



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 945**

51 Int. Cl.:  
**A01H 5/10** (2006.01)  
**A23D 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00936860 .6**  
86 Fecha de presentación : **05.06.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1185160**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

54 Título: **Plantas, semillas y aceites de girasol con un contenido alto de oleico y alto de esteárico.**

30 Prioridad: **04.06.1999 US 326501**  
**17.12.1999 EP 99204384**  
**04.02.2000 US 180455 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

73 Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
**Instituto de la Grasa 6**  
**Avda. Padre García Tejero, 4**  
**41012 Sevilla, ES**

72 Inventor/es: **Martínez-Force, Enrique;**  
**Muñoz-Ruz, Juan;**  
**Fernández-Martínez, José María y**  
**Garcés, Rafael**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 265 945 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).

# ES 2 265 945 T3

## DESCRIPCIÓN

Plantas, semillas y aceites de girasol con un contenido alto de oleico y alto de esteárico.

5 La presente invención se refiere a nuevas semillas de girasol que contienen un aceite que tiene un contenido alto de oleico y alto de esteárico. La invención también se refiere a plantas de girasol que producen estas semillas y al aceite contenido en las semillas. Además, la invención se refiere a métodos para producir las semillas de girasol, plantas de girasol y aceite.

10 Los usos de los aceites están determinados por su composición en ácidos grasos. El componente principal de los aceites son las moléculas triacilglicerol (TAG), que normalmente constituyen más de 95% del aceite. Para hacer el TAG se unen tres ácidos grasos a una molécula de glicerol. Si estos ácidos grasos son principalmente ácidos grasos saturados (“saturados”) el producto se llama grasa y es sólido a temperatura ambiente. Por otro lado, si los ácidos grasos son principalmente insaturados entonces se llama aceite y es líquido a temperatura ambiente.

15 Los aceites obtenidos a partir de semillas cultivadas en clima templado (girasol, soja, colza, etc.) tienen principalmente ácidos grasos insaturados, como ácidos linoleico y oleico, por lo tanto son líquidos y se usan principalmente para cocinar, aderezar ensaladas, etc. Las grasas se obtienen a partir de animales (margarina, manteca, etc.), de algunos árboles tropicales (coco, palma) o de aceites vegetales líquidos modificados químicamente (hidrogenación y transesterificación). Tienen principalmente ácidos grasos saturados (ácidos palmítico o esteárico) o modificados químicamente (ácidos grasos trans) todos con punto de fusión alto.

20 La tabla 1 muestra como un ejemplo la composición de ácidos grasos y otras propiedades de algunas grasas y aceites. Las grasas son necesarias para la mayoría de la industria alimentaria para hacer margarina, grasa culinaria, productos de panadería, productos de confitería, aperitivos, etc. La industria alimentaria usa la grasa con estos propósitos por sus propiedades plásticas (no se derriten, se pueden untar, o no se pegan en las manos) y estabilidad (tienen buena resistencia a la oxidación a temperaturas ambiente lo mayores).

TABLA 1

Aceite o grasa	Composición ácido graso (%)						Propiedades	
	Otros <sup>1</sup>	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Trans	Saturados
Manteca	3	2	25	12	45	10	1	79
Mantequilla	14	10	26	12	28	3	3	84
Margarina			10	7	46	34	23	*
Aceite de palma		1	45	5	39	9		18
Aceite de oliva	1		14	3	72	10		2
Mantequilla de coco			26	35	35	3		4
Girasol normal			7	5	30	57		1
Girasol rico en oleico			5	4	88	2		1

<sup>1</sup> “otros” son palmitoleico en el caso de manteca y aceite de oliva y también ácidos grasos más cortos que 12 carbonos en mantequilla.

60 \* depende del nivel de hidrogenación.

65 Sin embargo, las grasas disponibles actualmente no son una buena opción porque tienen propiedades nutricionales negativas. El problema principal es que elevan la forma mala del colesterol sérico (lipoproteína de baja densidad, LDL). Esto se debe a varios hechos, algunos relacionados con el origen de la grasa y otros con su manipulación. Las grasas animales tienen la mayoría de los ácidos grasos saturados en la posición 2 de la molécula TAG. Sin embargo, la mayoría de las grasas y aceites vegetales sólo tienen cantidades menores de ácidos grasos saturados en esta posición y por lo tanto son más saludables.

## ES 2 265 945 T3

Durante la digestión la molécula TAG se hidroliza por enzimas llamadas lipasas (figura 1). Los ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 se liberan como ácidos grasos libres. Si estos ácidos grasos son saturados forman sales insolubles con calcio y magnesio, siendo la mayoría excretadas. Pero los ácidos grasos en la posición 2 forman con el glicerol una molécula de monoacilglicerol, que tiene propiedades detergentes y se absorbe fácilmente en el cuerpo. Después los ácidos grasos saturados a partir de grasas animales se absorben, aumentando así el LDL.

Para incrementar el porcentaje de ácidos grasos saturados, se hidrogenan y/o transesterifican aceites vegetales. Por ejemplo, la hidrogenación de un aceite de canola se describe en el documento US 5.885.643. El documento US 5.885.643 enseña que la hidrogenación de un aceite de canola da como resultado un incremento de los ácidos grasos trans que probablemente son incluso peores que los ácidos grasos saturados, como puso de manifiesto Willett, W.C. & Ascherio, A. (1994) Trans fatty acids: Are the effects only marginal? American Journal of Public Health 84:722-724. El proceso de transesterificación cambia al azar los ácidos grasos en las tres posiciones, transformando un aceite vegetal saludable con ácidos grasos poco saturados en la posición 2, en un aceite que tiene cerca de 30% de ácidos grasos saturados. Por tanto ninguna de las dos modificaciones químicas conduce a un producto saludable.

Sin embargo, no todas las grasas son insaludables. Se ha demostrado que la mantequilla de coco, que tiene alrededor de 60% de ácidos grasos saturados, siendo el resto principalmente ácido oleico, no eleva el colesterol sérico. Esto se debe a dos razones principales. Una es que sólo 4% de los ácidos grasos saturados están en la posición 2 y la otra es que el principal ácido graso saturado es ácido esteárico. El ácido esteárico no tiene un efecto negativo sobre el colesterol sérico. Probablemente la cantidad de 35% de ácido oleico en la mantequilla de coco también aumenta sus propiedades saludables.

Es importante señalar que excepto en la mantequilla de coco, el ácido palmítico es el principal ácido graso saturado de las materias grasas. Sin embargo, el palmítico no es una grasa muy saludable.

El cultivo tradicional y la mutagénesis no han sido las únicas herramientas usadas para formar semillas que produzcan aceite con diferentes perfiles de ácidos grasos. Se han realizado incrementos de ácido esteárico en plantas oleaginosas cultivadas mediante la introducción de transgenes en el germoplasma, para alterar la vía de biosíntesis de ácidos grasos en el aceite vegetal. La biosíntesis de ácidos grasos en aceite vegetal, pero más particularmente en aceite de girasol, incluye la biosíntesis de básicamente dos saturados (palmitato, estearato) y dos insaturados (oleato y linoleato). En semillas oleaginosas, la estearoil-ACP desaturasa es la enzima que introduce el primer doble enlace en estearoil-ACP para formar oleoil-ACP. Así, esta es una enzima que ayuda a la determinación de la instauración en los ácidos grasos de longitud C18.

