

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 619**

51 Int. Cl.:

C07K 14/405 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2009 E 09741129 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2337791**

54 Título: **Utilización de desaturasas de ácidos grasos de Hemiselmis spp**

30 Prioridad:

14.10.2008 US 105316 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.12.2013

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Blvd.
St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**URSIN, VIRGINIA;
FROMAN, BYRON;
SCREEN, STEVEN y
LEHMAN, LORI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 432 619 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

Utilización de desaturasas de ácidos grasos de *Hemiselmis* spp

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, a enzimas desaturasa que modulan el número y localización de dobles enlaces en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). En particular, la invención se refiere a la alteración de perfiles de ácidos grasos usando enzimas delta 5 desaturasa y ácidos nucleicos que codifican dichas enzimas desaturasa.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 Los productos principales de biosíntesis de ácidos grasos en la mayoría de los organismos son compuestos de 16 y 18 carbonos. La proporción relativa de longitudes de cadena y grado de insaturación de estos ácidos grasos varía ampliamente entre especies. Los mamíferos, por ejemplo, producen ácidos grasos principalmente saturados y monoinsaturados, mientras que la mayoría de las plantas superiores producen ácidos grasos con uno, dos o tres dobles enlaces, comprendiendo los dos últimos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

- 15 Las dos familias principales de PUFA son los ácidos grasos omega 3 (también representados como ácidos grasos “n-3”), ejemplificados por el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, n-3) y los ácidos grasos omega-6 (también representados como ácidos grasos “n-6”), ejemplificados por el ácido araquidónico (ARA, 20:4, n-6). Los PUFA son componentes importantes de la membrana plasmática de la célula y el tejido adiposo, en el que pueden encontrarse en formas tales como fosfolípidos y como triglicéridos, respectivamente. Los PUFA son necesarios para el desarrollo apropiado en mamíferos, particularmente en el cerebro infantil en desarrollo, y para la formación y reparación de tejidos. El ácido araquidónico es el principal precursor para la síntesis de eicosanoides, que incluyen leucotrienos, prostaglandinas, y tromboxanos, que también desempeñan un papel significativo en el proceso de inflamación.

- 25 Varios trastornos responden al tratamiento con ácidos grasos. Se ha mostrado que la complementación con PUFA reduce la tasa de reestenosis después de angioplastia. Las pruebas indican que los PUFA pueden estar implicados en el metabolismo del calcio, lo que sugiere que los PUFA pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de osteoporosis y de piedras en el tracto urinario o en el riñón. La mayoría de las pruebas para los beneficios para la salud se aplican a las grasas omega 3 de cadena larga, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6, n-3) que se encuentran en pescado y aceite de pescado.

- 30 Los PUFA, tales como ácido linoleico (LA, 18:2, Δ 9, 12) y ácido α -linolénico (ALA, 18:3, Δ 9, 12, 15), se consideran ácidos grasos esenciales en la dieta porque los mamíferos carecen de la capacidad para sintetizar estos ácidos. LA se produce a partir de ácido oleico (OA, 18:1, Δ 9) por una Δ 12-desaturasa mientras que ALA se produce a partir de LA por una Δ 15-desaturasa. Sin embargo, cuando se ingiere, los mamíferos tienen la capacidad de metabolizar LA y ALA para formar las familias n-6 y n-3 de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). En mamíferos, la formación de LC-PUFA está limitada en su velocidad por la etapa de desaturación Δ 6, que convierte LA a GLA y ALA a SDA. Se ha mostrado que muchas condiciones fisiológicas y patológicas reducen esta etapa metabólica aún más y, en consecuencia, la producción de LC-PUFA. Para superar la etapa de limitación de la velocidad y aumentar los niveles tisulares de EPA, se pueden consumir grandes cantidades de ALA. Como alternativa, evitando la desaturación Δ 6 mediante complementación dietética con EPA o DHA se pueden aliviar eficazmente muchas enfermedades patológicas asociadas con niveles bajos de PUFA. Sin embargo, como se expone en más detalle posteriormente, no son deseables las fuentes disponibles en la actualidad de PUFA.

- 45 Los PUFA de cadena larga principales importantes incluyen DHA y EPA, que se encuentran principalmente en diferentes tipos de aceite de pescado, y ARA, encontrado en hongos filamentosos tales como *Mortierella*. Para DHA, existen varias fuentes para producción comercial incluyendo una diversidad de organismos marinos, aceites obtenidos de peces marinos de agua fría y fracciones de yema de huevo. Sin embargo, hay varias desventajas asociadas con la producción comercial de PUFA de fuentes naturales. Las fuentes naturales de PUFA tienden a tener composiciones oleosas altamente heterogéneas. Los aceites obtenidos de estas fuentes pueden requerir por lo tanto purificación exhaustiva para separar uno o más PUFA deseados o para producir un aceite que esté enriquecido en uno o más PUFA.

- 50 Otras limitaciones naturales favorecen un enfoque nuevo para la producción de PUFA. El clima y la enfermedad pueden provocar fluctuación en los rendimientos tanto de fuentes de pescado como de otras marinas. La fermentación a gran escala de organismos tales como *Mortierella* es cara. Los tejidos animales naturales contienen bajas cantidades de ARN y son difíciles de procesar.

