducir el constructo pCGN5531 en una variedad de canola alta en ácido oleico. Se podría obtener una variedad alta en ácido oleico mediante mutación, bajo-supresión, o supresión antisentido de las $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasas u otros co-factores necesarios.

5 Para maximizar la acumulación de $\Delta 5,9,12$ 18:3 en la canola, se podría introducir el constructo pCGN5531 en una cepa de canola alta en ácido linoleico. Esto se podría lograr cruzando plantas de pCGN5531 transformado con plantas de pCGN5542 ($\Delta 12$ -desaturasa de *M. alpina*) transformado. De manera alternativa, se podrían combinar las $\Delta 5$ - y $\Delta 12$ -desaturasas en un ADN-T para transformación. La unidad transcritora constituida por la región reguladora 5' de la napina, la región codificadora de la $\Delta 12$ -desaturasa de *M. alpina*, y la región reguladora 3' de la napina se pueden recortar de pCGN5541 como un fragmento NotI. Podrían ligarse los ligadores NotI/XbaI e insertarse el fragmento
10 resultante en el sitio XbaI de pCGN5531. El plásmido resultante contendría tres unidades transcriptoras de napina que contendrían la $\Delta 12$ -desaturasa de *M. alpina*, y dos copias de la unidad napina/ $\Delta 5$ -desaturasa de *M. alpina*/napina, todas orientadas en la misma dirección que la unidad transcritora usada para la selección del tejido transformado.

15 Ejemplo 5

*Expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa de *M. alpina* en *Brassica napus**

Se obtuvo una secuencia de ácido nucleico a partir de un clon parcial de ADNc, Ma524, que codifica una $\Delta 6$ -
20 desaturasa de ácido graso de *Mortierella alpina* mediante secuenciación aleatoria de clones de la biblioteca de ADNc de *M. alpina*. Se modificó el ADNc del Ma524 mediante PCR para introducir sitios de clonación usando los siguientes parámetros:

25 **Ma524PCR-1**

5'-CUACUACUACUATCTAGACTCGAGACCATGGCTGCTGCTCCAGTGTG
30 (SEC ID NO:9)

35 **Ma524PCR-2**

5'-CAUCAUCAUCAUAGGCCTCGAGTTACTGCGCCTTACCCAAT
40 (SEC ID NO:10)

Estos cebadores permitieron la amplificación de toda la región codificadora y añadieron los sitios *XbaI* y *XhoI*
45 al extremo 5' y los sitios *XhoI* y *StuI* al extremo 3'. Se subclonó el producto del PCR en pAMP1 (GIBCOBRL) usando el sistema CloneAmp (GIBCOBRL) para crear el pCGN5535 y se comprobó la secuencia de la $\Delta 6$ -desaturasa secuenciando ambas cadenas.

Construcción del pCGN5544

50 Se prepararon constructos de expresión en plantas para expresar la $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina* y la $\Delta 12$ -desaturasa de *Mortierella alpina* en una célula vegetal huésped. Los constructos preparados utilizaban regiones de iniciación de la transcripción derivadas de genes expresados con preferencia en una semilla vegetal. En los documentos WO 98/46763 y WO 98/46764 se describe el aislamiento de las secuencias de ADNc que codifican para la $\Delta 6$ -desaturasa de *M. alpina* y la $\Delta 12$ -desaturasa de *M. alpina*.

55 Para la expresión específica de semillas, se recortó la región codificadora Ma524 del pCGN5535 como un fragmento *XhoI* y se insertó en el sitio *SalI* del casete de expresión de napina, pCGN3223, para crear el pCGN5536. El fragmento *NotI* del pCHN5536 que contiene la región reguladora 5' de la napina, la región codificadora Ma524, y la región reguladora 3' de la napina se insertó en el sitio *NotI* del pCGN1557 para crear el pCGN5538.

60 El ADNc 5542, que codifica la $\Delta 12$ -desaturasa de *M. alpina*, se modificó mediante PCR para introducir sitios de clonación usando los siguientes cebadores:

65

Ma648PCR-para

5 5'-CUACUACUACUAGGATCCATGGCACCTCCCAACACT
(SEC ID NO:11)

Ma524PCR-para

15 5'-CAUCAUCAUCAUGGTACCTCGAGTTACTTCTTGAAAAAGAC
(SEC ID NO:12)

20 Estos cebadores permitieron la amplificación de toda la región codificadora y añadieron un sitio BamHI al extremo 5' y los sitios KpnI y XhoI al extremo 3'. Se subclonó el producto del PCR en pAMP1 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) usando el sistema CloneAmp (Gibco-BRL) para crear el pCGN5540 y se comprobó la secuencia de la Δ 12-desaturasa secuenciando ambas cadenas.

25 Se preparó un constructo de expresión preferencial para la secuencia de ADNc de la Δ 12-desaturasa. Se recortó la región codificadora Ma648 del pCGN5540 como un fragmento BamHI/XhoI y se insertó entre los sitios BgIII y XhoI del casete de expresión de napina, pCGN3223 (descrito en el documento USPN 5.639.790), para crear el pCGN5542.