En la patente de EE.UU. número 5.443.974 se describió la inhibición de la enzima de canola estearoil-ACP desaturasa. Los niveles de estearato incrementaron pero los niveles de palmitato básicamente no se vieron afectados. Knutzon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2624-28 (1992) también informó de la inhibición de la enzima estearoil-ACP desaturasa de la planta de canola. Estos resultados mostraron un incremento en el nivel de estearato producido en la semilla de canola. La investigación también mostró que la inhibición por antisentido en semillas de canola y soja, respectivamente, mostró incremento de estearato. Cuando se introdujo en canola un plásmido que contenía un gen codificado para estearoil-ACP desaturasa, esta inhibición dio como resultado un incremento de ácido esteárico pero desafortunadamente una reducción de oleato. Sin embargo, en la soja esta inhibición de estearato dio como resultado una reducción de oleato menos drástica. Sin embargo, esta disminución más lenta de oleato puede haber sido una función de los niveles iniciales pequeños de oleato en la soja. La vía de ácidos grasos en la mayoría de las plantas de semilla oleaginosa parece oponerse a mantener en niveles elevados tanto oleico como esteárico.

La patente PCT/US97/01419 describe niveles incrementados tanto de ácido esteárico como de ácido palmítico en girasoles a través de la inhibición de la enzima estearoil-ACP desaturasa de la planta. Sin embargo, como se indicó anteriormente, el aceite palmítico no está visto como un aceite muy saludable.

La patente PTC/US96/09486 describe que los niveles en aceite de girasol de los ácidos tanto palmítico como oleico podrían incrementar, las semillas que tienen niveles incrementados de ácido palmítico de 21-23% y de ácido oleico de 61%. El aceite de girasol es líquido a temperatura ambiente. Pero se presume que el nivel incrementado de ácido graso palmítico permite que el aceite se use en grasa culinaria y en margarina con un nivel de hidrogenación relativamente bajo, que conduce a un nivel de ácidos grasos trans relativamente bajo en el producto que resulta. Sin embargo, se puede cuestionar el valor comercial por el alto nivel de ácido palmítico.

Así hay una necesidad de un aceite de girasol que sea tanto saludable como útil con propósitos industriales. Además, es deseable tener un aceite de girasol que tenga un equilibrio de saturados buenos e insaturados buenos, es decir, que sea rico en insaturados pero tenga suficientes saturados para usarse para margarinas o fase sólida sin niveles altos de hidrogenación, sin conducir, así, a ácidos grasos trans en el producto que resulta. Básicamente, hay una necesidad de una planta de girasol que pueda producir semillas que contengan aceite que sea rico en ácido oleico y en ácido esteárico con niveles reducidos de linoleico.

Por lo tanto el objetivo de la presente invención es proporcionar un aceite vegetal con contenidos altos de ácido esteárico (como ácido graso saturado) y contenidos altos de ácido oleico (como ácido graso insaturado) que reducirá los problemas con la grasa descritos anteriormente. En este aceite el ácido esteárico debería estar preferentemente en las posiciones 1 y 3 de TAG.

## ES 2 265 945 T3

La presente invención se basa en las siguientes consideraciones. La biosíntesis de ácido graso de la semilla tiene lugar dentro del plastidio (figura 2). Una sucesión de reacciones cíclicas catalizadas por el complejo enzimático FAS I produce el palmitoil-ACP que tiene 16 carbonos. Un segundo complejo enzimático llamado FAS II elonga el palmitoil-ACP a estearoil-ACP (18 carbonos), que después es modificado por la estearato desaturasa para producir oleoil-ACP. Estos son los tres ácidos grasos principales sintetizados por el plastidio, que son separados del ACP por la acción de la enzima tioesterasa y después se exportan fuera del plastidio. Después en el citoplasma, el ácido oleico se puede desaturar para formar los ácidos linoleico y linolénico.

El TAG (reserva de aceite) se produce en el citoplasma usando la reserva de ácidos grasos en el citoplasma. Esta reserva de ácidos grasos consiste en los ácidos grasos exportados a partir del plastidio y el ácido linoleico formado en el citoplasma por desaturación. Así, la composición de ácidos grasos de TAG está determinada por los ácidos grasos exportados fuera del plastidio más el ácido linoleico producido en el citoplasma.

Después se consideró que se podía seleccionar una nueva planta de girasol que fuera rica en ácidos esteárico y oleico si se combina una actividad estearato desaturasa reducida (que conduce a una disminución de la cantidad de oleoil-ACP formado y por lo tanto a un incremento de la estearoil-ACP) con una actividad tioesterasa buena sobre estearoil-ACP (que conduce a que el ácido esteárico sea transportado fuera del plastidio al citoplasma). Esta planta producirá una acumulación de estearoil-ACP dentro del plastidio y la actividad buena de la tioesterasa sobre estearoil-ACP debería exportarlo fuera del plastidio, teniendo ahí un contenido alto de ácido esteárico disponible para la biosíntesis de TAG.

En el citoplasma, fuera del plastidio, es necesario el carácter rico en oleico para mantener el contenido de ácido linoleico bajo. En líneas ricas en oleico, la vía de transformación no funciona adecuadamente, por lo tanto no hay transformación de ácido oleico en ácido linoleico.

Así, la presente invención está basada en la conclusión de que mediante selección de, por un lado, una línea parental que tiene un contenido alto de ácido esteárico (HS), y por otro lado, una segunda línea parental que es rica en oleico y tiene alta actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP (HOHT), se pueden hacer cruzamientos que dan como resultado semillas que tienen una combinación de las propiedades rica en esteárico y rica en oleico (HSHO). Además, sorprendentemente se encontró que en dicho aceite un máximo de 10% en peso de los grupos de ácidos grasos en la posición sn-2 de las moléculas TAG son grupos de ácidos grasos saturados.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a semillas de girasol que contienen un aceite que comprende un contenido de ácido oleico de más de 40% en peso y un contenido de ácido esteárico de más de 12% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y en el que un máximo de 10% en peso de los grupos de ácidos grasos en la posición sn-2 de las moléculas TAG que constituyen el aceite son grupos de ácido grasos saturados. Preferentemente, los grupos de ácidos grasos saturados son grupos de ácido esteárico. Es preferente que el aceite tenga en la posición sn-2 de las moléculas TAG un máximo de 8%, más preferentemente un máximo de 5% en peso, de grupos de ácidos grasos saturados, en particular grupos de ácido esteárico.

En lo que respecta a los otros ácidos grasos, se prefiere que el contenido de ácido oleico sea de 55 a 75% en peso, el contenido de ácido esteárico sea de 15 a 50% en peso, en particular 20 a 40% en peso, y el contenido de ácido linoleico sea menor que 20% en peso. Preferentemente el nivel total de ácidos grasos saturados es al menos 20% en peso.

La selección de los parentales se puede lograr como sigue.

Las líneas con contenido alto de ácido esteárico son líneas que tienen un contenido de ácido esteárico de más de 12%, preferentemente más de 20%. Un ejemplo de tal línea parental rica en esteárico (HS), que se seleccionó después de mutagénesis y tiene un contenido de ácido esteárico de 26% en peso, está disponible como "CAS-3" (ATCC depósito número 75.968, depositada el 14 de diciembre, 1994). Otro ejemplo es "CAS-4", que tiene un contenido de ácido esteárico de 16,1% en peso (ATCC depósito número 75.969, depositada el 14 de diciembre, 1994). Analizando la composición de ácidos grasos del aceite que proviene de semillas de otras líneas candidatas, el experto en la técnica será capaz de seleccionar otras líneas parentales apropiadas.

Se encontró que algunas de las variedades ricas en oleico usuales no podían usarse con el propósito de la invención porque se encontró que tenían muy baja actividad tioesterasa sobre la estearoil-ACP. Para solucionar esto, midiendo la actividad tioesterasa, se pueden seleccionar líneas con buena actividad sobre estearoil-ACP a partir de colecciones de líneas ricas en oleico disponibles.

