



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 158**

51 Int. Cl.:
A01H 5/10 (2006.01)
C11B 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02718148 .6**
96 Fecha de presentación : **15.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1372376**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Planta, semillas y aceite con un contenido incrementado de triacilgliceroles saturados y aceite que tiene un elevado contenido de ácido esteárico.**

30 Prioridad: **16.02.2001 US 269661 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Avenida Padre García Tejero, 4
41012 Sevilla, ES**

72 Inventor/es: **Martínez-Force, Enrique;
Fernández Moya, Valle y
Garcés, Rafael**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 309 158 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

Planta, semillas y aceite con un contenido incrementado de triacilglicerol saturados y aceite que tiene un elevado contenido de ácido esteárico.

La presente invención se refiere a semillas de girasol que comprenden un aceite que tiene cierto contenido de triacilglicerol para SMS y SMM y un contenido incrementado de ácido esteárico en comparación con las plantas de tipo salvaje entre 22% y 35% en peso con relación a la cantidad total de ácidos grasos del aceite, estas especies de triacilglicerol tienen la fórmula general que da de izquierda a derecha el primero, segundo y tercer ácidos grasos del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoéico. La invención también hace referencia a semillas de girasol que tienen un contenido de ácido esteárico de hasta 54% en peso o más. La invención se refiere adicionalmente a un aceite de girasol extraíble de las semillas de la invención, a las plantas de girasol producidas a partir de las semillas, a los métodos para preparar las semillas y el aceite, así como al uso del aceite en diversos productos y a los productos que comprenden el aceite.

El girasol se cultiva generalmente para obtener aceite que tiene ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico). El contenido de ácido esteárico es siempre menor de 10% (Gustone, F.D. *et al.* "The lipid handbook", Chapman y Hall 1.986), normalmente comprendido entre 3% y 7%. En relación con los ácidos grasos insaturados existen dos clases diferentes de semillas de girasol: el girasol normal que tiene un contenido de ácido linoleico entre 50% y 70% (Knowles, P.F. "Recent advances in oil crops breeding"; AOCs Proceedings 1988) y el girasol con alto contenido de ácido oleico que tiene 2-10% de ácido linoleico y 75-90% de ácido oleico (Soldatov, K.I. "Chemical mutagenesis in sunflower breeding", Int. Proc. 7ª Intern. Sunflower Conference, 352-357, 1.976). También existe una línea de girasol que tiene un elevado contenido de ácido palmítico, entre 22% y 40% (R. Ivanov *et al.* "Sunflower Breeding for High Palmitic Acid Content in the Oil"; Proc. of the 12ª Intern. Sunflower Conference, Vol. II, 453-465, 1.988) y otra línea con un bajo contenido de ácido graso saturado (6% o menos) (publicación EP-A-496504).

La Tabla I muestra la composición de ácido graso para algunas variedades de aceite de girasol conocidas.

TABLA I

% de ácidos grasos en el aceite de girasol

Variedad	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico
Normal ¹	5,9	5,7	21,8	66,5
Alto contenido de oleico ¹	3,1	4,8	84,9	6,7
Bajo contenido saturados ²	3,9	2,2	89,9	4,0
Alto contenido palmítico ³	25,1	4,3	10,6	56,4

¹ Fernández Martínez *et al.*; Grasas y Aceites 37, (1.986)

² Patente EP-A-496504

³ Esta variedad tiene también 3,6% de ácido palmitoleico

El contenido de ácido graso de un aceite está directamente relacionado con las características físicas y químicas del mismo. En caso de que dicho contenido sea suficientemente alto, el aceite puede ser sólido a la temperatura ambiente como algunas grasas animales. El aceite de girasol normal siempre es líquido en dichas condiciones.

En la industria alimentaria para la producción de confitería o margarina, normalmente se utilizan grasas animales o grasas vegetales hidrogenadas debido a que se requiere un producto sólido o semisólido. Por medio de hidrogenación los ácidos grasos insaturados se convierten en ácidos grasos saturados. Las grasas animales así como las grasas hidrogenadas no son muy recomendables desde el punto de vista nutricional (Chow, C.K. "Fatty acids in food and their health implications", Dekker, N.Y., 1.992). Las grasas animales tienen un contenido relativamente alto de colesterol. Demasiado colesterol en la dieta puede ser perjudicial para la salud. Por lo tanto las grasas animales se han sustituido en los últimos años por grasas vegetales hidrogenadas que no contienen colesterol.

Sin embargo, dichas grasas hidrogenadas presentan otro problema derivado del procedimiento de hidrogenación. En dicho procedimiento tienen lugar una isomerización posicional (desplazamiento de los dobles enlaces) y transformaciones estereoquímicas (formación de isómeros "trans"). Los isómeros son producidos en una cantidad de hasta 30%-50% de la cantidad de ácidos grasos totales. Estos isómeros no son muy saludables desde el punto de vista

nutricional (Wood, R., "Biological effects of geometrical and positional isomers of monounsaturated fatty acids in humans"; Dekker, N.Y. (1.990); Willet, W.C. & Ascherio, A., "Trans Fatty Acids: Are The Effects Only Marginal?", American Journal of Public Health, Vol. 84, 5, (1.994)). Por lo tanto, el uso de grasas hidrogenadas en la industria alimentaria debe ser evitado.

5

El aceite de girasol tiene un contenido deseable de ácidos grasos insaturados. Para su uso en la industria alimentaria no obstante, el contenido de ácido esteárico del aceite debe ser superior al del aceite de girasol normal (Norris, M.E., "Oil substitutions in food formulations", Inform. 1, 388-392 (1.990)) con el fin de obtener un producto más sólido.

10 En la publicación WO 95/20313 se describe un aceite de girasol que tiene un contenido de ácido esteárico incrementado entre 18,1 y 35% en peso. Este aceite es líquido a la temperatura ambiente.