Sumario de la invención

- 55 Un aspecto de la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de desaturar una molécula de ácido graso en el carbono 5, seleccionándose dicha

secuencia de ácido nucleico de

- a) una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4;
- b) una secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3;
- c) una secuencia de ácido nucleico que hibrida con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 o un complemento de la misma, en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42 °C y codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5; y
- d) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con al menos 75% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5,

en el que la molécula polinucleotídica está unida operativamente a un promotor heterólogo. Estos ácidos nucleicos pueden usarse para transformar células o modificar la composición de ácidos grasos de una planta o el aceite producido por una planta. Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan secuencias polinucleotídicas aisladas de *Hemiselmis* spp. que tienen una actividad desaturasa única. En una realización particular de la invención, los polinucleótidos codifican un polipéptido que tiene al menos 75% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, incluyendo al menos 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 98% y 99% de identidad con esas secuencias. Los expertos en la materia reconocerán que, ya que estas secuencias están relacionadas, un polipéptido dado puede compartir simultáneamente el 75% o más identidad de secuencia con más de una de estas secuencias polipeptídicas. En ciertas realizaciones, una desaturasa de *Hemiselmis* spp. de la invención se define adicionalmente como una omega 3 $\Delta 5$ desaturasa (es decir, una desaturasa con una preferencia de sustrato de omega 3).

En otra realización particular se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4; (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3; (c) un polinucleótido que hibrida con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, o un complemento del mismo, en condiciones de SSC 5X, formamida 50% y 42 °C; (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido con al menos 75%, 85%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4; y e) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos uno de los motivos de aminoácidos: LeuPheGlyGlyAsnAspValSerValGlnTyrArgMetIle (LFGGNDVSVQYRMI) (SEC ID N°: 15); IleAlalleGlyMetSerGlnAlaSerlleGlyLeuAsnValGln (IAIGMSQASIGLNVQ) (SEC ID N°: 16); GlyAlaAspMetlleGlyGlyCysLysTyrLeuTrpLeuGln (GADMIGGCKYLWLQ) (SEC ID N°: 17); AlaSerSerThrAspProPhePheLeuPheHisAspTyrGlyLys (ASSTDPFFLF-HDYGK) (SEC ID N°: 18); LeuAlaMetTyrTrpAlaSerSerllePheAsnThrAsnValValThrLeuGlnHis (LAMYWASSIFNTNV-VTLQH) (SEC ID N°: 19); AsnSerTyrArgGluAlaHisArgProlleSerlle (NSYREAHRPISI) (SEC ID N°: 20); HisValTrpThrMetAlaValSerGluSerLeuThr (HVWTMAVSESLT) (SEC ID N°: 21); LeuAlalleProPheAlaLeuSerHisAsnPhe (LAIP-FALSHNF) (SEC ID N°: 22); o GlnProAlaValArgGluValCysLysLysHisGlyValAsnTyrVal (QPAVREVCKKHGVNYV) (SEC ID N°: 23).

En realizaciones particulares, el promotor es funcional en una célula procarionta o en una célula eucariota. En ciertas realizaciones, la célula eucariota en la que el promotor es funcional es una célula vegetal. En una realización adicional, el promotor es un promotor potenciado en semillas. Los ejemplos de promotores potenciados en semillas incluyen, pero sin limitación, el promotor USP88, el promotor 7S α , el promotor 7S α' , el promotor Arcelin-5, el promotor de napina y el promotor de oleosina. En otra realización más, la construcción de ADN comprende además al menos una secuencia polinucleotídica adicional que codifica una elongasa de ácido graso.

En otro aspecto más, la invención proporciona una célula huésped transformada con un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5 como se ha definido anteriormente. La célula huésped puede ser una célula vegetal, animal, fúngica o bacteriana. En una realización adicional, la célula huésped de la invención proporciona una célula huésped que muestra biosíntesis de ácidos grasos alterada en relación con una célula del mismo genotipo que la célula huésped pero que carece de la construcción de ADN. Por ejemplo, una célula huésped transformada de la invención puede comprender un nivel elevado de EPA en relación con el contenido de AA, tal como aproximadamente 2 o aproximadamente 3 veces más EPA que AA. En otro aspecto más, la célula huésped ha heredado la construcción de ADN de un progenitor de la célula. Como aproximadamente 2 o aproximadamente 3 veces más EPA que AA. En otro aspecto más, la célula huésped ha heredado la construcción de ADN de un progenitor de la célula.

En otro aspecto más, la invención proporciona una planta, una parte de planta o una descendencia de la planta transformada con un polinucleótido como se ha definido anteriormente. Puede definirse que dicha planta comprende metabolismo de ácidos grasos alterado en relación con una planta del mismo genotipo que carece de la construcción de ADN. En una realización, la invención proporciona una planta transgénica o parte de la misma que comprende una omega 3 $\Delta 5$ desaturasa (es decir, una desaturasa con una preferencia de sustrato por omega 3). En otro aspecto más, dicha planta puede comprender además al menos una secuencia polinucleotídica adicional que codifica una elongasa de ácidos grasos. En una realización, la planta se selecciona del grupo que consiste en canola, *Brassica campestris*, colza oleaginosa, colza, soja, crambe, mostaza, semilla de ricino, cacahuete, sésamo, semilla de algodón, linaza, cártamo, palma aceitera, lino, girasol, maíz, arroz, cebada, mijo, centeno, trigo, avena, alfalfa y sorgo. La invención también proporciona semillas de la planta de la invención, tales como una semilla que tiene un contenido de

ácidos grasos alterado en relación con la semilla que no comprende una construcción de ADN de la invención. Por ejemplo, una semilla de la invención puede comprender un nivel elevado de EPA en relación con el contenido de AA, tal como aproximadamente 2 o aproximadamente 3 veces más EPA que AA.