En resumen, primero se analiza la composición de ácidos grasos del aceite de varias líneas que prometen. Una línea parental HOHT apropiada tiene más de 7-8% de ácido esteárico y o bien menos de 5% de ácido linoleico o más de 75% de ácido oleico. Posteriormente, las líneas seleccionadas deben crecer y autopolinizarse. La actividad tioesterasa total se mide en semillas 15 días después de la floración (15DAF) tanto sobre oleoil-ACP como estearoil-ACP. En las líneas adecuadas, la actividad sobre estearoil-ACP debe ser más de 10% de la actividad sobre oleoil-ACP. La proporción entre ambas actividades determina si la línea es adecuada como una línea parental o no.

La tabla 2 ilustra la composición de ácidos grasos y la actividad tioesterasa de dos líneas de girasol ricas en oleico.

## ES 2 265 945 T3

TABLA 2

*Contenido de ácido esteárico y Vmax tioesterasa sobre la estearoil-ACP en semillas de dos líneas de girasol ricas en oleico 15 días después de la floración*

Línea de girasol	Ácido esteárico (%)	Actividad tioesterasa Vmax
HOHT	17,8	2,03
HOLT	8,0	0,82

La línea HOHT es una línea rica en oleico con actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP (HOHT) de más de dos veces la Vmax tioesterasa sobre estearoil-ACP que una línea rica en oleico (HOLT) usual. La figura 3 ilustra la actividad relativa de las enzimas sobre la estearoil-ACP estandarizada con respecto a la actividad sobre oleoil-ACP. Como consecuencia, esta línea tiene más ácido esteárico 15 días después de la floración (tabla 2) y también en el aceite obtenido a partir de la semilla madura (tabla 3).

TABLA 3

*Composición de ácidos grasos (%) de semillas de dos líneas de girasol ricas en oleico*

Línea de girasol	Composición de ácidos grasos (%)					
	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Aráquico	Behénico
HOHT	4,3	9,7	78,5	3,9	1,0	2,6
HOLT	3,8	4,9	84,3	4,8	0,5	1,7

Esta línea parental HOHT se depositó el 7 de septiembre, 1999 en American Type Culture Collection (10.801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209) y se le asignó el número PTA-628.

Se han cruzado líneas de ambos tipos (HOHT y HOLT) con la línea CAS-3 rica en esteárico. En las figuras 4 (para HOHT) y 5 (para HOLT), se muestra la segregación en F2 para ambos caracteres (contenido alto de ácido esteárico y contenido alto de ácido oleico). Las semillas con los contenidos más altos de ácidos esteárico y oleico están en un círculo. De las figuras se deduce que la línea HOHT con alta actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP tiene semillas ricas en oleico y ricas en esteárico y la línea sin alta actividad tioesterasa no tiene semillas de este tipo. La tabla 4 muestra la composición de ácidos grasos de estas líneas.

TABLA 4

*Composición de ácidos grasos de líneas seleccionadas ricas en oleico y esteárico, con alta y baja actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP, después del cruzamiento con la línea CAS-3 HS*

Línea de girasol	Composición de ácidos grasos (%)					
	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Aráquico	Behénico
HOHTxCAS-3	5,2	24,6	59,2	6,8	1,8	2,4
HOLTxCAS-3	4,3	17,4	72,1	4,0	1,3	2,8

Las líneas F2 seleccionadas se autopolinizan durante 5 ó 6 generaciones en condiciones aisladas para evitar contaminación. Se seleccionan las generaciones que resultan, basándose en el contenido alto de ácido oleico y esteárico. Se puede analizar la actividad tioesterasa para ayudar al proceso de selección. Asimismo, se puede emplear un cultivo asistido por marcador para seguir la traza de cualquiera o todos de los tres caracteres para hacer más rápido el proceso de selección. Se pueden emplear varios marcadores tales como microsatélite SSR, ASO, RFLP y similares. El uso de marcadores no es necesario, ya que se conocen pruebas estándar para la determinación de oleico, esteárico y actividad tioesterasa. Sin embargo, una vez identificados los marcadores hacen el seguimiento del carácter más fácil y antes en la vida de la planta de girasol.

## ES 2 265 945 T3

Las plantas de girasol puras cultivadas producen un aceite que tiene una composición de ácidos grasos similar a las semillas F2 seleccionadas con un bajo contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de la molécula TAG (tabla 5).

TABLA 5

Composición de ácidos grasos de aceite, TAG y posiciones sn de plantas puras cultivadas seleccionadas HSHO.  
N.d. = no detectado

Composición de ácidos grasos (% en moles)

	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Aráquico	Behénico
Aceite total	5,5	24,9	57,8	8,2	1,7	1,8
TAG	5,6	26,1	57,6	7,4	1,6	1,7
Posición sn-2	1,7	1,9	87,4	9,0	N.d.	N.d.
Posición sn-1 y 3	7,2	33,1	46,8	7,3	2,7	2,9

La invención también se refiere a plantas de girasol que forman semillas que contienen el aceite de la invención descrito anteriormente y al aceite *per se*, así como a productos derivados de las semillas, tales como harina y semillas trituradas.

Las plantas de girasol y las semillas de girasol de la invención se pueden obtener mediante un método que comprende:

a) proporcionar semillas que contienen un aceite que tiene un contenido de ácido esteárico de al menos 12% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos del aceite mediante:

i) tratamiento mutagénico de semillas de girasol que tienen un contenido de ácido esteárico menor que 12%;

ii) producción de plantas de girasol a partir de ellas que se polinizan para producir semillas;

iii) ensayo de las semillas para ver el contenido de ácido esteárico deseado; y

iv) repetir opcionalmente las etapas b) y c).

b) proporcionar semillas que contienen un aceite que tiene un contenido de ácido oleico de al menos 40% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos del aceite, y que tiene una actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP que es al menos 10% de la actividad tioesterasa sobre oleoil-ACP;

c) cruzar plantas que surgen a partir de las semillas proporcionadas en la etapa (a) y (b);

d) cosechar la progenie de la semilla F1.

Preferentemente, el método además comprende las etapas:

e) plantar las semillas de la progenie F1 para que surjan plantas de girasol;

f) autopolinizar las plantas de girasol que han surgido de esta manera para producir semilla F2;

g) realizar pruebas a la semilla de presencia de un contenido de ácido esteárico en el aceite de al menos 12% en peso y un contenido de ácido oleico de al menos 40% en peso y una actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP que es al menos 10% de la actividad tioesterasa sobre oleoil-ACP;

h) plantar semillas de girasol que tienen los niveles deseados de contenido de ácido esteárico, contenido de ácido oleico y actividad tioesterasa para que surjan plantas de girasol;

i) autopolinizar las plantas que han surgido de esta manera para producir semilla F3; y

j) repetir opcionalmente las etapas g), h) e i) hasta que se fijen los niveles deseados de contenido de ácido esteárico, contenido de ácido oleico y actividad tioesterasa.

## ES 2 265 945 T3

Preferentemente, el contenido de ácido esteárico es al menos 15% en peso, preferentemente al menos 20% en peso.

5 El aceite de girasol de la presente invención, que tiene un contenido de ácido oleico de más de 40% en peso y un contenido de ácido esteárico de más de 12% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos del aceite, se puede obtener por extracción de aceite a partir de semillas. El método preferentemente incluye un proceso de extracción que no implica una modificación importante del aceite (de girasol).

10 Además, en el proceso de extracción del aceite a partir de semillas preferentemente no hay modificación química o física importante ni tiene lugar redistribución enzimática y preferentemente no hay endurecimiento importante del aceite.