Compendio de la invención

15 De este modo un objeto de la invención es proporcionar un nuevo aceite vegetal natural extraído de semillas mutadas, teniendo el aceite un contenido de ácido esteárico mayor en comparación con el aceite obtenido de las semillas de tipo salvaje y ciertos contenidos de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y SMM donde SMS es sólido (no líquido) a la temperatura ambiente (20°C) y SMM líquido.

20 La presente invención se describe ampliamente como una planta de girasol que tiene material genético capaz de elaborar semillas que comprenden aceite, comprendiendo dicho aceite un contenido de ácido graso esteárico incrementado de al menos 22% en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso en el aceite cuando se compara con el aceite de girasol extraído de plantas de girasol de tipo salvaje y con al menos 6% de especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM donde la fórmula da, de
25 izquierda a derecha, el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoénico.

El incremento de ácido graso esteárico en algunas realizaciones es de al menos 22% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite. Y en otras realizaciones, el incremento de ácido
30 esteárico es de al menos 26% e incluso en otras realizaciones preferidas es de al menos 28% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite. La planta de girasol que comprende niveles de SMM y SMS por encima de los niveles incrementados de ácido esteárico también puede comprender en su genoma al menos un transgén.

35 Una realización de la invención comprende una planta de girasol que forma semillas y el aceite de las mismas tiene un incremento de ácido esteárico y no menos de 7,4% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS.

Adicionalmente, la presente invención puede ser incorporada a una planta de girasol capaz de elaborar semillas
40 que en diversas realizaciones de la invención tienen un aceite extraíble de la semilla que comprende un aceite con al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más del 5,0% de especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMM con un incremento de ácido esteárico y al menos 22% de las especies de triacilglicerol con la fórmula general SDS y en otra realización al menos 25% de las especies de triacilglicerol con la fórmula general SDS. En otra realización más, al menos 28% de las especies de triacilglicerol con la fórmula general
45 SDS también se encuentra en el aceite donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y D representa un ácido graso di-insaturado.

La presente invención también describe un método para desarrollar plantas de girasol híbridas y semillas, que comprende las etapas de acceder al material del girasol con semillas que tienen un alto contenido de ácido esteárico de
50 al menos 22% en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite, como al menos un ancestro y cruzarlo con otro material de girasol diferente, donde se forma una semilla de girasol híbrida que cuando se planta forma una planta de girasol híbrida capaz de formar semillas con aceite que comprende niveles de ácido esteárico de al menos 28% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total del ácido graso del aceite y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso
55 del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoénico.

El alcance del método de la presente invención incluye el siguiente método de cruzamiento de girasoles que comprende las etapas de acceder al material de girasol seleccionado del grupo que consiste en semillas endogámicas que tienen un elevado contenido de ácido esteárico de al menos 12% en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso
60 del aceite, la planta de girasol producida de la misma, o una planta de girasol que tiene la semilla como ancestro, y reproducir tales líneas juntas o reproducir semejante línea con otro material de girasol, donde se produce un girasol diferente capaz de producir semillas con un aceite que comprende al menos 22% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite y con al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM donde la fórmula da de izquierda a derecha
65 el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoénico. La presente invención también puede ser incorporada a un aceite de una planta de girasol formada mediante el método anterior donde menos de 6,0% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general DDD están presentes en el aceite.

ES 2 309 158 T3

La invención incluye el aceite extraído de cualquiera de las semillas anteriores, que sin un tratamiento adicional, tiene trazas de aceite de cualquiera de las realizaciones de la presente invención.

5 La presente invención también puede incluir en la siguiente realización una semilla de girasol híbrida formada cruzando una planta de girasol con alto contenido de ácido esteárico con un girasol con alto contenido de aceite palmítico en su semilla donde dicha semilla de girasol híbrida tiene al menos 26% de contenido de ácido esteárico y una especie de triacilglicerol que tiene la fórmula general SMS de al menos 6% y no más de 5,0% de especie de triacilglicerol SMM.

10 Una realización de la invención se describe como un aceite extraído de material vegetal que comprende no más de 5,0% de especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMM y donde la fórmula general SMS comprende al menos 3,7% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula específica EOE, donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado, E representa un ácido graso esteárico y M representa un ácido graso monoénico, O representa un ácido graso oleico y el aceite
15 contiene al menos 28% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite.

Otra realización más de la invención está dirigida a un aceite extraído de material vegetal donde el aceite comprende no menos de 21,5% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SDS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMM donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y
20 tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoénico, y el aceite contiene al menos 28% de ácido esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite.

Por lo tanto la invención proporciona semillas de girasol, que comprenden un aceite de girasol que tiene un contenido incrementado de ácido esteárico en comparación con las semillas de tipo salvaje de no más de 5,0% de especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMM y donde la fórmula general SMS comprende al menos 6%, obtenible tratando las semillas parentales con un agente mutagénico durante un período de tiempo y en una concentración suficiente para inducir una o más mutaciones en el rasgo genético implicado en la biosíntesis de ácido esteárico dando como resultado un aumento de la producción de ácido esteárico, germinar las semillas tratadas y cultivar las plantas de su progenie, recoger y analizar las semillas de la progenie, seleccionar las semillas que han adquirido el rasgo genético deseable y opcionalmente repetir el ciclo de germinación, cultivo y recolección de las semillas.
30

Una semilla seleccionada de un grupo que consiste en la progenie CAS-3 y CAS-4 de líneas de cruzamiento que contiene al menos 12% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite o una semilla con un incremento de ácido esteárico similar que contiene al menos 12% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite que comprende un aceite con al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5% de las especies de triacilglicerol SMM donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoénico. La presente invención abarca adicionalmente el aceite extraído de dicha semilla. Adicionalmente en otra realización más de la invención anterior el aceite extraído de la semilla comprende un contenido de ácido graso esteárico en peso que no es menor de 15% de la cantidad total de los ácidos grasos del aceite. Adicionalmente en una realización de la invención la semilla con no más de 5,0% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMM y donde la fórmula general SMS comprende al menos 3,4% tiene adicionalmente un aceite donde menos de 8,1% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general DDD.
45