30 Para expresar las secuencias de las Δ 6- y Δ 12-desaturasas de *M. alpina* a partir del mismo ADN-T, se preparó el siguiente constructo para la expresión preferencial de semillas.

35 El fragmento NotI del pCGN5536 que contiene la región de iniciación transcritora 5' de la napina, la región codificadora Ma524, y la región de terminación transcritora 3' de la napina se insertó en el sitio NotI del pCGN5542 para crear el pCGN5544. Los casetes de expresión se orientaban de tal modo que la dirección de transcripción de Ma524 y Ma648 y el marcador nptII es la misma.

40 Para la expresión específica de semillas, se recortó la región codificadora Ma524 del pCGN5535 como un fragmento XhoI y se insertó en el sitio SalI del casete de expresión de napina, pCGN3223, para crear el pCGN5536. El fragmento NotI del pCHN5536 que contiene la región reguladora 5' de la napina, la región codificadora Ma524, y la región reguladora 3' de la napina se insertó en el sitio NotI del pCGN1557 para crear el pCGN5538. Se introdujo el pCGN5538 en la variedad LP004 de *Brassica napus* por medio de transformación mediada por *Agrobacterium*.

45 Se recogieron semillas T2 en maduración de 6 casos de transformación independientes en el invernadero. Se analizó la composición de ácidos grasos de semillas individuales mediante CG. La Tabla 5 muestra los resultados de las semillas LP004 control y seis líneas 5538. Todas las líneas 5538 excepto la #8 produjeron semillas que contenían GLA. La presencia de GLA se mantuvo en estas semillas como se espera para la población de semillas autógamas T2. Además del GLA, la Δ 6-desaturasa de *M. alpina* es capaz de producir 18:4 (estearidónico) y otro ácido graso: Δ 6,9-18:2.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 5

Análisis de Ácidos Grasos de Semillas de Plantas Transgénicas Ma524 de Brassica

SPL	#	16:0	16:1	18:0	18:1	6,9 18:2	18:2	18:3g a	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	LP004-1	4,33	0,21	3,78	72,49	0	13,97	0	1,7	0	1,34	0,71	0,02	0,58	0,27
	-2	4,01	0,16	3,09	73,59	0	14,36	0,01	1,4	0	1,43	0,66	0,02	0,5	0,2
	-3	4,12	0,19	3,56	70,25	0	17,28	0	1,57	0	1,28	0,5	0,02	0,39	0,2
	-4	4,22	0,2	2,7	70,25	0	17,86	0	1,61	0	1,31	0,53	0,02	0,4	0,24
	-5	4,02	0,16	3,41	72,91	0	14,45	0,01	1,45	0	1,37	0,7	0,02	0,51	0,26
	-6	4,22	0,18	3,23	71,47	0	15,92	0,01	1,52	0	1,32	0,69	0,02	0,51	0,27
	-7	4,1	0,16	3,47	72,06	0	15,23	0	1,52	0	1,32	0,63	0,03	0,49	0,23
	-9	4,01	0,17	3,71	72,98	0	13,97	0,01	1,41	0	1,45	0,74	0,03	0,58	0,23
	-10	4,04	0,16	3,57	70,03	0	17,46	0	1,5	0	1,33	0,61	0,03	0,36	0,24
	5538-1-1	4,61	0,2	3,48	68,12	1,37	10,68	7,48	1,04	0,33	1,19	0,49	0,02	0,33	0,13
	-2	4,61	0,22	3,46	68,84	1,36	10,28	7,04	1,01	0,31	1,15	0,48	0,02	0,39	0
	-3	4,78	0,24	3,24	65,86	0	21,36	0	1,49	0	1,08	0,46	0,02	0,38	0,22
	-4	4,84	0,3	3,89	67,64	1,67	9,9	6,97	1,02	0,36	1,14	0,53	0,02	0,5	0,18
	-5	4,64	0,2	3,58	64,5	3,61	8,85	10,14	0,95	0,48	1,19	0,47	0,01	0,33	0,12
	-6	4,91	0,27	3,44	66,51	1,48	11,14	7,74	1,15	0,33	1,08	0,49	0,02	0,34	0,13
	-7	4,87	0,22	3,24	65,78	1,27	11,92	8,38	1,2	0	1,12	0,47	0,02	0,37	0,16