5 En particular se proporciona una células transformada, planta transgénica o parte de la misma que comprende una molécula polinucleotídica que codifica una $\Delta 5$ desaturasa de la invención unida operativamente a un promotor heterólogo y al menos una molécula polinucleotídica adicional que codifica una enzima desaturasa o elongasa de ácidos grasos. En ciertas realizaciones, una elongasa o desaturasa de ácidos grasos adicional puede ser una $\Delta 6$ desaturasa, una $\Delta 6$ elongasa (por ejemplo, $\Delta 6$ elongasa de *M alpina*), una $\Delta 18$ elongasa, una $\Delta 15$ desaturasa, una $\Delta 9$ elongasa, una $\Delta 8$ desaturasa, una $\Delta 17$ desaturasa (por ejemplo, $\Delta 17$ desaturasa de *Saprolegnia diclina*), una $\Delta 4$ desaturasa y/o un C20 elongasa. Por ejemplo, una $\Delta 15$ desaturasa puede ser $\Delta 15$ desaturasa de *Aspergillus nidulans*, la $\Delta 12/\Delta 15$ desaturasa de *Fusarium moniliforme*, la $\Delta 15$ desaturasa de *Arabidopsis thaliana* o la $\Delta 15$ desaturasa de *M. alpina*. En ciertas realizaciones, un $\Delta 6$ desaturasa puede ser una $\Delta 6$ desaturasa específica de omega 6 (por ejemplo, $\Delta 6$ desaturasa de *T. suecica*, o $\Delta 6$ desaturasa de *M alpina*) o una $\Delta 6$ desaturasa específica de omega 3 (por ejemplo, desaturasa $\Delta 6$ de *Primula juliae*). Algunos ejemplos de $\Delta 9$ elongasas incluyen, pero sin limitación, $\Delta 9$ elongasa de *Euglena gracilis* y la $\Delta 9$ elongasa de *Isochrysis galbana*. En algunas realizaciones, una $\Delta 8$ desaturasa puede ser una $\Delta 8$ desaturasa de *Tetrapleura pomquetensis* o la $\Delta 8$ desaturasa de *Euglena gracilis*. En una realización adicional más, la elongasa o desaturasa de ácidos grasos adicional está unida operativamente a un promotor potenciado en semillas.

20 Además se desvela un procedimiento para aumentar EPA en una célula o planta huésped. En una realización, el procedimiento para aumentar el contenido de EPA comprende expresar en la célula o planta huésped una $\Delta 5$ desaturasa de acuerdo con la invención y una $\Delta 6$ desaturasa (por ejemplo, una $\Delta 6$ desaturasa específica de omega 3). En realizaciones adicionales, un procedimiento para aumentar el contenido de EPA implica además expresar una $\Delta 15$ desaturasa en una célula o planta huésped. En otra realización, un procedimiento para aumentar el contenido de EPA en una planta comprende expresar en la célula o planta huésped una $\Delta 5$ desaturasa de acuerdo con la invención, una $\Delta 9$ elongasa, una $\Delta 8$ desaturasa y bien una $\Delta 15$ desaturasa o bien una $\Delta 17$ desaturasa.

30 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento de producción de un producto comercial tal como un alimento o pienso, que comprende las etapas de (a) obtener la planta transgénica como se ha definido anteriormente; y (b) producir el producto comercial a partir del tejido, semilla, fruto y/o aceite de esa planta transgénica. Por ejemplo, el producto comercial puede ser un alimento o composición alimentaria tal como aceite, ensilaje, sémola, grano, almidón, harina o proteína. Se define que la composición de alimento o pienso comprende una secuencia polinucleotídica detectable o un polipéptido detectable proporcionado por la invención. Adicionalmente, la invención proporciona composiciones de alimento humano y pienso animal que comprenden EPA, ARA o DHA (véase FIGURA 4).

35 Además se desvela un procedimiento para aumentar el valor nutricional de un producto comestible para consumo humano o animal, que comprende añadir plantas transformadas o partes de plantas, o derivados de las mismas proporcionados por la invención al producto comestible. En ciertas realizaciones, el producto es alimento humano y/o animal. El producto comestible puede ser también pienso animal y/o un complemento alimentario.

Breve descripción de las figuras

40 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

45 La **FIGURA 1** ilustra un alineamiento de aminoácidos de $\Delta 5$ desaturasas de *Hemiselmis rufescens* HrD5D (SEC ID N°: 4), *Hemiselmis virescens* Hvd5D (SEC ID N°: 2), *Pythium irregulare* PiD5D (SEC ID N°: 10), *Mortierella alpina* D5D (SEC ID N°: 11), *Thalassiosira pseudonana* TpD5D (SEC ID N°: 13), *Peridinium* sp. CCMP626 PD5D (SEC ID N°: 14) y la $\Delta 6$ desaturasa de *Mortierella alpina* D6D (SEC ID N°: 12).

La **FIGURA 2** ilustra un mapa del vector plasmídico pMON67056.

La **FIGURA 3** ilustra un mapa del vector plasmídico pMON104220.

La **FIGURA 4** ilustra un diagrama de ruta para la biosíntesis de PUFA.

Descripción detallada de la invención

50 La invención supera las limitaciones de la técnica anterior proporcionando procedimientos y composiciones para la creación de plantas con contenido de PUFA potenciado. La modificación del contenido de ácidos grasos de un organismo tal como una planta presenta muchas ventajas, incluyendo nutrición mejorada y beneficios para la salud para consumo humano y/o animal. La modificación del contenido de ácidos grasos puede usarse para conseguir niveles o perfiles beneficiosos de PUFA deseados en plantas, partes de plantas y productos de plantas, incluyendo

aceites de semillas vegetales. Por ejemplo, cuando se producen los PUFA deseados en el tejido de semilla de una planta, el aceite puede aislarse de las semillas dando como resultado típicamente un aceite alto en PUFA deseados o un aceite que tenga un contenido o perfil de ácidos grasos deseado, que a su vez puede usarse para proporcionar características beneficiosas en productos alimentarios y otros productos.