15 El aceite según la invención es especialmente adecuado para usarlo en productos alimentarios. Los productos alimentarios que son particularmente útiles para este tipo de aceite incluyen productos untables, margarinas, grasa culinarias, salsas, helados, sopas, productos de panadería, productos de confitería, y similares. En estos productos alimentarios el nivel de aceite de girasol es preferentemente de 3 a 100% en peso, en relación con el peso total de aceite en el producto. Cuando se usa, según la presente invención, para formar un producto untable, el aceite de girasol preferentemente se usa como una fase sólida a niveles de 5 a 20% en peso.

20 Las semillas de girasol de la presente invención también son adecuadas *per se* para consumo humano y animal.

25 El aceite de la invención que tiene un contenido de ácido oleico de más de 40% en peso y un contenido de ácido esteárico de más de 12% en peso basado en el contenido total de ácidos grasos del aceite, también es adecuado para usarlo en productos cosméticos. Estos productos cosméticos preferentemente pueden contener niveles de aceite de girasol de 3 a 100% en peso. Algunos ejemplos de estos productos cosméticos incluirían cremas, lociones, barras de labios, pastillas de jabón y aceites para piel o cabello.

30 Las plantas de *Helianthus annuus*, capaces de producir semillas que tienen el aceite deseado, se pueden seleccionar mediante un método que comprende: a) seleccionar un número de plantas de *Helianthus annuus*, recolectar las semillas, cuyo aceite tiene un contenido de ácido esteárico de al menos 12% en peso y preferentemente 18% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos; b) seleccionar un número de plantas de *Helianthus annuus*, recolectar las semillas, que expresan un contenido de ácido oleico de al menos 40% en peso, basado en el aceite presente en la semilla, y una actividad tioesterasa sobre esteroil-ACP que es al menos 10% de la actividad tioesterasa sobre oleoil-ACP; c) cruzar las plantas producidas a partir de las semillas de (a) y (b); y, cosechar la progenie de la semilla F1.

40 Etapas adicionales incluyen las etapas de: (d) plantar las semillas o rescate de embriones de los embriones de la progenie F1 obtenida para formar semillas F2 segregantes; (e) seleccionar a partir de las semillas F2 que desarrollan plantas, esas plantas que producen semillas que tienen un contenido de ácido oleico de más de 40% en peso y un contenido de ácido esteárico de más de 12% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos del aceite, opcionalmente autopolinizar las plantas seleccionadas para formar cultivos endogámicos puros.

45 La semilla F1 híbrida se puede obtener mediante un método que comprende las etapas: a) plantar semillas de dos endogámicos que tienen contenido alto de ácido oleico de al menos 40% en peso y actividad tioesterasa sobre esteroil-ACP que es al menos 10% de la actividad tioesterasa sobre oleoil-ACP, uno de los cuales puede ser macho estéril, b) cruzar los dos endogámicos, y c) cosechar la semilla F1 capaz de producir la semilla F2 con contenido de ácido oleico de al menos 40% en peso y contenido de ácido esteárico de al menos un 12% en peso.

50 La presente invención engloba un aceite vegetal con una nueva y única composición de ácidos grasos producido fácilmente al producir cultivos de girasol. Sin embargo, otros cultivos posibles pueden incluir al menos *Brassicas*, cacahuetes, palmas y otras plantas productoras de aceite. Cuando se usa mutación para hacer uno o los dos parentales, el cultivo debería ser susceptible de inducir mutagénicamente cambios de aceite. La colza satisface todos estos requerimientos como lo hace el girasol, en el presente estos cultivos son algunos de los cultivos más útiles para la producción de esta nueva y única composición de ácidos grasos en el aceite de sus semillas.

55 En esta solicitud se hace referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: hidrólisis de triacilgliceroles mediante lipasa.

60 Figura 2: plastidio que muestra la biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas.

Figura 3: elevada actividad tioesterasa mostrada como la actividad relativa de la tioesterasa sobre esteroil-ACP y oleoil-ACP de HOHT y HOLT.

65 Figura 4: la segregación de F2 para los ácidos esteárico y oleico del cruce entre la línea rica en oleico con alta actividad tioesterasa sobre esteroil-ACP (HOHT) y una línea rica en ácido esteárico (CAS-3).

## ES 2 265 945 T3

Figura 5: la segregación de F2 para los ácidos esteárico y oleico del cruce entre la línea rica en oleico con baja actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP (HOLT) y una línea rica en ácido esteárico (CAS-3).

### Definiciones

“GIRASOL” significa *Helianthus annuus*.

“PLANTA” incluye la planta completa y todas las partes de planta y célula incluyendo polen, grano, aceite, embrión, tallo, cabeza, raíces, células, meristemos, óvulo, anteras, microesporas, embriones, ADN, ARN, pétalos, semillas y similares y protoplastos, callos o suspensiones de cualquiera de los anteriores.

“15DAF” significa 15 días después de la floración.

“CONTENIDO TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS” del aceite de girasol se refiere a la suma de C16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:0, 22:0 y las trazas de otros ácidos grasos que se determinan simultáneamente en el aceite a partir de la semilla.

“HOLT” significa que tiene niveles de altos a medio altos (40%-90%) de ácido oleico en el aceite cuando se compara con la semilla de girasol salvaje normal (niveles de ácido oleico de 17%-20%) en el que hay “NIVELES BAJOS DE ACTIVIDAD TIOESTERASA”. Una “LÍNEA HOLT” es una línea, en particular una línea de girasol, que tiene el carácter HOLT.

“HOHT” significa que tiene niveles de altos a medio altos (40%-90%) de ácido oleico en el aceite cuando se compara con la semilla de girasol salvaje normal (niveles de ácido oleico de 17%-20%) en el que hay “NIVELES ALTOS DE ACTIVIDAD TIOESTERASA”. Una “LÍNEA HOHT” es una línea, en particular una línea de girasol, que tiene el carácter HOHT.

“NIVELES ALTOS DE ACTIVIDAD TIOESTERASA” significa niveles (a 15DAF) de actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP que son al menos 10% de la actividad tioesterasa sobre oleoil-ACP. Como consecuencia, “NIVELES BAJOS DE ACTIVIDAD TIOESTERASA” significa niveles que están por debajo de los “NIVELES ALTOS DE ACTIVIDAD TIOESTERASA”.

“HS” significa que tiene niveles de ácido esteárico en el aceite de al menos 12% en peso y preferentemente al menos 15% en peso o más preferentemente 18% en peso o incluso al menos 20% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos. “LÍNEA RICA EN ESTEÁRICO” o “LÍNEA HS” significa una línea, en particular una línea de girasol, que tiene el carácter HS.

“HOHS” significa que tiene niveles de ácido oleico por encima de 40% y al menos 12% en peso de ácido esteárico en el aceite y preferentemente que tiene niveles de al menos 15% en peso, más preferentemente al menos 18% en peso o incluso al menos 20% en peso de ácido esteárico en el aceite. Una “LÍNEA HOHS” significa una línea que tiene el carácter HOHS.

### Ejemplos

#### Introducción

##### *Preparación del parental HS*

Para obtener el parental HS se puede usar un método para preparar semillas de girasol que tienen un contenido incrementado de ácido esteárico y ácido oleico comparado con semillas de tipo salvaje. Este método incluye la etapa de tratar semillas parentales con un agente mutágeno durante un periodo de tiempo y en una concentración suficientes para inducir una o más mutaciones en el carácter genético implicado en la biosíntesis de ácido esteárico o ácido oleico. Esto da como resultado una producción incrementada de ácido esteárico y/o un nivel incrementado de ácido oleico. Estos agentes mutágenos incluyen agentes tales como ázida sódica o un agente alquilante, como etil metano sulfonato, por supuesto que también se puede usar cualquier otro agente mutágeno que tenga los mismo o similares efectos. Las semillas tratadas contendrán cambios genéticos heredables. Después estas semillas mutadas germinan y de ahí se desarrollan plantas progenie. Para incrementar los caracteres en las líneas la progenie se puede cruzar o autopolinizar. Las semillas progenie se recolectan y analizan.