ES 2 293 726 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

	-8	4,59	0,22	3,4	70,77	0	16,71	0	1,35	0	1,14	0,48	0,02	0,39	0,15
	-9	4,63	0,23	3,51	69,66	2,01	8,77	7,24	0,97	0	1,18	0,52	0,02	0,3	0,11
	-10	4,56	0,19	3,55	70,68	0	16,89	0	1,37	0	1,22	0,54	0,02	0,22	0,03
	5538-3-1	4,74	0,19	3,43	67,52	1,29	10,91	7,77	1,03	0,28	1,11	0,5	0,02	0,35	0,14
	-2	4,72	0,21	3,24	67,42	1,63	10,37	8,4	0,99	0	1,12	0,49	0,02	0,36	0,15
	-3	4,24	0,21	3,52	71,31	0	16,53	0	1,33	0	1,12	0,45	0,02	0,4	0,14
	-4	4,64	0,21	3,45	67,92	1,65	9,91	7,97	0,91	0,33	1,14	0,47	0,02	0,37	0,14
	-5	4,91	0,25	3,31	67,19	0	19,92	0,01	1,39	0	1,05	0,48	0,02	0,37	0,14
	-6	4,67	0,21	3,25	67,07	1,23	11,32	8,35	0,99	0	1,16	0,47	0,02	0,33	0,16
	-7	4,53	0,19	2,94	64,8	4,94	8,45	9,95	0,93	0,44	1,13	0,37	0,01	0,27	0,12
	-8	4,66	0,22	3,68	67,33	0,71	12	6,99	1,1	0,24	1,18	0,48	0,03	0,36	0,17
	-9	4,65	0,24	3,11	67,42	0,64	12,71	6,93	1,16	0,25	1,08	0,45	0,02	0,32	0,17
	-10	4,88	0,27	3,33	65,75	0,86	12,89	7,7	1,1	0,24	1,08	0,46	0,01	0,34	0,16
	5538-4-1	4,65	0,24	3,8	62,41	0	24,68	0	1,6	0,01	0,99	0,45	0,02	0,33	0,13
	-2	5,37	0,31	3	57,98	0,38	18,04	10,5	1,41	0	0,99	0,48	0,02	0,3	0,19
	-3	4,61	0,22	3,07	63,62	0,3	16,46	7,67	1,2	0	1,18	0,45	0,02	0,29	0,14
	-4	4,39	0,19	2,93	65,97	0	22,36	0	1,45	0	1,17	0,41	0,03	0,32	0,15
	-5	5,22	0,29	3,85	62,1	2,35	10,25	11,39	0,93	0,41	1,04	0,6	0,02	0,47	0,17
	-6	4,66	0,18	2,85	66,79	0,5	13,03	7,66	0,97	0,22	1,28	0,42	0,02	0,31	0,14
	-7	4,85	0,26	3,03	57,43	0,26	28,04	0,01	2,59	0,01	1,13	0,56	0,02	0,4	0,23
	-8	5,43	0,28	2,94	54,8	1,84	13,79	15,67	1,36	0,53	1,1	0,55	0,02	0,35	0,19
	-9	4,88	0,24	3,32	62,3	0,58	14,86	9,04	1,34	0,29	1,13	0,52	0,02	0,37	0,19
	-10	4,53	0,2	2,73	64,2	0,07	24,15	0	1,52	0	1,09	0,39	0,02	0,27	0,17

ES 2 293 726 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

5538-5-1	4,5	0,15	3,35	66,71	0,88	11,7	8,38	1,04	0,3	1,24	0,49	0,02	0,29	0,17
-2	4,77	0,23	3,06	62,67	0,68	15,2	8,8	1,31	0,28	1,15	0,46	0,02	0,3	0,19
-3	4,59	0,22	3,61	64,35	2,29	9,95	10,57	1,01	0,45	1,21	0,48	0,02	0,26	0,16
-4	4,86	0,26	3,4	67,69	0,65	12,24	6,61	1,09	0,23	1,07	0,45	0,02	0,32	0,14
-5	4,49	0,21	3,3	69,25	0,04	16,51	2,18	1,2	0	1,11	0,44	0,02	0,33	0,16
-6	4,5	0,21	3,47	70,48	0,08	14,9	2,19	1,22	0	1,13	0,49	0,02	0,33	0,16
-7	4,39	0,21	3,44	67,59	2,38	9,24	8,98	0,89	0	1,18	0,44	0,02	0,28	0,14
-8	4,52	0,22	3,17	68,33	0,01	18,91	0,73	1,32	0,01	1,08	0,45	0,02	0,29	0,17
-9	4,68	0,2	3,05	64,03	1,93	11,03	11,41	1,02	0,01	1,15	0,39	0,02	0,21	0,15
-10	4,57	0,2	3,1	67,21	0,61	12,62	7,68	1,07	0,25	1,14	0,43	0,02	0,25	0,15
5538-8-1	4,95	0,26	3,14	64,04	0	23,38	0	1,54	0	0,99	0,42	0,02	0,38	0,17
-2	4,91	0,26	3,71	62,33	0	23,97	0	1,77	0	0,95	0,53	0,02	0,42	0,19
-3	4,73	0,25	4,04	63,83	0	22,36	0,01	1,73	0	1,05	0,55	0,02	0,45	0,16
-4	5,1	0,35	3,8	60,45	0	24,45	0,01	2,13	0	1,07	0,65	0,03	0,53	0,24
-5	4,98	0,3	3,91	62,48	0	23,44	0	1,77	0	1,01	0,51	0,01	0,43	0,21
-6	4,62	0,21	3,99	66,14	0	20,38	0	1,48	0	1,15	0,53	0,02	0,48	0,19
-7	4,64	0,22	3,55	64,6	0	22,65	0	1,38	0	1,09	0,45	0,02	0,41	0,19
-8	5,65	0,38	3,18	56,6	0	30,83	0,02	0,02	0	0,98	0,55	0,03	0,39	0,26
-9	8,51	0,61	6,9	51,76	0	26,01	0	0,01	0	1,41	1,21	0,07	0,96	0,33
-10	5,52	0,4	3,97	57,92	0	28,95	0	0,02	0	0,95	0,52	0,02	0,41	0,16
5538-10-1	4,44	0,19	3,5	68,42	0	19,51	0	1,32	0	1,14	0,45	0,02	0,31	0,16
-2	4,57	0,21	3,07	66,08	0	21,99	0,01	1,36	0	1,12	0,41	0,02	0,31	0,16