- 5 Diversos aspectos de la invención incluyen procedimientos y composiciones para la modificación del contenido de PUFA de una célula, por ejemplo, modificación del contenido de PUFA de una célula o célula vegetales. Las composiciones relacionadas con la invención incluyen nuevas secuencias polinucleotídicas aisladas, construcciones polinucleotídicas y plantas y/o partes de plantas transformadas por polinucleótidos de la invención. De acuerdo con la presente invención, el polinucleótido aislado puede codificar una $\Delta 5$ desaturasa de *Hemiselmis* ssp. Las células huésped pueden manipularse para expresar un polinucleótido que codifique un polipéptido o polipéptidos de $\Delta 5$ desaturasa que catalicen la desaturación de un ácido o ácidos grasos.

15 Las siguientes definiciones se proporcionan como una ayuda para entender la presente invención. Las expresiones “secuencia de ADN”, “secuencia de ácido nucleico”, “molécula de ácido nucleico”, “polinucleótido” y “segmento de ácido nucleico” se refieren a una estructura física que comprende una distribución ordenada de nucleótidos. El segmento de ADN, secuencia o secuencia de nucleótidos puede estar contenido dentro de una molécula o vector de nucleótidos mayor. Además, la distribución ordenada de los ácidos nucleicos en estas secuencias puede representarse en forma de una lista de secuencias, figura, tabla o medio electrónico.

20 Las expresiones “secuencia codificante”, “región codificante”, “secuencia estructural” y “secuencia de ácido nucleico estructural” se refieren a toda o un segmento de una secuencia de ADN, secuencia de ácido nucleico, molécula de ácido nucleico en la que los nucleótidos están dispuestos en una serie de tripletes que forman cada uno un codón. Cada codón codifica un aminoácido específico. Por lo tanto, la secuencia codificante, región codificante, secuencia estructural y secuencia de ácido nucleico estructural codifican una serie de aminoácidos que forman una proteína, polipéptido, motivo o secuencia peptídica. La secuencia codificante, región codificante, secuencia estructural y secuencia de ácido nucleico estructural puede estar contenida dentro de una molécula o vector de ácido nucleico mayor. Además, la disposición de los nucleótidos en estas secuencias puede representarse en forma de una lista de secuencias, figura, tabla o medio electrónico.

El término “ADNc” se refiere a un ADN bicatenario que es complementario de y deriva de ARNm.

30 “Desaturasa” se refiere a un polipéptido que puede desaturar o catalizar la formación de un doble enlace entre carbonos consecutivos de uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso mono o poliinsaturado o un precursor del mismo. Son de interés particular los polipéptidos que pueden catalizar la conversión de DGLA a ARA o ETA a EPA desaturando en el 5º carbono del extremo carboxilo de un ácido graso. Las consideraciones para elegir un polipéptido específico que tiene actividad desaturasa incluyen, pero sin limitación, el pH óptimo del polipéptido, si el polipéptido es una enzima que limita la velocidad o un componente de la misma, si la desaturasa usada es esencial para la síntesis de un PUFA deseado y/o si se requiere un cofactor por el polipéptido. El polipéptido expresado preferentemente tiene características que son compatibles con el ambiente bioquímico de su localización en la célula huésped. Por ejemplo, el polipéptido puede tener que competir por el sustrato o los sustratos.

40 “Elongasa” se refiere a un polipéptido que alarga los ácidos grasos añadiendo dos átomos de carbono al extremo de ácido carboxílico del ácido graso. Las consideraciones para elegir un polipéptido específico que tenga actividad elongasa incluyen, pero sin limitación, el pH óptimo del polipéptido, si el polipéptido es una enzima limitadora de la velocidad o un componente de la misma, si la elongasa usada es esencial para la síntesis de un PUFA deseado y/o si se requiere un cofactor por el polipéptido. El polipéptido expresado tiene preferentemente características que son compatibles con el ambiente bioquímico de su localización en la célula huésped. Por ejemplo, el polipéptido puede tener que competir por el sustrato o los sustratos.

45 “Expresión” se refiere al proceso por el que la información codificada en un gen se convierte en estructuras presentes y funcionales en la célula. Los genes expresados incluyen los que se transcriben a ARN y después se traducen a proteína y los que se transcriben a ARN pero no se traducen a proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ARN ribosómico).

50 Como se usa en el presente documento, “gen” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa un proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras precedentes (secuencias no codificantes 5’) y posteriores (secuencias no codificantes 3’) a la secuencia codificante. “Gen nativo” se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. “Gen quimérico” se refiere a cualquier gen que no sea un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la hallada en la naturaleza. Gen “endógeno” se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen “exógeno” o “transgén” se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma por un procedimiento de transformación. Un transgén incluye ADN genómico introducido por un procedimiento de transformación (por ejemplo, un ADN genómico ligado a su promotor activo).

“Heterólogo” se refiere a la relación entre dos o más secuencias de ácido nucleico o proteína que derivan de diferentes fuentes. Por ejemplo, un promotor es heterólogo con respecto a una secuencia codificante si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Además, una secuencia de ácido nucleico particular puede ser “heteróloga” con respecto a una célula u organismo en el que se inserta si no aparece de forma natural en esa célula u organismo particular.

“Similitud de secuencia” se refiere al nivel de similitud entre 2 o más secuencias de ácido nucleico o aminoácidos con respecto al porcentaje de la identidad posicional. El término “homología” se usa para referirse al concepto de propiedades funcionales similares entre diferentes ácidos nucleicos o proteínas, por ejemplo, debido al origen evolutivo compartido.