La presente invención comprende adicionalmente el aceite extraído de las semillas que tienen CAS-3 o CAS-4 como ancestro que comprende especies de triacilglicerol en las que al menos 12,0% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMS, y no más de 8,0% de especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general DDD y el contenido de ácido graso esteárico en peso no es menor de 22% de la cantidad total de contenido de ácido graso del aceite. La presente invención también abarca híbridos elaborados con material de alto contenido de ácido esteárico por ejemplo la semilla de girasol híbrida formada cruzando CAS-3 o CAS-4 con un girasol con un elevado contenido de aceite palmítico en su semilla donde dicha semilla de la progenie tiene al menos 22% de contenido de ácido esteárico y una especie de triacilglicerol que tiene la fórmula general SMS de al menos 12% y no más de 5% de la especie de triacilglicerol SMM donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoénico. Específicamente semejante híbrido se puede formar con el cruzamiento del depósito IG-1297M presentado en la ATCC y CAS-3 o CAS-4 o su progenie. Esta semilla de girasol híbrida formada cruzando CAS-3 con CAS-4 o su progenie a menudo evidencia un contenido de ácido esteárico de al menos 15% del contenido de ácido graso total. La invención incluye un aceite extraído de material vegetal con al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5% de las especies de triacilglicerol SMM donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoénico, y el aceite contiene al menos 26% de ácido graso esteárico en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite.
60

65 Preferiblemente las semillas de girasol de acuerdo con la invención comprenden un aceite que tiene un contenido de ácido esteárico entre 22 y 35% en peso, con respecto a la cantidad total de ácidos grasos del aceite, el contenido de ácido esteárico de al menos 22% es útil, más preferiblemente es de al menos 25%, siendo al menos 28% otra realización y al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y siendo no más de

ES 2 309 158 T3

5,0% de las especies de triacilglicerol SMM y son obtenibles tratando las semillas parentales durante 2 horas a la temperatura ambiente con un agente alquilante tal como una solución de metanosulfonato de etilo en agua 70 mM.

5 En otra realización de la invención las semillas son obtenibles tratando las semillas parentales con una solución de azida de sodio en agua 2 mM durante 2 horas a la temperatura ambiente.

10 Otro método para producir la presente invención consiste en cruzar semillas con incremento de ácido esteárico denominadas CAS-3 o CAS-4, donde una semilla representativa de las semillas CAS-3 ha sido depositada con el número de acceso ATCC 75968 y una semilla representativa de las semillas CAS-4 ha sido depositada con el número de acceso ATCC 75969. Adicionalmente, la invención abarca una planta de girasol o sus partes como sus semillas, embriones, polen derivado de semejante semilla o de una semilla similar con el rasgo de elevado contenido de ácido esteárico y SMM y SMS. La presente invención incluye una semilla que tiene al menos una de tales semillas de girasol como al menos una planta de girasol ancestral. La invención abarca adicionalmente una planta de girasol estéril masculina o sus partes como sus semillas derivadas de semejante semilla y desarrollada con germoplasma que comprende un componente citoplásmico de esterilidad masculina. O semejante planta de girasol comprende un componente citoplásmico restaurador de la esterilidad masculina.

20 También se describen ciertos métodos de desarrollo de una planta de girasol híbrida, que comprenden las etapas de acceder al material de girasol que tiene las semillas de CAS-3 o CAS-4 o semillas similares con el rasgo de elevado contenido de ácido esteárico como al menos un ancestro y cruzarla con otro material de girasol diferente donde se forma una planta de girasol híbrida que es capaz de elaborar un aceite que comprende al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM. Asimismo se describe un método de producción de girasoles que comprende las etapas de acceder al material de girasol seleccionado del grupo que consiste en semillas endogámicas de CAS-3 o CAS-4 o semillas similares con el rasgo de elevado contenido de ácido esteárico, la planta de girasol producida de las mismas, o una planta de girasol que tiene semejantes semillas como ancestros, y reproducir otro material de girasol con la planta o partes de la planta a la que se ha tenido acceso, donde se produce un girasol diferente que es capaz de elaborar un aceite que comprende al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM, que el del material de girasol original.

30

Descripción de la invención

35 Algunas semillas de girasol útiles para el cruzamiento para formar la presente invención son identificadas como "CAS-3" que tienen un contenido medio de ácido esteárico de 25% en peso, con respecto a la cantidad total de ácidos grasos del aceite, han sido depositadas el 14 de Diciembre de 1.994 en la Colección de Cultivos Tipo Americana, 12301 Paklawn Drive, Rockville, MD 20852, U.S.A. con el número de acceso del depósito ATCC 75968. Las semillas de girasol identificadas como "CAS-4" que tienen un contenido medio de ácido esteárico de 15,4% en peso, con respecto a la cantidad total de ácidos grasos en el aceite, han sido depositadas el mismo día en la misma institución con el número de acceso del depósito ATCC 75969.

40

Las semillas que tienen un contenido de ácido esteárico incluso mayor entre 29 y 54% en peso con respecto a la cantidad total de ácidos grasos en el aceite, pueden ser obtenidas cruzando girasoles que se originan a partir de semillas que tienen un contenido de ácido esteárico entre 19,1 y 35% en peso con girasoles que se originan a partir de semillas que tienen un contenido de ácido esteárico entre 12% y 19% en peso, y recogiendo las semillas.