ES 2 293 726 T3

Se realizaron cruces entre líneas 5544 de *Brassica* productoras de GLA y variedades de canola normales no transformadas. Se realizaron cruces entre líneas 5544 con Quantum, Eagle, y Ebony.

Se analizó el contenido de SDA de medias semillas F1 y se cultivaron y dejaron autopolinizarse las plantas seleccionadas para producir semillas F2. El análisis CG-FAME de las semillas individuales y las muestras de medias semillas de tales cruces reveló acumulación de niveles significativos de SDA (Tabla 6). El análisis de medias semillas de 5544-LP108-6-16 con la variedad Eagle de canola produjo un nivel de aproximadamente el 6,3% de SDA. El análisis de semillas F2 de un cruce de 5544-LP108-12-1 con la variedad Ebony de canola produjo niveles de SDA tan altos como aproximadamente un 7,4% de SDA.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 6

ID Cepa	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 C69	18:2 C912	18:3 C6912	18:3 C91215	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	6,34	0,84	1,9	4,7	0	14,81	56,73	3,78	6,29	2,12	0,66	0,59	1,04
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	10,18	1,43	4,23	4,34	0	15,96	48,78	3,79	5,51	2,65	0,72	0,77	1,32
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	4,81	0,45	2,53	12,2	0	21,61	46,74	4,83	4,11	0,98	0,79	0,4	0,43
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	4,74	0,48	3,33	16,06	0	20,68	43,02	4,82	3,73	1,25	0,7	0,33	0,75
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	6,02	0,53	1,25	17,29	0	27,34	33,97	7,52	3,41	0,85	0,77	0,27	0,59
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	3,68	0,13	1,99	19,75	0,09	22,75	39,98	5,76	3,41	0,8	0,87	0,27	0,44
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	8,92	0,96	1,64	14,61	0	18,69	36,98	7,44	7,43	1,01	0,49	0,49	0,95
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	9,02	0,89	1,88	10,69	0	16,73	43,39	6,8	6,76	1,05	0,57	0,75	1,07
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	7,76	0,59	1,86	8,15	0	16,04	52,24	4,65	5,3	1,04	0,59	0,69	0,83
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	9,21	0,87	2,23	17,44	0	18,77	36,87	6,79	5,05	0,84	0,64	0,31	0,71
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	5,76	0,31	1,6	20,38	0	24,36	29,94	10,9	4,41	0,69	0,78	0,23	0,48
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	4,03	0,22	1,3	16,87	0	19,3	46,67	5,33	4,17	0,53	0,75	0,35	0,37
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	4,66	0,29	4,47	18,09	0,05	19,07	41,92	5,06	3,47	1,13	0,73	0,35	0,57
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	4,91	0,26	3,13	18,16	0	18,53	43,99	4,64	3,43	1,01	0,79	0,37	0,66

ES 2 293 726 T3

Ejemplo 6

(Ejemplo de Referencia)

5 *Producción de $\Delta 6,9-18:2$ en Aceite de Canola*

10 El ejemplo 5 describía la construcción del pCGN5538 diseñado para expresar la $\Delta 6$ -desaturasa de *M. alpina* en semillas de canola transgénica. La Tabla 4 de ese ejemplo mostraba ejemplos de análisis de semillas individuales a partir de 6 casos transgénicos independientes. Se produjeron cantidades significativas de GLA, además del ácido graso $\Delta 6,9-18:2$.