En el ejemplo 1 se usaron ázida sódica y etil metano sulfonato como agentes mutágenos. Se han obtenido varias líneas de girasol con un contenido de ácido esteárico entre 12 y 45%. En todos estos casos la línea parental original de girasol usada para la producción de líneas ricas en ácido esteárico fue RDF-1-532 (Colección de Girasol del Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España) que tiene de 4 a 7% de contenido de ácido esteárico en el aceite de semilla.

## ES 2 265 945 T3

### *Selección del parental HOHT*

En principio es suficiente examinar líneas oleicas para encontrar un fenotipo HOHT y usar esta línea para cada transformación o para cruzamiento con una línea rica en esteárico para desarrollar una línea HOHS. Una línea adecuada es al menos la línea parental HOHT que se depositó el 7 de septiembre, 1999 en American Type Culture Collection (10.801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209) y se le asignó el número PTA-628.

### *Producción de la línea HOHS*

Se pueden cruzar semillas que tienen el carácter HOHT o el carácter esteárico entre ellas para formar la línea HOHS. Opcionalmente puede haber ciclos adicionales de germinación, cultivo, y autopolinización para fijar la homocigocidad de los caracteres en las líneas y cruzar y recolectar las semillas.

### *Materiales y métodos*

#### *Condiciones de crecimiento de las plantas*

Se usaron las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) de líneas ricas en oleico con contenido de ácidos grasos en la semilla alterado, para realizar pruebas de las actividades tioesterasa sobre estearoil-ACP. Las plantas se cultivaron en cámaras de crecimiento a temperatura 25/15°C (día/noche), fotoperiodo de 16 horas y densidad de flujo fotónico de 300 micromol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Las semillas para el análisis se cosecharon 15 días después de la floración y se mantuvieron a -20°C.

#### *Reactivos radiactivos y preparación de acil-ACP*

Se obtuvieron ácido oleico [1-<sup>14</sup>C] con radiactividad específica de 2,1 GBq/mmol y ácido esteárico [9, 10 (n)-<sup>3</sup>H] con radiactividad específica de 1,9 GBq/mmol, de American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, Mo., EEUU). Para preparar la sal sódica de ácido graso, se transfirió un volumen apropiado de disolución de ácido graso a un tubo de vidrio, se eliminó el disolvente bajo una corriente de nitrógeno, y el residuo se disolvió en 10% Triton X-100, 0,6 mM NaOH. Para asegurar la homogeneidad esta disolución se calentó a 55°C durante 1 hora.

Se prepararon acil-ACP usando una modificación del procedimiento de síntesis enzimática de Rock C.O. *et al* (1981) *Methods Enzymology* 72:397-403. Los ensayos contenían 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,4 M LiCl, 5 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 130 microM sal sódica de ácido graso, 0,27 mM ACP-SH y 1,8 mU de acil-ACP sintetasa (los dos últimos componentes se adquirieron de Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), en un volumen final de 110 microlitros. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 horas. Después de este tiempo se acidificó el pH a 6,0 añadiendo 1 microlitro de 3,6 M HCl y de la mezcla se eliminaron los ácidos grasos libres usando una modificación del método descrito por Mancha M. *et al.* (1975) *Anal. Biochem.* 68:600-608), cuyo método consiste en añadir un volumen igual de isopropanol y lavar tres veces con hexano saturado en agua/isopropanol (1:1; v:v).

#### *Preparación de extractos crudos para ensayos de enzimas y determinación de proteína*

Se pelaron y molieron semillas congeladas en un extracto tampón que contenía 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 2 mM DTT y 5% (v/v) de glicerol (Dörmann P. *et al.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1212.134-136) a 1 g de tejidos/10 ml de tampón. Se midieron las concentraciones de proteína usando un equipo de ensayo de proteínas (Bio-Rad) según las recomendaciones del fabricante, con BSA como patrón.

#### *Ensayos de enzimas*

Se realizaron ensayos de actividad acil-ACP tioesterasa en un volumen final de 170 microlitros usando 130 microlitros de extracto crudo. Los ensayos testigo no tenían extracto crudo. Las mezclas de las reacciones contenían 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 5% de glicerol y 2 mM de ditioneitol (DTT) y diferentes concentraciones de substratos (estearoil-ACP y oleoil-ACP). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 20 minutos a 25°C. Las reacciones se pararon por la adición de 170 microlitros de ácido acético 1 M en isopropanol que contenía 1 mM de ácido oleico. Después las mezclas se lavaron tres veces con hexano saturado en agua/isopropanol (1:1, v/v).

Se determinó la actividad acil-ACP tioesterasa contando la radiactividad de la fase acuosa, que contenía los substratos no hidrolizados. Después se añadieron 3 ml de disolvente de centelleo (adquirido de National Diagnostics, Hesse, Inglaterra) y se midió la radiactividad usando un contador de centelleo (Rackbeta II; LKB, Suecia). Se ajustaron datos a partir de ensayos de acil-ACP tioesterasa a la ecuación de Michaelis-Menten por análisis de regresión no lineal por mínimos cuadrados, usando Microcal Origin 4.1, y correlativo a P<0,05, como se determina por el ensayo de Student pareado. De estas curvas se obtienen Vmax y Km.

## ES 2 265 945 T3

### Ejemplo 1

#### *Preparación de una línea HS*

##### 5 1. *Mutación con EMS*

Se mutagenizaron semillas con una disolución de 70 mM de etil metano sulfonato (EMS) en agua. El tratamiento se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas mientras se agitaba (60 rpm). Después de la mutagénesis se desechó la disolución de EMS y las semillas se lavaron durante 16 horas bajo agua corriente.

10 Las semillas tratadas germinaron en el campo y las plantas se autopolinizaron. Las semillas recolectadas a partir de estas plantas se usaron para seleccionar nuevas líneas de girasol con modificaciones en la composición de ácidos grasos. Usando el método de Garcés, R. y Mancha M. ((1993) Anal. Biochem. 211, 139-143) se determinó la composición de ácidos grasos de la semilla por cromatografía de gas líquido, después de transformar los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos.

Se seleccionó una primera planta con 9 a 17% de contenido de ácido esteárico en el aceite. Se cultivó la progenie durante cinco generaciones en las que el contenido de ácido esteárico incrementó y el nuevo carácter genético se fijó establemente en el material genético de la semilla. Esta línea se llama CAS-3. Los contenidos mínimo y máximo de ácido esteárico de la línea fueron 19 y 35%, respectivamente. El contenido de ácido esteárico del aceite extraído a partir de semillas de esta línea celular se puede encontrar entre 19 y 35%.

##### 2. *Mutación con ázida sódica*

25 Se mutagenizaron semillas de girasol con ázida sódica, a una concentración de 2 mM en agua. El tratamiento se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas mientras se agitaba (60 rpm). Después se desechó la disolución de mutagénesis y las semillas se lavaron durante 16 horas con agua corriente.

30 Las semillas se plantaron en el campo y las plantas se autopolinizaron. Se recolectaron semillas de estas plantas, y se determinó la composición de ácidos grasos por cromatografía de gas líquido, después de transformar los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos usando el método descrito en el ejemplo 1.