45

50 La invención se refiere adicionalmente a un aceite de girasol que comprende al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM y un contenido de ácido esteárico entre 22% y 54% en peso, preferiblemente entre 22% y 35% en peso, con respecto a la cantidad total de ácidos grasos del aceite, que puede ser obtenido extrayendo las semillas de girasol de la invención. Se puede obtener aceite de girasol que comprende al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM y que tiene un contenido de ácido esteárico de 22% en peso con respecto a la cantidad total de ácidos grasos del aceite extrayendo las semillas de girasol de cruces seleccionados formados con el número de acceso de depósito ATCC 75969. El aceite de girasol que comprende al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM y que tiene un contenido de ácido esteárico de 25% en peso con respecto a la cantidad total de ácidos grasos del aceite, es obtenible extrayendo semillas de girasol que tienen como ancestro en un cruce seleccionado del número de acceso de depósito ATCC 75968.

55

60 Preferiblemente el aceite de girasol de la invención tiene incrementado el ácido esteárico y al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM y un contenido de ácido palmítico entre 3 y 40% en peso, un contenido de ácido oleico entre 3 y 85% en peso y un contenido de ácido linoleico entre 2 y 84% en peso, todos con respecto a la cantidad total de ácidos grasos del aceite. Tales tipos de aceites pueden ser obtenidos a partir de semillas producidas cruzando las semillas con alto contenido de ácido esteárico de la invención con semillas que tienen un contenido deseable de uno o más ácidos grasos insaturados y/o saturados. De este modo se pueden obtener semillas hechas a la medida y aceite hecho a la medida producido a partir de ellas preparando mutantes de acuerdo con la invención y utilizar éstas en la práctica de mejora vegetal convencional adicional cruzándolas con otras plantas mutantes o de tipo salvaje conocidas o todavía desconocidas.

65

ES 2 309 158 T3

También se describe un método para preparar semillas de girasol que tienen un contenido de ácido esteárico incrementado con comparación con las semillas de tipo salvaje, tratando semillas parentales con un agente mutagénico durante un período de tiempo y en una concentración suficiente para inducir una o más mutaciones en el rasgo genético implicado en la biosíntesis de ácido esteárico dando como resultado un incremento de la producción de ácido esteárico, germinando las semillas tratadas y cultivando las plantas progenie a partir de allí, recogiendo y analizando las semillas progenie, seleccionando las semillas que comprenden al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de las especies de triacilglicerol SMM y que han adquirido el rasgo genético deseable y repitiendo opcionalmente el ciclo de germinación, cultivo y recolección de las semillas.

En la práctica, el método comprende la mutagénesis de semillas de girasol con un agente de mutagénesis adecuado. La mutagénesis producirá cambios genéticos heredables en el ADN de las semillas. Después de varios tratamientos diferentes fue posible seleccionar algunos tratamientos que produjeron un elevado número de modificaciones genéticas en los genes que controlan la biosíntesis de ácidos grasos de la semilla. Estos tratamientos comprenden el uso de azida de sodio o un agente alquilante, como metanosulfonato de etilo. Por supuesto, también se puede utilizar cualquier otro agente mutagénico que tenga los mismos o similares efectos.

Después, se analizó la siguiente generación de semillas con una nueva metodología descrita por Garcés, R. y Mancha, M. "One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues". *Analytical Biochemistry*, 211:139-143, 1.993. Esto permitió la detección de semillas con modificaciones en la composición de cualquier ácido graso. Las semillas seleccionadas que mostraron un contenido de ácido esteárico deseablemente elevado se cultivaron hasta la quinta generación mostrando que este nuevo rasgo genético es heredable y estable e independiente de las condiciones de crecimiento.

Las semillas parentales se tratan por ejemplo durante 2 horas a la temperatura ambiente con una solución de metanosulfonato de etilo en agua 70 mM, o durante 2 horas a la temperatura ambiente con una solución de azida de sodio en agua 2 mM.

Se pueden seguir a mutación y las etapas de selección mediante técnicas de mejora vegetal convencionales conduciendo de este modo a semillas que tienen y al menos 6% de las especies de triacilglicerol que tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de especies de triacilglicerol SMM y un contenido de ácido esteárico incluso superior de hasta 54% en peso o más, o a semillas que tienen un contenido deseable de uno o más ácidos grasos distintos. Las semillas de la invención pueden ser sometidas a uno o más tratamientos de mutación adicionales.

Se puede preparar aceite de girasol que tiene un contenido de ácido esteárico entre 22 y 35% en peso, con respecto a la cantidad total de ácidos grasos del aceite, mediante extracción de semillas de girasol de la invención de cualquier manera conocida por el experto en la técnica. Tales métodos de extracción son bien conocidos y se describen por ejemplo en "Bailey's industrial oil and fat products", Vol. 2, Capítulo 3; 4ª Edición, John Wiley and Sons, Nueva York (1.982).

La invención se refiere adicionalmente a plantas de girasol producidas a partir de semillas de acuerdo con la invención. De este modo, se pueden utilizar las semillas para producir líneas parentales que tienen los TAG deseables y un elevado contenido de ácido esteárico en su aceite. Esto también se aplica a plantas que se originan a partir de semillas obtenidas después del cruzamiento de los mutantes de la invención entre sí o con otras semillas que tienen un fenotipo deseable. Las semillas pueden ser cultivadas de la manera normal en tierra o cualquier otro sustrato. La producción de las plantas modificadas no requiere ninguna medida adicional en comparación con el desarrollo de semillas de girasol normales.

Las plantas de girasol se pueden utilizar en programas de reproducción para el desarrollo de líneas de girasol o híbridos, cuyos programas están destinados a la producción de variedades de polinización abierta o híbridos que satisfacen los requerimientos de rendimiento referente a las técnicas agrícolas, resistencia a enfermedades y otros rasgos agrónomicamente importantes en las principales zonas de crecimiento de girasol del mundo. Las semillas resultantes de estos programas se pueden utilizar en el crecimiento de cultivos de girasol comerciales.