“Hibridación” se refiere a la capacidad de una primera cadena de ácido nucleico para unirse con una segunda cadena mediante formación de pares de bases por enlaces de hidrógeno cuando las cadenas de ácido nucleico tienen suficiente complementariedad de secuencia. Como se usa en el presente documento, se dice que una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si muestran complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas muestran “complementariedad completa” cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Por lo tanto se dice que dos cadenas de ácido nucleico tienen complementariedad suficiente cuando pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer hibridadas entre sí en condiciones apropiadas.

El término “hibridación” se refiere en general a la capacidad de las moléculas de ácido nucleico para unirse mediante formación de pares de cadenas de bases complementarias. Dicha hibridación puede producirse cuando las moléculas de ácido nucleico se ponen en contacto en condiciones apropiadas. “Hibrida específicamente” se refiere a la capacidad de dos moléculas de ácido nucleico para formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si muestran “complementariedad completa”, es decir, cada nucleótido en una molécula es complementario de su nucleótido compañero de formación de par de bases en otra molécula. Se dice que dos moléculas son “mínimamente complementarias” si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer hibridadas entre sí en al menos condiciones de “baja rigurosidad” convencionales. De forma similar, se dice que las moléculas son “complementarias” si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitirles permanecer hibridadas entre sí en condiciones de “alta rigurosidad” convencionales.

La “rigurosidad de hibridación” se refiere a condiciones para la formación de enlaces de hidrógeno entre moléculas de ácido nucleico. Las condiciones “altamente rigurosas” toleran pocos emparejamientos erróneos entre un ácido nucleico y una cadena diana. Dichas condiciones se conocen bien por los expertos habituales en la materia, y se prefieren para aplicaciones que requieren alta selectividad. Las condiciones rigurosas medias pueden comprender condiciones de sal relativamente baja y/o temperatura relativamente alta, tales como las proporcionadas por SSC 1X y 65 °C. La alta rigurosidad puede definirse por ejemplo como NaCl 0,02 M a 0,10 M y 50 °C a 70 °C; SSC 5X, formamida 50% y 42 °C; o SSC 0,2X y 65 °C. Los ejemplos específicos de dichas condiciones incluyen NaCl 0,02 M y 50 °C; NaCl 0,02 M y 60 °C; y NaCl 0,02 M y 70 °C. Se dice que las moléculas de ácido nucleico que hibridan con otras moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, al menos en condiciones de baja rigurosidad son “afines hibridables” de las otras moléculas de ácido nucleico. Se describen condiciones de baja rigurosidad y alta rigurosidad convencionales en el presente documento y en Sambrook y col., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) denominado en el presente documento Sambrook y col., 1989, y en Haymes y col., 1985. Son permisibles variaciones de complementariedad completa, siempre que dichas variaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria.

Pueden usarse condiciones de baja rigurosidad para seleccionar secuencias de ácido nucleico con menores identidades de secuencia con una secuencia de ácido nucleico diana. Se puede desear emplear condiciones tales como cloruro sódico de 0,15 M a 0,9 M, a temperaturas que varían de 20 °C a 55 °C. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para seleccionar secuencias de ácido nucleico con mayores grados de identidad con las secuencias de ácido nucleico desveladas (Sambrook y col., 1989). Las condiciones de alta rigurosidad típicamente implican hibridación de ácido nucleicos en SSC de 2X a 10X (diluido a partir de una solución madre de SSC 20X que contiene cloruro sódico 3 M y citrato sódico 0,3 M, pH 7,0 en agua destilada), solución de Denhardt 2,5X a 5X (diluida a partir de una solución madre 50X que contiene albúmina de suero bovino 1% (p/v), Ficoll 1% (p/v) y polivinilpirrolidona 1% (p/v) en agua destilada), ADN de esperma de pescado de 10 mg/ml a 100 mg/ml, y SDS de 0,02% (p/v) a 0,1% (p/v), con una incubación de 50 °C a 70 °C durante de varias horas a una noche. La hibridación generalmente se sigue de varias etapas de lavado. Las composiciones de lavado generalmente comprenden SSC de 0,5X a 10X, y SDS de 0,1% (p/v) a 0,5% (p/v) con una incubación de 15 minutos de 20 °C a 70 °C. Preferentemente, los segmentos de ácido nucleico permanecen hibridados después de lavar al menos una vez en SSC 0,1X a 65 °C.

La expresión “aislado” significa que se ha retirado de su ambiente natural, independientemente de su disposición posterior. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico “aislada” de arroz, tal como clonando a partir de una célula de arroz, permanece “aislada” cuando se inserta en el genoma de una célula de maíz.

La expresión “unido operativamente” se refiere a la disposición espacial de dos o más regiones de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico de modo que ejerzan sus efectos apropiados una con respecto a la otra. Por ejemplo,

una región promotora puede situarse en relación con una secuencia de ácido nucleico de modo que la transcripción de la secuencia de ácido nucleico se dirija por la región promotora. La región promotora y la secuencia de ácido nucleico están “unidas operativamente”.

5 “Cadena arriba” y “cadena abajo” son términos posicionales con referencia a la localización de una secuencia de nucleótidos y la dirección de transcripción o traducción de secuencias codificantes, que normalmente suceden en la dirección 5' a 3'.

10 Las expresiones “promotor” o “región promotora” se refieren a una secuencia de ácido nucleico habitualmente hallada cadena arriba (5') de una secuencia codificante, capaz de dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico en una molécula de ARN. El promotor o región promotora típicamente proporciona un sitio de reconocimiento para ARN polimerasa y los otros factores necesarios para inicio apropiado de la transcripción. Como se contempla en el presente documento, un promotor o región promotora incluye variaciones de promotores derivados insertando o suprimiendo regiones reguladoras y sometiendo el promotor a mutagénesis aleatoria o dirigida. La actividad o fuerza de un promotor puede medirse con respecto a las cantidades de ARN que produce, o la cantidad de acumulación de proteína en una célula o tejido, en relación con un segundo promotor que se mide de forma similar.