35 Se seleccionaron semillas a partir de una planta que tenía alrededor de 10% de ácido esteárico en el aceite y se cultivaron durante cinco generaciones. Durante este procedimiento el contenido de ácido esteárico incrementó y se fijó el nuevo carácter genético. Esta línea se llama CAS-4. Se analizó una muestra seleccionada de esta línea dando como resultado un contenido de ácido esteárico de 16,1%. Los valores mínimo y máximo fueron 12 y 19%, respectivamente.

40 TABLA 6

Porcentaje de ácidos grasos

45 Línea	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico
CAS-3	5,1	26,0	13,8	55,1
CAS-4	5,5	16,1	24,3	54,1

50

CAS-3 y CAS-4 están en depósito en American Type Culture Collection, y tienen número ATCC 75.968 y 75.969, respectivamente.

### 55 Ejemplo 2

#### *Producción de una línea HSHO*

##### 1. *General*

60 Se produjeron plantas de girasol a partir de semillas de girasol de la línea HOHT, semillas que están en depósito en ATCC (PTA-628). También se produjeron plantas de girasol a partir de semillas de las girasol CAS-3. Las líneas se cruzaron. A las plantas se las hizo polinización artificial para asegurar que tuviera lugar una adecuada producción de semilla. La semilla F1 se produjo en la línea HOHT, o viceversa, y se cosechó. Se seleccionaron las semillas F2 con más de 20% de estearato y más de 40% de oleato. Aunque esto produce el aceite de la presente invención el nivel de producción está limitado.

65

## ES 2 265 945 T3

Por lo tanto son deseables líneas endogámicas fijas que den semillas que manifiesten estos perfiles de aceites. Después estas líneas endogámicas fijas homocigóticas HSHO se pueden cruzar para formar semilla híbrida, que producirá semilla F2 que manifieste los caracteres de aceite deseados de la presente invención.

5 Para este fin se plantaron las semillas F1 y las plantas producidas se autopolinizaron en condiciones aisladas y se produjo semilla F2. Se realizaron pruebas a la semilla F2 de los tres caracteres, rico en esteárico, rico en oleico y niveles altos de actividad tioesterasa. La porción que queda de las semillas que manifiestan estos caracteres se empleó para producir plantas para formar semilla F3. El proceso de autopolinización y examen y selección se repitió para desarrollar la línea fija homocigótica HSHO, que tiene el siguiente perfil de ácidos grasos, C:16 5,4, C:18.0 24,8,  
10 C:18.1 58,5, C:18.2 7,2. Una vez que se fija el carácter se pueden cruzar líneas HSHO similares para formar semilla híbrida que tenga ambos caracteres.

Según la invención, las plantas de girasol y las semillas de las que se puede extraer dicho aceite, se han obtenido por medio de un proceso biotecnológico. Este contenido alto de ácido esteárico es un carácter hereditable y es bastante  
15 independiente de las condiciones de crecimiento.

### 2. Primer cruce

Se produjo una planta de girasol a partir de una semilla de girasol de una línea HOHT que tiene un contenido de  
20 ácido esteárico de 10,7% en peso y un contenido de ácido oleico de 74,6% en peso. También se produjo una planta de girasol a partir de una semilla de girasol CAS-3. Las plantas se cruzaron. A las plantas se las hizo polinización artificial para asegurar que tuviera lugar una adecuada producción de semilla. Se produjo semilla F1 en la línea HOHT, o viceversa, y se cosechó.

25 Se seleccionó una semilla F1 que tenía un contenido de ácido esteárico de 9,8% en peso y un contenido de ácido oleico de 80,7% en peso. Esta semilla F1 se plantó y produjo una planta que se autopolinizó en condiciones aisladas y se produjeron semillas F2. Se realizaron pruebas a estas semillas F2 de contenidos de ácido oleico y esteárico. Se seleccionó una semilla que contenía 23,6% en peso de ácido esteárico y 65,5% en peso de ácido oleico.

30 Se plantó esta semilla F2 y produjo una planta que se autopolinizó en condiciones aisladas y 15 días después de la floración se recolectaron varias semillas y se analizó la actividad estearoil-ACP tioesterasa. Se seleccionaron plantas que daban más de 10% estearoil-ACP tioesterasa referido a actividad oleoil-ACP tioesterasa de la misma planta.

35 Las semillas maduras de las plantas seleccionadas en la etapa anterior y que tenían contenido de ácido esteárico más alto que 20% en peso y contenido de ácido oleico más alto que 40% en peso se sometieron al proceso de autopolinización, examen y selección repetidamente para desarrollar la línea rica en esteárico rica en oleico fija homocigótica que tiene el siguiente perfil de ácidos grasos en el aceite:

40	Palmítico	7,8% en peso
	Esteárico	24% en peso
45	Oleico	57,7% en peso
	Linoleico	5,9% en peso
	Aráquico	1,9% en peso
	Behénico	2,7% en peso

50

Una vez que se fija el carácter, se pueden cruzar líneas ricas en esteárico ricas en oleico similares para formar semilla híbrida que tenga los caracteres seleccionados anteriores.

55 Un análisis de la posición sn-2 y las posiciones sn-1, 3 de las moléculas TAG de este aceite indica las siguiente distribución de ácidos grasos (en % en peso):

sn-2:

60	Palmítico	3,3%
	Esteárico	3,4%
	Oleico	88,8%
	Linoleico	4,5%
65	Aráquico	0%
	Behénico	0%

## ES 2 265 945 T3

sn-1, 3:

5	Palmítico	9%
	Esteárico	29,9%
	Oleico	51,1%
	Linoleico	4,7%
	Aráquico	2,3%
10	Behénico	3%

Así, la cantidad total de grupos de ácidos grasos saturados en la posición sn-2 de las moléculas TAG de este aceite es 6,7% en peso.

### 3. Segundo cruce

Se produjo una planta de girasol a partir de una semilla de girasol de una línea HOHT que tiene un contenido de ácido esteárico de 8,4% en peso y un contenido de ácido oleico de 78,5% en peso. También se produjo una planta de girasol a partir de una semilla de girasol CAS-3. Las plantas se cruzaron. A las plantas se las hizo polinización artificial para asegurar que tuviera lugar una adecuada producción de semilla. Se produjo semilla F1 en la línea HOHT, o viceversa, y se cosechó. Se seleccionó una semilla F1 que tenía un contenido de ácido esteárico de 7,1% en peso y un contenido de ácido oleico de 84,6% en peso. Esta semilla F1 se plantó y produjo una planta que se autopolinizó en condiciones aisladas y se produjeron semillas F2. Se realizaron pruebas a estas semillas F2 de contenidos de ácido oleico y esteárico. Se seleccionó una semilla que contenía 22,8% en peso de ácido esteárico y 64,8% en peso de ácido oleico.

Se plantó esta semilla F2 y produjo una planta que se autopolinizó en condiciones aisladas y 15 días después de la floración se recolectaron varias semillas y se analizó la actividad esteroil-ACP tioesterasa. Se seleccionaron plantas que daban más de 10% esteroil-ACP tioesterasa referido a la actividad oleoil-ACP tioesterasa de la misma planta. Las semillas maduras de las plantas seleccionadas en la etapa anterior y que tenían contenido de ácido esteárico más alto que 20% en peso y contenido de ácido oleico más alto que 40% en peso se sometieron al proceso de autopolinización, examen y selección repetidamente para desarrollar la línea rica en esteárico rica en oleico fija homocigótica que tiene el siguiente perfil de ácidos grasos en el aceite:

35	Palmítico	5,8% en peso
	Esteárico	24,7% en peso
	Oleico	57,6% en peso
	Linoleico	8,2% en peso
	Aráquico	1,8% en peso
40	Behénico	1,9% en peso

Una vez que se fija el carácter, se pueden cruzar líneas ricas en esteárico ricas en oleico similares para formar semilla híbrida que tenga los caracteres seleccionados anteriores.