El aceite de girasol de la invención se puede utilizar en la industria alimentaria. El aceite vegetal natural que ha sido extraído de semillas de girasol mutagenizadas tiene un elevado contenido de ácido esteárico entre 22 y 35%, o en caso de entrecruzamiento de las semillas, incluso hasta 54% o más. Esto permite el uso de lo que es una grasa de tipo sólido, el aceite con un contenido incrementado de ácido esteárico y los TAGS deseados de estas clases de semillas como tales. Sin embargo, también son posibles combinaciones del aceite de la invención con aceite de semillas de girasol con alto contenido de ácido oleico o alto contenido de ácido palmítico conocidas, en la producción de grasas comestibles o mezclas de grasas, como margarinas, lácteos vegetales o en la producción de confitería o repostería dependiendo de los requerimientos de la aplicación. Adicionalmente, el aceite de la presente invención puede ser utilizado como un aceite total o se puede utilizar o separar componentes del aceite. Por ejemplo, se puede separar un componente del aceite tal como los diinsaturados antes de su uso en la producción de grasas comestibles o mezclas de grasas, como la margarina, lácteos vegetales o en la producción de confitería o repostería. La ventaja de estos aceites es que no tienen isómeros de ácidos grasos artificiales, como los isómeros "trans" encontrados en los aceites hidrogenados, y, por supuesto, sin colesterol, como las grasas animales.

ES 2 309 158 T3

Los productos elaborados utilizando aceite, son por ejemplo margarina, lácteos vegetales, confitería o repostería. El aceite puede remplazar simplemente los aceites o grasas utilizados normalmente en este tipo de productos. Está dentro del alcance del experto en la técnica determinar cómo utilizar el aceite sin realizar ningún trabajo de la invención.

- 5 La presente invención se ilustrará adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos que se proporcionan con fines ilustrativos solamente y en modo alguno están destinados a limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

10

Materiales y métodos

Se utilizaron azida de sodio y metanosulfonato de etilo como agentes mutagénicos en el Ejemplo 1 y 2, respectivamente. Se han obtenido numerosas líneas de girasol con un contenido de ácido esteárico entre 12 y 35%. En todos estos casos la línea parental de girasol original 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 la semilla. La preparación de las líneas CAS-3 y CAS-4, y de la línea CAS-3x4 obtenida después del cruzamiento de CAS-3 con CAS-4, ha sido descrita en los siguientes ejemplos.

20

Ejemplo 1

Se sometieron a mutagénesis las semillas con una solución de 70 mM de metanosulfonato de etilo (EMS) en agua. El tratamiento se realizó a la temperatura ambiente durante 2 horas mientras se sacudía (60 rpm). Tras la mutagénesis se descartó la solución de EMS y las semillas se lavaron durante 16 horas con agua del grifo.

25

Las semillas tratadas se hicieron germinar en el campo y las plantas se autopolinizaron. Las semillas recogidas de estas plantas se utilizaron para seleccionar nuevas líneas de girasol con modificaciones en la composición de ácidos grasos. Utilizando el método de Garcés, R. y Mancha, M. *supra* se determinó la composición de ácidos grasos de la semilla mediante cromatografía gas líquido, después de convertir los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos.

30

Se seleccionó una primera planta con un contenido de ácido esteárico en el aceite de 9 a 17%. La progenie se cultivó durante cinco generaciones durante las cuales el contenido de ácido esteárico aumentó y el nuevo rasgo genético se fijó establemente en el material genético de la semilla. Esta línea se denominó CAS-3. Una muestra seleccionada de esta línea se analizó dando como resultado un contenido de ácido esteárico de 26% (Tabla 2). El contenido mínimo y máximo de ácido esteárico de la línea fueron 19 y 35% respectivamente. El contenido de ácido esteárico del aceite extraído de las semillas de esta línea celular puede encontrarse de este modo entre 19 y 35%.

35

40

Ejemplo 2

Se sometieron a mutagénesis semillas de girasol con azida de sodio, a una concentración 2 mM en agua. El tratamiento se realizó a la temperatura ambiente durante dos horas mientras se sacudía (60 rpm). Después se descartó la solución de mutagénesis y las semillas se lavaron durante 16 horas con agua del grifo.

45

Las semillas se plantaron en el campo y las plantas se autopolinizaron. Las semillas de estas plantas se recogieron, y se determinó la composición de ácidos grasos mediante cromatografía gas líquido, después de convertir los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos utilizando el método descrito en el Ejemplo 1.

50

Las semillas de una planta que tenía alrededor de 12% de ácido esteárico en el aceite se seleccionaron y se cultivaron durante cinco generaciones. Durante este procedimiento se incrementó el contenido de ácido esteárico y se fijó el nuevo rasgo genético. Esta línea se denominó CAS-4. Una muestra seleccionada de esta línea se analizó dando como resultado un contenido de ácido esteárico de 16,1%. Los valores mínimo y máximo fueron 12 y 19% respectivamente (Tabla 2).

55

60

65

ES 2 309 158 T3

TABLA 2

Porcentaje de ácidos grasos

Línea	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico
RDF-1-532	6,7	4,5	37,4	51,3
CAS-3	5,1	26,0	13,8	55,1
CAS-4	5,5	16,1	24,3	54,1
CAS-5	32,0*	1,7	9,0	47,7

Elevado contenido palmítico = CAS-5

* también tiene niveles elevados de ácido palmitoleico (C16:1) de 7,6

Ejemplo 3

Se hicieron crecer plantas de girasol a partir de semillas CAS-3 y CAS-4. Las plantas obtenidas de este modo fueron polinizadas artificialmente con el fin de asegurar que se produjeran cruzamientos solamente entre CAS-3 y CAS-4, no la polinización de las plantas mutantes entre ellas.