15 La expresión “secuencias no codificantes 3'” se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas cadena abajo de una secuencia codificante e incluye secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento de ARNm o la expresión génica. Estas se denominan habitualmente regiones no traducidas 3' o UTR 3'. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes 3' se ejemplifica por Ingelbrecht y col. (1989).

20 “Secuencia líder de traducción” o “secuencia no traducida 5'” o “UTR 5'” se refieren todos a una secuencia de nucleótidos localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La UTR 5' está presente en el ARNm completamente procesado cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La UTR 5' puede afectar al procesamiento del transcrito primario a ARNm, la estabilidad del ARNm o eficacia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de la traducción (Turner y Foster, 1995).

30 “Transcrito de ARN” se refiere al producto resultante de transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina el transcrito primario. Una secuencia de ARN derivada de procesamiento postranscripcional del transcrito primario se denomina el ARN maduro. El “ARN mensajero” (ARNm) se refiere al ARN que está sin intrones y que puede traducirse a polipéptido por la célula.

35 “Construcción de ADN” se refiere a los elementos genéticos heterólogos unidos operativamente entre sí que componen una molécula de ADN recombinante y pueden comprender elementos que proporcionan la expresión de una molécula polinucleotídica de ADN en una célula huésped y elementos que proporcionan mantenimiento de la construcción. Un casete de expresión de plantas comprende el enlace funcional de elementos genéticos que cuando se transfieren a una célula vegetal proporcionan expresión de un producto génico deseable.

40 “Vector recombinante” se refiere a cualquier agente por o en el que un ácido nucleico de interés se amplifica, expresa o almacena, tal como un plásmido, cósmido, virus, secuencia de replicación autónoma, fago o secuencia de nucleótidos de ADN o ARN monocatenaria lineal, monocatenaria circular, bicatenaria lineal o bicatenaria circular. El vector recombinante puede sintetizarse o derivar de cualquier fuente y tiene capacidad de integración genómica o replicación autónoma.

“Secuencia reguladora” se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada cadena arriba (5'), dentro, o cadena abajo (3') con respecto a una secuencia codificante, o un intrón, cuya presencia o ausencia afecta a la transcripción y expresión de la secuencia codificante.

45 “Sustancialmente homólogo” se refiere a dos secuencias que son al menos aproximadamente 90% idénticas en secuencia, como se mide por el algoritmo CLUSTAL W en, por ejemplo, DNASTar (DNASTar, Madison, WI).

50 “Sustancialmente purificado” se refiere a una molécula separada de sustancialmente todas las otras moléculas normalmente asociadas con ella en su estado nativo. Más preferentemente, una molécula sustancialmente purificada es la especie predominante presente en una preparación. Una molécula sustancialmente purificada puede estar en más del 60% sin, preferentemente 75% sin, más preferentemente 90% sin y más preferentemente 95% sin las otras moléculas (exclusivas de disolvente) presentes en la mezcla natural. No se pretende que la expresión “sustancialmente purificado” abarque moléculas presentes en su estado nativo. Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de la presente invención están sustancialmente purificados.

55 El término “transformación” se refiere a la introducción de ácido nucleico en un huésped receptor. El término “huésped” se refiere a células bacterianas, hongos, animales o células animales, plantas o semillas, o cualquier parte o tejido vegetal incluyendo células vegetales, protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

Como se usa en el presente documento, una “planta transgénica” es un planta que tiene introducido de forma estable en su genoma, por ejemplo, los genomas nuclear o de plastidios, un ácido nucleico exógeno.

El término “isogénico” como un término comparativo entre plantas o líneas vegetales que tienen o carecen de un transgén significa plantas o líneas que tienen los mismos o similares fondos genéticos, con la excepción del transgén en cuestión. Por ejemplo, las llamadas líneas hermanas que representan selecciones fenotípicamente similares o idénticas de la misma población F2 parental se consideran “isogénicas”. Cuando la descendencia de una planta transformante estable se cruza y se retrocruza con las plantas de la línea parental no transformada durante de 3 a 6 generaciones (o más) usando el parental no transformado como el parental recurrente, seleccionando a la vez el tipo (genotipo por análisis de marcador molecular, fenotipo por observación de campo o ambos) y el transgén, se considera que la línea transgénica resultante es altamente “isogénica” para su línea parental no transformada.

Se entiende que los términos “semillas”, “pepitas” y “grano” son equivalentes en su significado. El término grano se usa frecuentemente en la descripción de la semilla de una planta de maíz o arroz. En todas las plantas la semilla es el óvulo maduro que consiste en un recubrimiento de semilla, embrión, aleurona y un endospermo.

Ácidos nucleicos que codifican delta 5 desaturasas

La invención proporciona, en una realización, ácidos nucleicos nuevos que codifican delta 5 desaturasas de *Hemiselmis* spp. En una realización particular, los ácidos nucleicos se aíslan de *Hemiselmis virescens* cepa CCMP442 y *Hemiselmis rufescens* cepa CCMP439 (disponible de CCMP; Center for Culture of Marine Phytoplankton; West Boothbay Harbor, Maine, Estados Unidos). En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos comprenden SEC ID N°: 1 o 3. La invención también proporciona procedimientos para usar dichos ácidos nucleicos, incluyendo SEC ID N°: 1 y 3. En una realización, estas moléculas de ácido nucleico se usan en el contexto de la presente invención para alterar la composición de aceite de una semilla de una planta.