Un análisis de la posición sn-2 y las posiciones sn-1, 3 de las moléculas TAG de este aceite indica las siguiente distribución de ácidos grasos (en % en peso):

sn-2:

50	Palmítico	1,7%
	Esteárico	1,9%
	Oleico	87,5%
	Linoleico	8,9%
55	Aráquico	0%
	Behénico	0%

sn-1, 3:

60	Palmítico	7,2%
	Esteárico	33,2%
	Oleico	46,9%
65	Linoleico	7,3%
	Aráquico	2,6%
	Behénico	2,8%

## ES 2 265 945 T3

Así, la cantidad total de grupos de ácidos grasos saturados en la posición sn-2 de las moléculas TAG de este aceite es 3,6% en peso.

### 4. Tercer cruce

5

Se produjo una planta de girasol a partir de una semilla de girasol de una línea HOHT que tiene un contenido de ácido esteárico de 9,9% en peso y un contenido de ácido oleico de 81,2% en peso. También se produjo una planta de girasol a partir de semilla de girasol CAS-3. Las plantas se cruzaron. A las plantas se las hizo polinización artificial para asegurar que tuviera lugar una adecuada producción de semilla. Se produjo semilla F1 en la línea HOHT, o viceversa, y se cosechó.

10

Se seleccionó una semilla F1 que tenía un contenido de ácido esteárico de 8,9% en peso y un contenido de ácido oleico de 82,3% en peso. Esta semilla F1 se plantó y produjo una planta que se autopolinizó en condiciones aisladas y se produjeron semillas F2. Se realizaron pruebas a estas semillas F2 de contenidos de ácido oleico y esteárico. Se seleccionó una semilla que contenía 23,9% en peso de ácido esteárico y 64,0% en peso de ácido oleico.

15

Esta semilla F2 se plantó y produjo una planta que se autopolinizó en condiciones aisladas y 15 días después de la floración se recolectaron varias semillas y se analizó la actividad esteroil-ACP tioesterasa. Se seleccionaron plantas que daban más de 10% esteroil-ACP tioesterasa referido a la actividad oleoil-ACP tioesterasa de la misma planta. Las semillas maduras de las plantas seleccionadas en la etapa anterior y que tenían contenido de ácido esteárico más alto que 20% en peso y contenido de ácido oleico más alto que 40% en peso se sometieron al proceso de autopolinización, examen y selección repetidamente para desarrollar la línea rica en esteárico rica en oleico fija homocigótica que tiene el siguiente perfil de ácidos grasos en el aceite:

20

25

Palmítico	5,4% en peso	
Esteárico	24,2% en peso	
Oleico	62,1% en peso	
Linoleico	4,7% en peso	
30	Aráquico	1,6% en peso
	Behénico	2,0% en peso

30

Una vez que se fija el carácter, se pueden cruzar líneas ricas en esteárico ricas en oleico similares para formar semilla híbrida que tenga los caracteres seleccionados anteriores.

35

Un análisis de la posición sn-2 y las posiciones sn-1, 3 de las moléculas TAG de este aceite indica las siguiente distribución de ácidos grasos (en % en peso):

40

sn-2:

Palmítico	1,8%	
Esteárico	3,3%	
45	Oleico	89,6%
	Linoleico	5,3%
	Aráquico	0%
	Behénico	0%

45

50

sn-1, 3:

Palmítico	9,5%	
Esteárico	33,5%	
55	Oleico	48,2%
	Linoleico	4,3%
	Aráquico	2,2%
	Behénico	2,3%

55

60

Así, la cantidad total de grupos de ácidos grasos saturados en la posición sn-2 de las moléculas TAG de este aceite es 5,1% en peso.

La presente solicitud se refiere a material genético, comprendiendo semillas de plantas, que incluyen el aceite contenido en ellas, harina y semillas trituradas, así como el proceso de hacer crecer las semillas y las plantas que son el resultado de hacer crecer las semillas y las plantas que producen las semillas.

65

# ES 2 265 945 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Semillas de girasol que contienen un aceite que tiene un contenido de ácido oleico de más de 40% en peso y un contenido de ácido esteárico de más de 12% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y en el que un máximo de 10% en peso de los grupos de ácidos grasos en la posición sn-2 de las moléculas TAG que constituyen el aceite son grupos de ácidos grasos saturados.
- 10 2. Semillas según la reivindicación 1, en las que las semillas contienen un aceite que tiene en la posición sn-2 de las moléculas TAG que constituyen el aceite un máximo de 8% en peso de grupos de ácidos grasos saturados.
3. Semillas según las reivindicaciones 1 ó 2, en las que las semillas contienen un aceite que tiene en la posición sn-2 de las moléculas TAG que constituyen el aceite un máximo de 5% en peso de grupos de ácidos grasos saturados.
- 15 4. Semillas según las reivindicaciones 1-3, en las que el contenido de ácido oleico es de 55 a 75% en peso.
5. Semillas según las reivindicaciones 1-4, en las que el contenido de ácido esteárico es de 15 a 50% en peso.
6. Semillas según la reivindicación 5, en las que el contenido de ácido esteárico es de 20 a 40% en peso.
- 20 7. Semillas según las reivindicaciones 1-6, en las que el aceite tiene un nivel total de ácidos grasos saturados de al menos 20% en peso.
8. Semillas según las reivindicaciones 1-7, en las que el aceite tiene un contenido de ácido linoleico menor que 20% en peso.
- 25 9. Aceite de girasol que tiene un contenido de ácido oleico de más de 40% en peso y un contenido de ácido esteárico de más de 12% en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y en el que un máximo de 10% en peso de los grupos de ácidos grasos en la posición sn-2 de las moléculas TAG que constituyen el aceite son grupos de ácidos grasos saturados.
- 30 10. Aceite según la reivindicación 9, como el contenido en las semillas de girasol según las reivindicaciones 1-8.
11. Plantas de girasol que surgen de semillas de girasol según las reivindicaciones 1-8.
- 35 12. Plantas de girasol que producen semillas de girasol según las reivindicaciones 1-8.
13. Método para producir una planta de girasol que forma semillas según las reivindicaciones 1-8, método que comprende:
- 40 a) proporcionar semillas que contienen un aceite que tiene un contenido de ácido esteárico de al menos 12% en peso mediante:
- 45 i) tratamiento mutagénico de semillas de girasol que tienen un contenido de ácido esteárico menor que 12%;
- ii) producir plantas de girasol a partir de ellas que se polinizan para producir semillas;
- iii) ensayar las semillas para ver el contenido de ácido esteárico deseado; y
- 50 iv) repetir opcionalmente las etapas b) y c);
- b) proporcionar semillas que contienen un aceite que tiene un contenido de ácido oleico de al menos 40% en peso y una actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP de al menos 10% de la actividad tioesterasa sobre oleoil-ACP;
- 55 c) cruzar plantas que surgen de las semillas proporcionadas en las etapas (a) y (b);
- d) cosechar la progenie de la semilla F1.
14. Método según la reivindicación 13, que además comprende las etapas de:
- 60 e) plantar las semillas de la progenie F1 para que surjan plantas de girasol;
- f) autopolinizar las plantas de girasol que han surgido de esta manera para producir semilla F2;
- 65 g) ensayar las semillas para ver la presencia de un contenido de ácido esteárico de al menos 12% en peso, un contenido de ácido oleico de al menos 40% en peso y una actividad tioesterasa sobre estearoil-ACP de al menos 10% de la actividad tioesterasa sobre oleoil-ACP;

## ES 2 265 945 T3

h) plantar semillas de girasol que tienen los niveles deseados de contenido de ácido esteárico, contenido de ácido oleico y actividad tioesterasa para que surjan plantas de girasol;

i) autopolinizar las plantas de girasol que han surgido de esta manera para producir semilla F3; y

j) repetir opcionalmente las etapas g), h) e i) hasta que se fijen los niveles deseados de contenido de ácido esteárico y contenido de ácido oleico y la elevada actividad tioesterasa.