A partir de las semillas producidas de este modo se desarrollaron plantas y se determinó el contenido de ácido esteárico de la progenie como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2. La progenie y las plantas incluirán células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales a partir de los cuales se pueden regenerar plantas, callos vegetales, agrupaciones vegetales, ARN y ADN vegetales y células vegetales que están intactas en plantas o partes de las plantas, tales como embriones, polen, flores, semillas, estambres, pétalos, hojas, cascarillas, tallos, raíces, puntas de raíces, anteras, células y similares, y este término también incluye cualquier ADN o (ARN) transgénico o porción del mismo que haya sido introducida en la planta mediante cualquier método. El híbrido CAS-3x4 tenía un contenido de ácido esteárico de más de 35% en peso. A partir de esto parece que el entrecruzamiento de mutantes producirá híbridos con un contenido de ácido esteárico aún mayor.

Los aceites contenidos en las semillas de CAS-3 y CAS-4 son triésteres de glicerol con ácidos grasos y se denominan triglicéridos o triacilgliceroles (también identificados aquí como "TAG"). Los TAG de CAS-3 y CAS-4 se encuentran en una huella que identificaba el aceite. Los tres ácidos grasos de un triacilglicerol pueden ser iguales o diferentes y pueden ser saturados o insaturados. Las propiedades físicas de un triacilglicerol dependen de su composición de ácidos grasos. Existen tres posiciones en el TAG, *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*. Se ha sugerido que la localización de los ácidos grasos saturados en la posición *sn-2* es responsable de los efectos aterogénicos de estos ácidos. De este modo los TAG con SMS y SDS son mejores, donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoenoico y D representa un ácido graso diinsaturado.

La presente invención proporciona un aceite de girasol, que puede ser extraído de semillas de girasol y en el que al menos 3,4%, más preferiblemente más de 5% de las especies del triacilglicerol que constituyen el aceite tienen una fórmula general SMS y preferiblemente menos de 25% e incluso más preferiblemente menos de 13,0% e incluso más preferido menos de 5,0% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMM.

En diversas realizaciones de esta invención el contenido de tag SDS de semejante aceite es normalmente superior al contenido de tag SDS del aceite de girasol normal. La presente invención proporciona un aceite de girasol, que puede ser extraído de semillas de girasol y en el que al menos 3%, más preferiblemente al menos 8% e incluso más preferiblemente más de 20% de las especies de triacilglicerol que constituyen el aceite tienen la fórmula general SDS, donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoenoico y D representa un ácido graso diinsaturado.

El aceite de acuerdo con la invención puede ser formado por las semillas mutantes depositadas en la ATCC de la presente memoria.

El aceite de la invención es un aceite natural que puede ser extraído de las semillas de girasol y utilizado directamente sin métodos de modificación adicionales para cambiar el contenido de TAG de la invención. Semejante método de modificación es por ejemplo el denominado "endurecimiento" del aceite, que representa la hidrogenación de ácidos grasos. El aceite de la invención se obtiene sin realizar semejantes procedimientos de modificación artificial.

El aceite de girasol preferido de la invención tiene niveles de SMS de al menos 3,4%.

ES 2 309 158 T3

Los ácidos grasos saturados observados previamente son ácido graso esteárico, ácido palmítico, ácido aráquico y ácido behénico. El aceite debe tener un contenido de ácido esteárico relativamente elevado de manera que el aceite sea preferiblemente semi-sólido a la temperatura ambiente.

5 La composición de triacilglicerol del aceite de girasol que se puede extraer de las semillas normales y de las semillas CAS-3 y CAS-4 del depósito está en la Tabla 1. Donde CAS-3 no tiene una cantidad detectable de POP, 2% POE; EOE 4% (redondeando al número entero más próximo), ELA = 1%; PLP = 1%; PLE = 7%; ELE = 12%; POO = 1%; EOO = 4%. Como se observa en la Tabla: P = palmítico; E = esteárico; O = oleico; L = linoleico; A = aráquico y B = behénico.

10

TABLA 3

Composición de triacilglicerol (%) de un aceite de girasol normal de control (Normal) y los mutantes CAS-3 y CAS-4

15

Especies	Composición (%)		
	Normal	CAS-3	CAS-4
POP	0,3	-	-
PLP	0,7	0,8	-
POE	0,5	2,1	1,5
POO	3	1	3,3
PLE	1,2	6,8	2,1
POL	7,4	3,3	5,1
PLL	6,1	4,8	3,5
EOE	-	3,6	1,9
EOO	2,2	4,1	8,6
ELE	-	12	1,8
OOO	6,4		9,4
EOL	5,2	14,6	12,1
OOL	18,8	2,7	15,7
ELL	5,2	24,6	9,1
OLL	26,8	6,5	15,3
LLL	14,8	7,6	8
ELA	-	1,1	-
OLA	-	0,8	0,7
LLA	-	1,2	-
OOB	-	-	0,9
ELB	-	0,7	-
OLB	0,5	0,8	1,1
LLB	0,6	0,9	-

65

P = Palmítico; E = Esteárico; O = Oleico; L = Linoleico; A = Aráquico; B = Behénico.

ES 2 309 158 T3

TABLA 4

Composición de triacilglicerol (%) de un aceite de girasol normal de control (Normal) y una línea con alto contenido de ácido palmítico (que tiene menor contenido de ácido esteárico que de palmítico) y mutantes CAS-3 y CAS-4 de acuerdo con los tipos de TAG

TAG tipos	Composición (%)			
	Elevado contenido palmítico	Normal	CAS-3	CAS-4
SMS	4,6	0,8	5,7	3,4
SMM	-	5,2	5,1	12,8
SDS	31,2	1,9	21,4	3,9
MMM	-	6,4	0	9,4
SDM	21,4	13,1	19,5	19,0
MDM	-	18,8	2,7	15,7
SDD	27,6	11,9	31,5	12,6
MDD	7,5	26,8	6,5	15,3
DDD	5,1	14,8	7,6	8,0

S = saturado (P, E, A, y B); M = monoeno (O); D = Dieno (L); donde P = Palmítico; E = Esteárico; O = Oleico; L = Linoleico; A = Aráquico; B = Behénico.