Dicho ácido nucleico puede amplificarse usando ADNc, ARNm o ADN genómico como un molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con las técnicas de amplificación de PCR™ convencionales. Como alternativa, se pueden sintetizar usando técnicas sintéticas convencionales, tales como un sintetizador de ADN automático. Los polinucleótidos que codifican delta 5 desaturasas deseadas pueden identificarse de diversas maneras. Como ejemplo, una fuente de las delta 5 desaturasas deseadas, por ejemplo una biblioteca de una especie de *Hemiselmis*, se explora con sondas detectables sintetizadas enzimática o químicamente, que pueden realizarse a partir de ADN, ARN o nucleótidos de origen no natural, o mezclas de los mismos. Las sondas pueden sintetizarse enzimáticamente a partir de polinucleótidos de delta 5 desaturasas conocidas para procedimientos de hibridación normales o de rigurosidad reducida. Las sondas oligonucleotídicas también pueden usarse para explorar fuentes y pueden basarse en secuencias de delta 5 desaturasas conocidas, incluyendo secuencias conservadas en delta 5 desaturasas conocidas, o en secuencias peptídicas obtenidas de la proteína purificada deseada. Las sondas oligonucleotídicas basadas en secuencias de aminoácidos pueden degradarse para abarcar la degeneración del código genético, o pueden desviarse a favor de los codones preferidos del organismo fuente. Los oligonucleótidos también pueden usarse como cebadores para PCR™ de ARNm transcrito de forma inversa a partir de una fuente conocida o sospechada; el producto de PCR™ puede ser el ADNc de longitud completa o puede usarse para generar una sonda para obtener el ADNc de longitud completa deseado. Como alternativa, una proteína deseada puede secuenciarse completamente y realizarse síntesis total de un ADN que codifique ese polipéptido.

Una vez que se ha aislado el ADNc o genómico deseado, este se puede secuenciar por procedimientos conocidos. Se reconoce en la técnica que dichos procedimientos están sujetos a errores, de modo que la secuenciación múltiple de la misma región es rutinaria y aún se espera que conduzca a tasas medibles de errores en la secuencia deducida resultante, particularmente en regiones que tengan dominios repetidos, estructura secundaria extensiva o composiciones de bases poco habituales, tales como regiones con alto contenido de bases GC. Cuando surgen discrepancias, puede volver a realizarse la secuenciación y pueden emplearse procedimientos especiales. Los procedimientos especiales pueden incluir alterar las condiciones de secuenciación usando: diferentes temperaturas; diferentes enzimas; proteínas que alteran la capacidad de los oligonucleótidos para formar estructuras de orden superior; nucleótidos alterados tales como ITP o dGTP metilado; diferentes composiciones de gel, por ejemplo añadir formamida; diferentes cebadores o cebadores localizados a diferentes distancias de la región problemática; o diferentes moldes tales como ADN monocatenarios. También puede emplearse secuenciación de ARNm.

Si se desea, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican delta 5 desaturasas pueden modificarse sin cambiar la secuencia de aminoácidos resultante de la proteína expresada de modo que las secuencias sean más propensas a expresión en huéspedes vegetales u otras células huésped. Una secuencia codificante puede ser un ADN artificial. Un ADN artificial, como se usa en el presente documento significa una molécula polinucleotídica de ADN que no es de origen natural. Las moléculas de ADN artificiales pueden diseñarse por una diversidad de procedimientos, tales como, procedimientos conocidos en la técnica que se basan en la sustitución del codón o los codones de un primer polinucleótido para crear un polinucleótido artificial equivalente, o incluso uno mejorado, de segunda generación, siendo este nuevo polinucleótido útil para la expresión potenciada en plantas transgénicas. El aspecto del diseño con frecuencia emplea una tabla de uso codónico producida compilando la frecuencia de la aparición de codones en una colección de secuencias codificantes aisladas de una planta, tipo de planta, familia o género. Otros aspectos del diseño incluyen reducir la aparición de señales de poliadenilación, sitios de corte y empalme de intrones,

o largos tramos de AT o GC de secuencia (Patente de Estados Unidos 5.500.365). Pueden realizarse secuencias codificantes de longitud completa o fragmentos de las mismas de ADN artificial usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Están dentro del alcance de la presente invención modificaciones de las secuencias de nucleótidos o elementos reguladores desvelados en el presente documento que mantienen las funciones contempladas en el presente documento. Dichas modificaciones incluyen inserciones, sustituciones y deleciones, y específicamente sustituciones que reflejan la degeneración del código genético.

Los inventores han aislado secuencias de ADN de *Hemiselmsis* spp que producen polipéptidos con actividad delta 5 desaturasa. Las secuencias que codifican las delta 5 desaturasas pueden expresarse en plantas transgénicas, microorganismos o animales para modificar el contenido de ácidos grasos. Otros polinucleótidos que son sustancialmente idénticos a los polinucleótidos de delta 5 desaturasa proporcionados en el presente documento, o que codifican polipéptidos que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos de delta 5 desaturasa, también pueden usarse. "Sustancialmente idéntico" se refiere a una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que muestra en orden de preferencia creciente al menos 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 98 o 99% de identidad con la secuencia polipeptídica de delta 5 desaturasa en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 o secuencias que codifican estos polipéptidos. Pueden llevarse a cabo comparaciones de polipéptidos o polinucleótidos usando software de análisis de secuencias, por ejemplo, el paquete de software de Análisis de Secuencia del Paquete de Wisconsin GCG (Accelrys, San Diego, CA) y MEGAlign (DNASStar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715). Dicho software empareja secuencias similares asignando grados de similitud o identidad.