15. Harina o semillas trituradas que se originan a partir de las semillas según las reivindicaciones 1-8.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

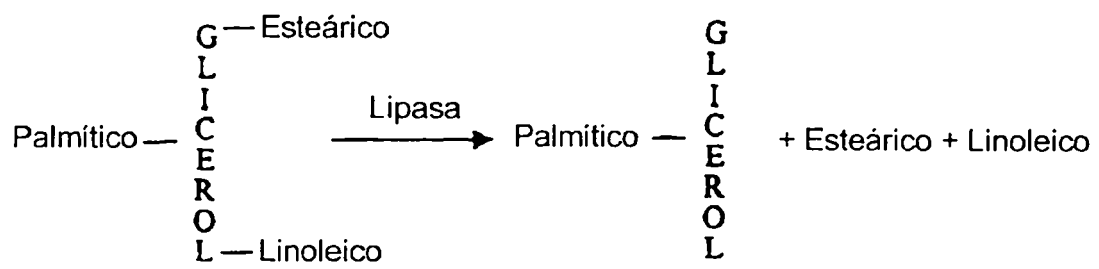


Figura 1

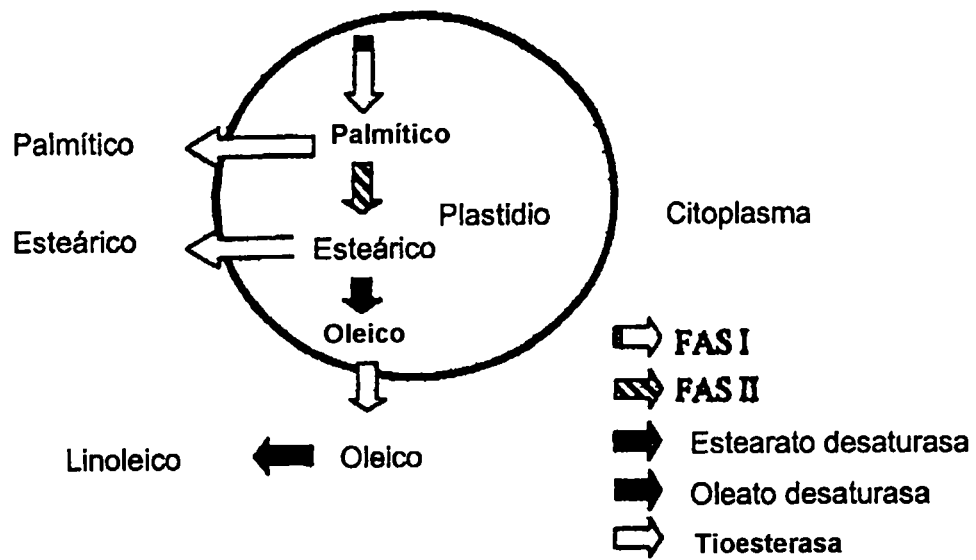
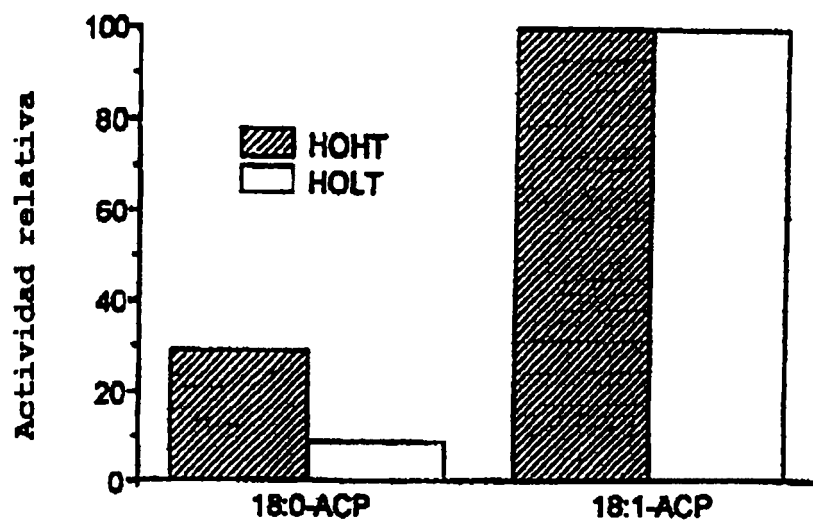


Figura 2



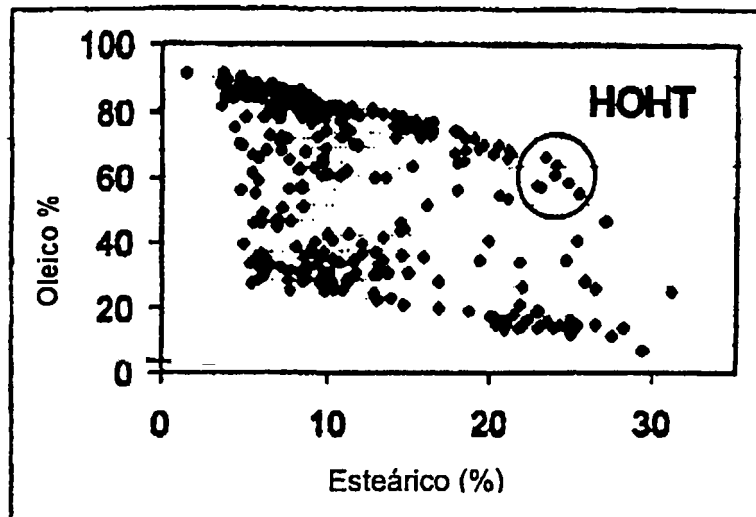


Figura 4

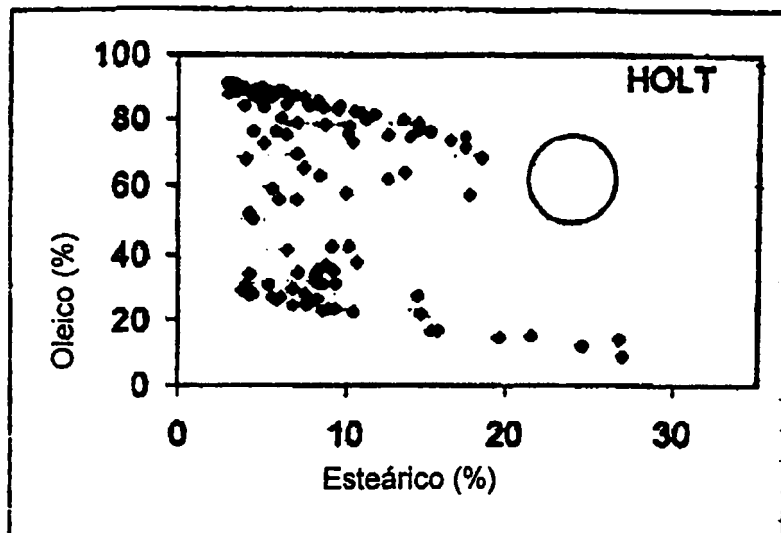


Figura 5