Los TAG fueron analizados utilizando "Cromatografía Gas Líquido" (GLC) de acuerdo con las técnicas esbozadas en Carelli, A.A. y A. cert. Comparative Study of the Determination of Triacylglycerol in Vegetable Oils using Chromatographic Techniques, *J. Chromatogr.*, 630:213-222 (1.993).

Como se ha observado en el Ejemplo 3 se produjo un híbrido de CAS-3 y CAS-4 (cualquiera puede ser la planta femenina), que tenía un elevado nivel de ácido esteárico. La presente invención tiene preferiblemente al menos más contenido de ácido esteárico que de palmítico. Las semillas de girasol que producen aceites con niveles de ácido esteárico de al menos alrededor de 22% y superiores funcionan bien. Los niveles de 26% y superiores parecen mejores y el nivel de ácido esteárico por encima de 28% con los TAG deseados proporciona grasas de tipo bastante sólido a aproximadamente 22,22 grados centígrados (aproximadamente la temperatura ambiente). El cruce de CAS-3 y CAS-4 dio como resultado la selección de CAS-29 que tenía un TAG seleccionado, la línea derivada indirectamente por medio de reelección de CAS-3 dio como resultado una composición TAG de CAS-30. CAS-3 cruzado con una línea con niveles elevados de aceite palmítico dio como resultado CAS-31. Estos tipos de aceites que comprenden los Tag mejorados que son incluso más útiles para elaborar untables y margarina y productos que a la temperatura ambiente no son totalmente líquidos debido a que el nivel de ácido esteárico se encuentra en un intervalo de 30%. Estas plantas mejoradas producidas por medio de las etapas de acceso al material de girasol tienen la semilla de CAS-3 o CAS-4 o una semilla similar con el rasgo de elevado contenido de ácido esteárico como al menos un ancestro y cruzamiento de la planta desarrollada a partir de tales semillas con otro material de girasol diferente cuando se forma una planta de girasol híbrida. Después el método puede incluir la etapa de someter a ensayo el Tag o el aceite o alternativamente la primera etapa de evaluación del contenido de ácido graso o una parte del contenido de ácido graso del aceite. Después plantar las semillas seleccionadas para formar nuevas líneas y cruzar esas líneas entre sí o alternativamente retrocruzar con el parental o uno de su progenie. Adicionalmente, se pueden emplear reservas de reproducción para aumentar la variedad de rasgos. El material resultante se selecciona para que tenga el elevado contenido de ácido esteárico y el perfil de tag deseados.

Este perfil de tag utilizado para la selección puede ser un número de tipos de Tag tal como SMS y SDS o puede ser simplemente un tipo de Tag tal como SMS o DDD o similar. No obstante, de acuerdo con la presente invención el TAG preferido para la selección es SMS y SMM. Esto es particularmente cierto ya que existen métodos de elaboración para la separación de los tipos de Tag a menudo a un coste relativamente bajo. La separación permite extraer una porción del aceite que se va a extraer para su uso en un producto untable como manteca de cacao y otra porción del aceite que se va a emplear en un producto de tipo lubricante o un producto de tipo no semi-sólido líquido tal como aceite para cocinar. Posiblemente el ensayo adicional y la selección de plantas por medio de generaciones adicionales podrían reducir los niveles de SMM del TAG. Alternativamente, si el TAG SMS y SDS es la porción útil, el TAG podría ser separado por medio de procedimientos con calor o frío.

ES 2 309 158 T3

La Tabla 5 muestra CAS-30 y el TAG mejorado de los híbridos elaborados con CAS-3. Cada uno de estos muestra TAG de híbridos o líneas con elevado contenido de ácido esteárico que tienen niveles de SMS y SMM dentro del alcance de la invención.

5

TABLA 5

Composición de triacilgliceroles (%) de algunas líneas de mutantes CAS-3 o derivados de cruces de CAS-3 y CAS-4, CAS-4 y/o CAS-3 y elevado contenido de ácido palmítico

10

	CAS-29	CAS-30	CAS-31
POP	0,4	0,3	0,5
PLP	0,8	1,0	1,0
POE	3,3	2,0	3,1
POO	0,8	0,5	0,7
PLE	7,1	8,0	8,1
POL	3,4	3,0	3,4
PLL	3,5	5,0	4,2
EOE	6,5	3,7	5,6
EOO	3,8	2,3	3,0
ELE	14,5	14,4	15,3
EOL	15,7	11,9	13,5
OOL	2,2	1,4	1,4
ELL	19,2	26,2	21,2
OLL	4,9	5,2	3,9
LLL	3,3	5,9	3,6
EOA	1,2	0,8	1,1
OOA	0,3	0,1	
ELA	1,8	1,8	2,1
OLA	1,2	0,9	1,2
LLA	1,3	1,5	1,3
EOB	1,0	0,6	1,3
OOB			0,3
ELB	1,3	1,1	1,2
OLB	1,3	1,0	1,2
LLB	1,2	1,5	1,2

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

P = Palmítico; E = Esteárico; O = Oleico; L = Linoleico; A = Aráquico; B = Behénico.

65

ES 2 309 158 T3

TABLA 6

Tipos de TAG de líneas mutantes

	CAS-29	CAS-30	CAS-31
SMS	12,4	7,4	11,6
SMM	4,9	2,8	4,0
SDS	25,5	26,4	27,8
SDM	21,6	16,7	19,3
MDM	2,2	1,4	1,4
SDD	25,2	34,2	28,4
MDD	4,9	5,2	3,9
DDD	3,3	5,9	3,6

Utilizando los símbolos de los TAG S = saturado (P, E, A, y B); M = monoeno (O); D = Dieno (L); donde P = Palmítico; E = Esteárico; O = Oleico; L = Linoleico; A = Aráquico; B = Behénico.