15 Un total de 29 plantas transgénicas transformadas independientes con pCGN5538 del cultivar LP004 bajo en linolénico se regeneraron y cultivaron en el invernadero. La Tabla 7 muestra la composición de ácidos grasos de grupos de 20 semillas de semillas T2 de cada caso. Siete de las líneas contenían más del 2% del $\Delta 6,9-18:2$ en los grupos de semillas. Para identificar y seleccionar plantas con elevadas cantidades del $\Delta 6,9-18:2$ que va a tomarse para generaciones siguientes, se hizo un análisis de media semillas. Se hicieron germinar las semillas durante la noche en oscuridad a 30 grados sobre papel de filtro remojado. Se hizo una incisión del cotiledón externo para hacer análisis CG y el resto de la plántula se plantó en el suelo. En base a los resultados del análisis de ácidos grasos, se cultivaron plantas T2 seleccionadas en el invernadero para producir semillas T3. Se repitió el ciclo de selección; se analizó el $\Delta 6,9-18:2$ de grupos de semillas T3. Se diseccionaron y analizaron medias semillas T3, y se cultivaron plantas T3 seleccionadas en el invernadero para producir semillas T4. Se analizó la composición de ácidos grasos de grupos de semillas T4. La Tabla 6 resume los resultados de este proceso para líneas derivadas de uno de los casos transgénicos originales, 5538-LP004-25. Por tanto se han mantenido los niveles de $\Delta 6,9-18:2$ a través de 3 generaciones.

25 Para maximizar la cantidad de $\Delta 6,9-18:2$ que se podría producir, se podría introducir el constructo pCGN5538 en una variedad de canola alta en ácido oleico mediante transformación o cruzamiento. Podría obtenerse una variedad alta en oleico mediante mutación, co-supresión, o supresión antisentido de las $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasas u otros co-factores necesarios.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 7

Composición de Ácidos Grasos de Grupos de 20 semillas de Semillas T2 pCGN5538

SPL	5538- LP004	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	$\Delta 6$, 9	18:2	$\Delta 6,9$, 12	$\Delta 9,12$, 15	18:3	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:2
#	caso	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	31	0,02	0,06	4,07	0,07	0	59,4	5,4	10,07	15,93	1,2	0,6	0,98	1,16	0,0	0,44	0,03	
	29	0,01	0,05	3,81	0,14	0	60,7	4,53	10,9	14,77	1,03	0,55	1,09	1,26	0,0	0,46	0,02	
	19	0,02	0,07	4,27	0,13	0	62,9	4,17	10,03	13,14	1,02	0,59	1,18	1,25	0,0	0,53	0,02	
	14	0	0	5,29	0,24	3,8	49,1	1,02	23,44	11,21	2,26	0,34	1,45	0,93	0,0	0,76	0	
	22	0,02	0,05	3,87	0,09	0	64,1	2,59	12,57	11,18	1,27	0,6	1,18	1,08	0,1	0,56	0	
	9	0,01	0,06	4,57	0,16	0	62,9	3,4	12,05	11,15	1,27	0,6	1,28	1,18	0,0	0,56	0,01	
	25	0,01	0,06	4,17	0,14	0	62,4	2,49	14,42	11,03	1,2	0,46	1,18	1,15	0,0	0,53	0,01	
	15	0,01	0,05	3,94	0,11	0	65,2	2,08	12,77	10,9	1,04	0,43	1,1	1,24	0,0	0,48	0,01	
	18	0	0,06	5,34	0,29	0	58,4	1,42	18,19	10,53	1,8	0,49	1,2	1	0,0	0,58	0,02	
	20	0,01	0,04	3,95	0,1	0	65,6	1,31	13,83	10,22	1,09	0,39	1,06	1,3	0,0	0,46	0,01	
	7	0,02	0,07	4,04	0,11	0	62,1	0,92	18,12	8,72	1,77	0,35	1,26	1,19	0,0	0,58	0	
	11	0,01	0,06	4,23	0,17	0	62,9	1,6	17,19	8,58	1,48	0,38	1,16	1,03	0,0	0,49	0,01	
	27	0,02	0	3,99	0,14	0	65,3	0,64	17,85	7,89	1,36	0,31	1,08	1,21	0,0	0	0	