No solamente los híbridos, las variedades y los productos endogámicos elaborados a partir de ellos tienen mejores perfiles Tag para los productos semi-sólidos saludables elaborados con aceites; si no que también tienen más ácido esteárico saludable en el contenido de aceite que CAS-3 y CAS-4. La composición de ácidos grasos mejorada de la progenie mejorada se muestra más abajo. Estas mejoras deben hacer el producto incluso más útil como semi-sólido sin requerir un tratamiento químico mucho menos saludable antes de ser empleado en productos alimenticios, o productos cosméticos o similares.

TABLA 7

Composición de Ácidos Grasos

	CAS-29	CAS-30	CAS-31
P	7,8	8,1	8,6
E	30,8	30,9	32,0
O	19,4	12,9	16,2
L	38,0	44,0	38,7
A	1,9	2,0	2,1
B	2,2	2,2	2,7

De este modo el TAG del aceite preferido tiene niveles elevados de ácido graso esteárico y un TAG con un SMS incrementado en comparación con el aceite de girasol normal de tipo salvaje y un SMM preferiblemente por debajo de 25% y más preferiblemente en o por debajo de 13% e incluso más preferido en o por debajo del nivel de tipo salvaje (girasol normal).

La presente invención puede ser empleada para desarrollar líneas, variedades de girasol de polinización abierta o girasoles híbridos. Estas plantas de girasol se pueden utilizar para producir nuevas líneas endogámicas mediante autopolinización sucesiva y selección o mediante retrocruzamiento sucesivo. Una línea convencional lleva preferiblemente tres o más generaciones de autopolinización hasta que las líneas son fijadas o presentan una reproducción verdadera.

Una vez que las líneas son líneas fijadas se pueden emplear para formar híbridos. Los híbridos a menudo emplean un sistema de esterilidad masculina citoplásmica (CMS). Una línea se cruza muy a menudo con germoplasma CMS tal como CMS HA89 (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). El germoplasma CMS se utiliza normalmente en un programa de reproducción con retrocruzamientos recurrentes con la línea que tiene el porcentaje de ácido esteárico deseado. La progenie CMS final es virtualmente idéntica al parental con un elevado contenido de ácido

ES 2 309 158 T3

esteárico recurrente excepto que la progenie CMS es masculina estéril y produce polen viable. Esta línea CMS se cruza después con el parental masculino que porta el determinante genético que codifica la fertilidad restauradora del citoplasma masculino estéril (la línea restauradora (R)). Este cruce produce un polen fértil que produce semillas de girasol híbridas. También se pueden emplear otros métodos de esterilidad, tal como gametocidas químicos.

5

La semilla híbrida se utiliza después para producir plantas que producen semillas que son “granos” y se muele para su aceite o harina o se utiliza con fines de producción adicionales.

10

De acuerdo con la invención se han obtenido plantas de girasol y semillas de las cuales se puede extraer dicho aceite por medio de un procedimiento biotecnológico. Este elevado contenido de ácido esteárico es un rasgo heredable y es independiente de las condiciones de crecimiento.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de girasol productora de semillas de girasol, cuyas semillas comprenden un aceite que tiene un contenido de ácido esteárico de al menos 22% en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite, y en cuyo aceite entre 6% y 12,4% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMM, donde la fórmula da de izquierda a derecha el primer, segundo y tercer ácido graso del triacilglicerol y S representa un ácido graso saturado y M representa un ácido graso monoéxico, obtenible proporcionando semillas de CAS-3 o CAS-4 o semillas similares con un rasgo de elevado contenido de ácido esteárico como al menos un ancestro, cruzando la planta desarrollada a partir de semejante semilla con otro material de girasol diferente, sometiendo a ensayo el TAG del aceite utilizando una Cromatografía Gas-Líquido y seleccionando el material que tiene un elevado contenido de ácido esteárico de al menos 22% en peso y el perfil de TAG deseado, donde al menos 6% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMM.
- 10
- 15 2. Una planta de girasol reivindicada en la reivindicación 1, donde el contenido de ácido esteárico es al menos 26% en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite.
- 20 3. Una planta de girasol reivindicada en la reivindicación 1 o 2, donde el contenido de ácido esteárico es al menos 28% en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite.
- 25 4. Una planta de girasol reivindicada en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde entre 7,4% y 12,4% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMS.
5. Una planta de girasol reivindicada en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde entre 11,6% y 12,4% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMS.
- 30 6. Una planta de girasol reivindicada en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde 12,4% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMS.
7. Una planta de girasol reivindicada en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde al menos 22% de las especies de triacilglicerol de dicho aceite tienen la fórmula general SDS, donde D representa un ácido graso di-insaturado.
- 35 8. Una planta de girasol reivindicada en la reivindicación 7, donde al menos 25% de las especies de triacilglicerol de dicho aceite tienen la fórmula general SDS, donde D representa un ácido graso di-insaturado.
9. Una planta de girasol reivindicada en la reivindicación 7 u 8, donde al menos 26% de las especies de triacilglicerol de dicho aceite tienen la fórmula general SDS, donde D representa un ácido graso di-insaturado.
- 40 10. Una planta de girasol y sus partes reivindicada en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que contiene al menos un transgén.
- 45 11. Una semilla de girasol producida por una planta de girasol reivindicada en una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Aceite de girasol que tiene un contenido de ácido esteárico de al menos 22% en peso con respecto a la cantidad total de ácido graso del aceite, y en cuyo aceite entre 6% y 12,4% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMS y no más de 5,0% de las especies de triacilglicerol tienen la fórmula general SMM.
- 50 13. Un aceite de girasol reivindicado en la reivindicación 12, que es extraído directamente sin tratamiento adicional.

55

60

65