ES 2 293 726 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

2	0,01	0,05	4,02	0,14	0	66,4	1,2	15,74	7,58	1,22	0,32	1,06	1,19	0,0	0,45	0
28	0,01	0,04	1,77	0,11	0	67,5	0,79	15,56	7,58	1,12	0,28	0,97	1,23	0,0	0,44	0
3	0,01	0,05	3,96	0,12	0	68,5	1,81	13,23	7,44	1,1	0,35	1,12	1,21	0,0	0,46	0,01
21	0,01	0,05	3,74	0,1	0	66,9	1,16	15,9	6,97	1,35	0,28	1,15	1,27	0,0	0,52	0
5	0,01	0,04	3,81	0,12	0	69,1	0,74	14,58	6,95	1,14	0,28	1,06	1,18	0,0	0,45	0
6	0	0	2,84	0	3,06	62,5	1,55	18,44	6,94	1,21	0,39	1,04	1,33	0,1	0	0
4	0,01	0,05	3,88	0,11	0	66,9	0,64	16,21	6,89	1,52	0,31	1,09	1,21	0,0	0,5	0
30	0,01	0,04	3,89	0,12	0	68,6	0,72	15,58	6,47	1,17	0,23	1,03	1,07	0,0	0,46	0
16	0,02	0,05	3,75	0,13	0	70,4	0,91	13,56	6,39	1,13	0,28	1,04	1,2	0,0	0,44	0,01
26	0,01	0	3,77	0,12	0	67,6	0	21,18	3,61	1,37	0,13	0,96	1,16	0,0	0	0
23	0	0	4,92	0,22	0	65,2	0	22,21	3	1,79	0,11	1,28	1,11	0,0	0	0
24	0,01	0	3,84	0,13	0	68,4	0,36	21	2,09	1,53	0,08	1,06	1,27	0,0	0	0
10	0,01	0	3,74	0,11	0	70,4	0	20,82	0,65	1,3	0,03	1,05	1,18	0,0	0,46	0
12	0,01	0	3,83	0,12	0	69,9	0	21,61	0,34	1,34	0	1,06	1,12	0,0	0,47	0
17	0,01	0	0	0,13	0	72,6	0	23,03	0,24	1,51	0	1,18	1,21	0,0	0	0
8	0,01	0	4,54	0,2	0	64,9	0	25,65	0,22	1,94	0	1,38	1,01	0,0	0	0
13	0,01	0	3,99	0,16	0	65,8	0	25,9	0	1,58	0	1,17	1,16	0,0	0	0
LP004 control	0,01	0,04	3,46	0,09	0	69,9	0	21,95	0	1,37	0,01	0,9	1,25	0,0	0,42	0

Tabla 7

ID Cepa	Grupo T2	GLA	Grupo T3	GLA	Selección T3	GLA	Grupo T4	Δ6,9,12 18:3
5538-LP004-25	Δ6,9 18:2 2,49	11,03						
5538-LP004-25-3			9,1	11,92				
5538-LP004-25-3-31					13,61	7,82	11,02	9,41
5538-LP004-25-3-30					6,51	7,93	10,27	8,7
5538-LP004-25-3-29					13,35	11,23	9,42	10,5
5538-LP004-25-3-28					9,92	24,1	9,37	10,19
5538-LP004-25-3-25					5,3	30,34	7,95	11,34
5538-LP004-25-2			3,87	11,08				
5538-LP004-25-2-29					13,63	7,41	9,6	11,07
5538-LP004-25-2-27					5,02	22,04	6,95	9,61
5538-LP004-25-2-26					1,21	26,84	4,31	7,45
5538-LP004-25-2-25					5,83	34,16	8,77	11,58

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para producir ácido estearidónico en una semilla vegetal, comprendiendo dicho procedimiento
cultivar una planta que tiene integrado en su genoma un primer constructo de ADN que comprende, en la dirección
de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla vegetal, una secuencia de ADN que codi-
fica una delta-seis desaturasa, y una región de terminación de la transcripción funcional en una célula vegetal, y un
10 segundo constructo que comprende en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de
semilla vegetal, y una secuencia de ADN que codifica una delta-15 desaturasa y cultivar dicha planta bajo condiciones
mediante las cuales se expresan dicha delta-seis desaturasa y dicha delta-15 desaturasa.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha planta tiene un tercer constructo integrado en su genoma,
en el que dicho constructo tiene en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla
vegetal, y una secuencia de ADN que codifica una delta-12 desaturasa.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia que codifica la delta-seis desaturasa es del
género *Mortierella*.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el promotor del primer constructo de ADN es un promotor de
napina.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el promotor del primer constructo de ADN es de la región de
iniciación de la transcripción de la subunidad 7S de la β -conglicina de soja.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento también extraer aceite de dicha
semilla vegetal.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho aceite comprende aproximadamente un 5 por ciento en
30 peso o más de ácido estearidónico.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho aceite comprende aproximadamente un 10 por ciento
en peso o más de ácido estearidónico.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho aceite comprende aproximadamente un 15 por ciento
en peso o más de ácido estearidónico.
10. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho aceite comprende aproximadamente un 20 por ciento
en peso o más de ácido estearidónico.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho aceite comprende aproximadamente un 25 por ciento
en peso o más de ácido estearidónico.
12. Una planta transgénica o una semilla de la misma que tiene integrado en su genoma un primer constructo
45 de ADN que comprende, en la dirección de transcripción 5' a 3', un promotor funcional en una célula de semilla
vegetal, una secuencia de ADN que codifica una delta-seis desaturasa, y una región de terminación de la transcripción
funcional en una célula vegetal, y un segundo constructo que comprende, en la dirección de transcripción 5' a 3', un
promotor funcional en una célula de semilla vegetal, y una secuencia de ADN que codifica una delta-15 desaturasa,
que es capaz de expresar la delta-seis desaturasa y la delta 15-desaturasa y de producir aceite de semilla que contenga
50 ácido estearidónico.
13. La semilla de la planta de la reivindicación 12 que comprende aproximadamente un 5 por ciento en peso o más
de ácido estearidónico como componente de los ácidos grasos totales encontrados en el aceite de semilla.
- 55 14. La semilla de la reivindicación 13 que comprende aproximadamente un 10 por ciento en peso o más de ácido
estearidónico como componente de dicho aceite de semilla.
15. La semilla de la reivindicación 13 que comprende aproximadamente un 15 por ciento en peso o más de ácido
estearidónico como componente de dicho aceite de semilla.
- 60 16. La semilla de la reivindicación 13 que comprende aproximadamente un 20 por ciento en peso o más de ácido
estearidónico como componente de dicho aceite de semilla.
17. La semilla de la reivindicación 13 que comprende aproximadamente un 25 por ciento en peso o más de ácido
65 estearidónico como componente de dicho aceite de semilla.
18. Aceite de semilla obtenido de semilla de las reivindicaciones 13 a 17.

ES 2 293 726 T3

19. Un tejido de semilla vegetal de una planta transgénica de la reivindicación 12 que comprende un aceite de semilla como se define en las reivindicaciones 13 a 17.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Rutas del Metabolismo de los PUFA

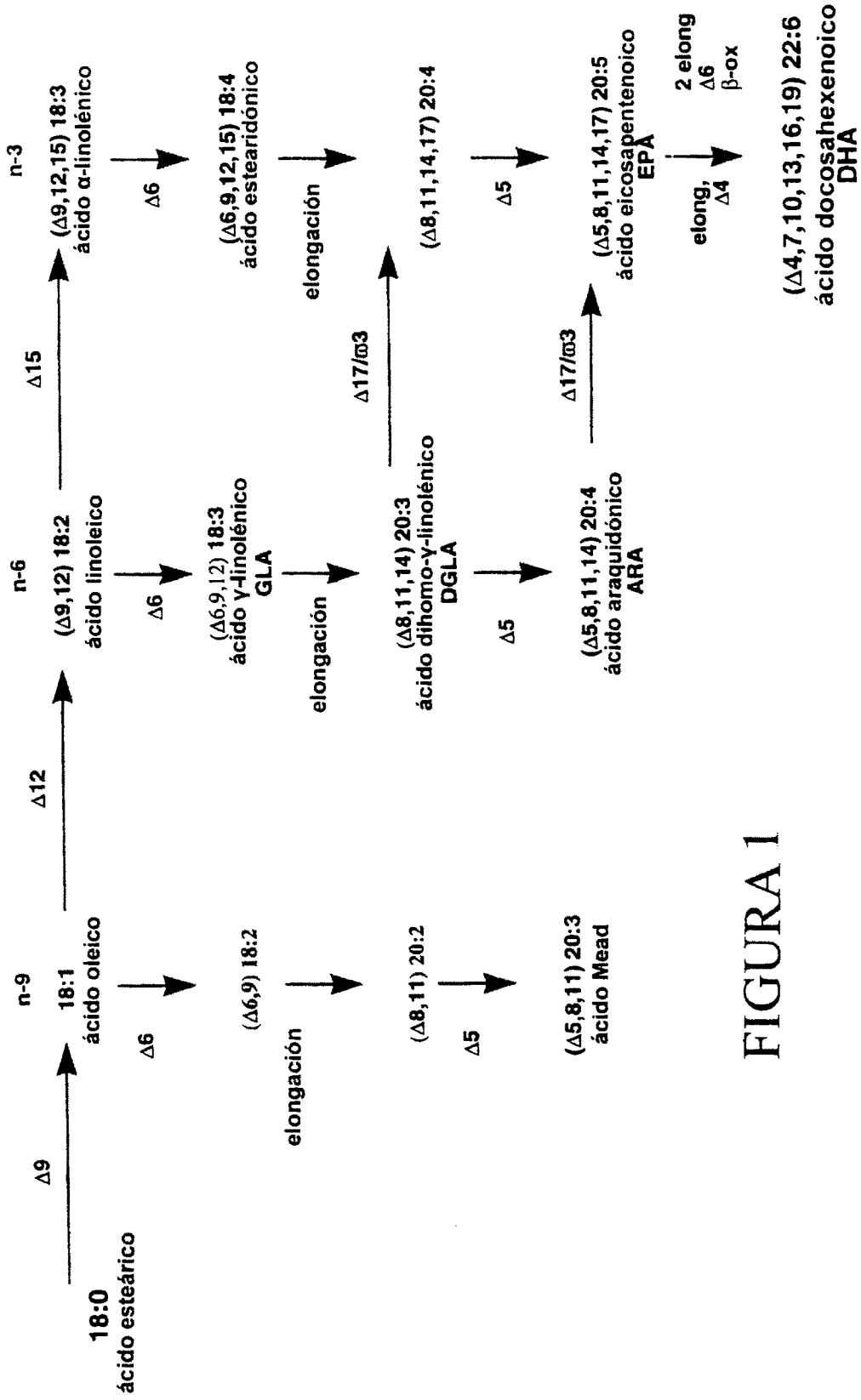


FIGURA 1

Rutas del Metabolismo de los PUFA

Desaturación $\Delta 5$

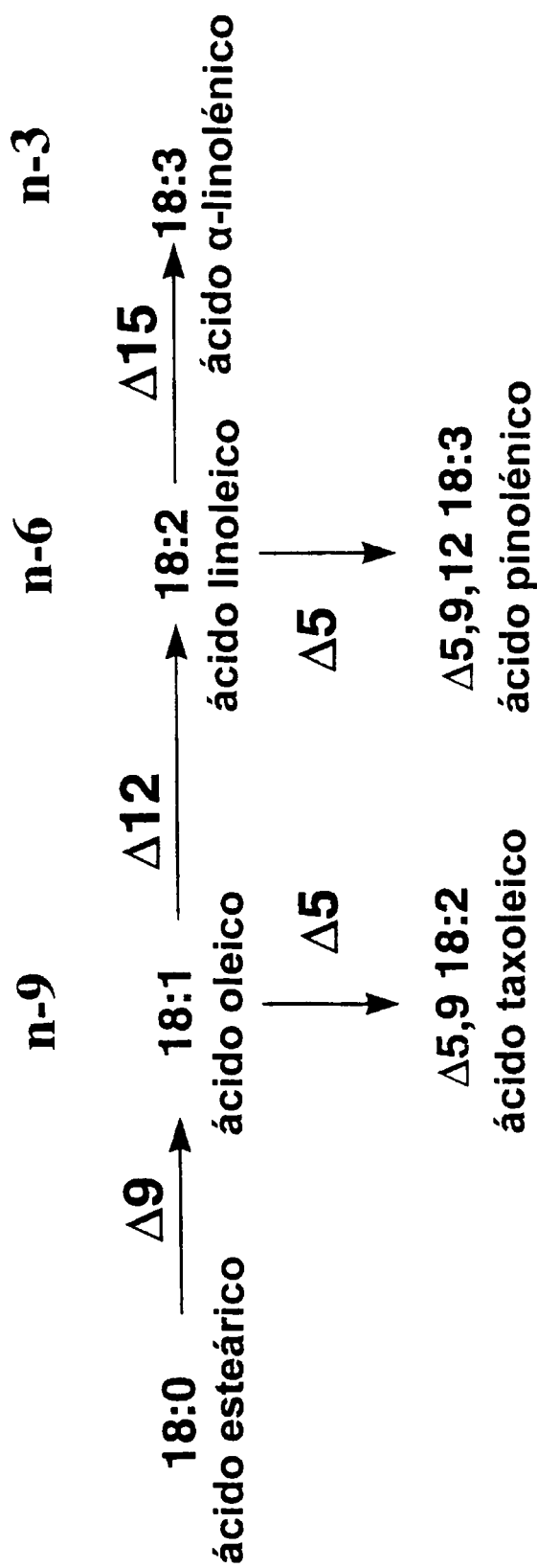


FIGURA 2

ES 2 293 726 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Calgene LLC	
5	<120> Ácidos Grasos Poliinsaturados en Plantas	
	<130> 17256/00/WO	
10	<140> PCT/US 99/13559	
	<141> 1999-06-10	
	<150> 60/089, 043	
15	<151> 1998-06-12	
	<160> 12	
20	<170> FastSEQ para la Versión 4.0 de Windows	
	<210> 1	
	<211> 41	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido Sintético	
	<400> 1	
35	cuacuacuac uactgcagac aatggtcgtc cattcctcag a	41
	<210> 2	
	<211> 38	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<400> 2	
45	caucaucauc augcggccgc ttacttgcc tttgcctt	38
	<210> 3	
50	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
55	<400> 3	
	tcgacctgca ggaagcttgc ggccgcggat cc	32
60	<210> 4	
	<211> 32	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	

ES 2 293 726 T3

	<400> 4	
	tcgaggatcc gcggccgcaa gcttctgca gg	32
5	<210> 5	
	<211> 40	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<400> 5	
15	cuacuacuac uagagctcag cgatggtgt tgctatggac	40
	<210> 6	
	<211> 37	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<400> 6	
25	caucaucauc augaattctt aattgatttt agatttg	37
	<210> 7	
30	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
35	<400> 7	
	cuacuacuac uactcgagca agatgggaac ggaccaagg	39
40	<210> 8	
	<211> 39	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<400> 8	
50	caucaucauc auctcgagct actcttctt gggacggag	39
	<210> 9	
	<211> 47	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<400> 9	
60	cuacuacuac uatctagact cgagaccatg getgetgctc cagtgtg	47
	<210> 10	
65	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	

ES 2 293 726 T3

	<400> 10	
	caucaucau auaggcctcg agttactgcg ccttaccat	40
5	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<400> 11	
15	cuacuacuac uaggatccat ggcacctccc aacct	36
	<210> 12	
	<211> 41	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Oligoartificial Sintética	
	<400> 12	
25	caucaucau auggtacctc gaggctctc ttgaaaaaga c	41
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		