Construcciones de ADN

La invención proporciona construcciones de ADN que comprenden un promotor heterólogo unido operativamente a un ácido nucleico descrito en el presente documento. La selección de promotores, por ejemplo, promotores que pueden describirse que se expresan fuertemente, que se expresan débilmente, que se expresan de manera inducida, que se expresan de manera potenciada en tejido (es decir, que se expresan de manera específica o preferencial en un tejido), que se expresan de manera potenciada en órganos (es decir, que se expresan de manera específica o preferencial en un órgano) y que se expresan de manera potenciada en cuanto al desarrollo (es decir, que se expresan de manera específica o preferencial durante una fase (o fases) particular del desarrollo), se encuentra dentro de la experiencia en la técnica. De manera similar, la combinación de una molécula de ácido nucleico, como se ha descrito anteriormente, con un promotor también se encuentra dentro de la experiencia en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001).

Los promotores para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, promotores que funcionan en bacterias, bacteriófagos, hongos o células vegetales. Son promotores útiles para la expresión bacteriana los promotores *lacZ*, *Sp6*, *T7*, *T5* o *g1cC* de *E. coli*. Los promotores útiles para hongos incluyen gall de *Saccharomyces cerevisiae* (West y col., 1984), *nmt1* de *Saccharomyces pombe* (Maundrell, 1990), *ccg-1* de *Neurospora crassa* (Freitag y Selker, 2005) y *AUG1* de *Pichia methanolica* (Invitrogen). Los promotores útiles para células vegetales incluyen el promotor gamma zeína Z27 (véase, por ejemplo, Prem Das y col., 1991), promotor de oleosina L3 (Patente de Estados Unidos N° 6.433.252, Kriz y col.), promotor PER1 de cebada (Stacey y col., 1996), promotor 35S de CaMV (Patente de Estados Unidos N° 5.530.196 (Frale y col.)), promotor nos (Ebert y col., 1987), promotor actina del arroz (Patente de Estados Unidos N° 5.641.876) y promotor PEPCase (Hudspeth y col., 1989). El promotor del Virus del Mosaico de escrofularia (FMV) (Patente de Estados Unidos N° 6.051.753 (Comai y col.)), promotores de arcelina, E8 de tomate, patatina ubiquitina, mannopina sintasa (*mas*) y de tubulina son otros ejemplos de promotores útiles.

Existe una amplia diversidad de secuencias promotoras vegetales que pueden usarse para dirigir la expresión específica de tejido de polinucleótidos que codifican las delta 5 desaturasas y otras desaturasas en plantas transgénicas. De hecho, en realizaciones particulares de la invención, el promotor usado es un promotor específico de semilla. Los ejemplos de dichos promotores incluyen las regiones reguladoras 5' de genes tales como napina (Kridl y col., 1991), faseolina (Bustos y col., 1989), subunidad a' de β -conglucina de soja (P-Gm7S alfa', véase, por ejemplo, Chen y col., 1986), USP de *Vicia faba* (P-Vf.Usp, véanse, por ejemplo, las SEC ID Nos: 1, 2 y 3 de la Publicación de Patente de Estados Unidos 20030229918), el promotor de globulina (véase, por ejemplo, Belanger y Kriz, 1991) y la subunidad alfa de β -conglucina de soja (7S alfa) (Publicación de Patente de Estados Unidos 20030093828).

Otros promotores que se expresan de manera potenciada en semillas que se sabe que funcionan en maíz y en otras plantas incluyen los promotores para los siguientes genes: *Waxy* (almidón sintasa unida a gránulo), *Brittle* y *Shrunken 2* (ADP glucosa pirofosforilasa), *Shrunken 1* (sacarosa sintasa), enzimas ramificantes I y II, almidón sintasas, enzimas desramificantes, oleosinas, glutelinas y *Bet1* (capa de transferencia de endospermo basal). La invención también contempla otros promotores útiles en la realización práctica de la presente invención conocidos por un experto en la materia.

Además, pueden usarse potenciadores de transcripción o duplicados de potenciadores para aumentar la expresión de un promotor particular. Como ejemplos de dichos potenciadores se incluyen, pero sin limitación, el intrón 1 *Adh* (Callis y col., 1987), un intrón de actina de arroz (McElroy y col., 1991, Patente de Estados Unidos 5.641.876), intrón de sacarosa sintasa (Vasil y col., 1989), un intrón de HSP70 de maíz (denominado también *Zm.DnaK*) (Patente de Estados Unidos 5.424.412, Brown y col.) un elemento omega del TMV (Gallie y col., 1999), el potenciador 35S del CaMV (Patentes de Estados Unidos 5.359.142 y 5.196.525, McPherson y col.) o un potenciador de octopina sintasa

(Patente de Estados Unidos 5.290.924, Last y col.). Como la secuencia de ADN entre el sitio de inicio de la transcripción y el comienzo de la secuencia codificante, es decir, la región líder no traducida, puede influir en la expresión génica, también puede ser deseable emplear una secuencia líder particular. Puede emplearse cualquier secuencia líder disponible para un experto en la materia. Las secuencias líder preferidas dirigen niveles óptimos de expresión del gen unido, por ejemplo, aumentando o manteniendo la estabilidad del ARNm y/o impidiendo un inicio inapropiado de la traducción (Joshi, 1987). La elección de dichas secuencias se realiza a criterio de los expertos en la materia.

Las construcciones de ADN de la invención pueden incluir una secuencia cerca del extremo 3' del casete que actúa como una señal para terminar la transcripción a partir de un ácido nucleico heterólogo y que dirige la poliadenilación del ARNm resultante. Estas normalmente se denominan regiones 3' no traducidas o 3' UTR (por las siglas en inglés *Untranslated Regions*). Algunos elementos en 3' que pueden actuar como señales de terminación de la transcripción incluyen los del gen de la *nopalina sintasa (nos)* de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan y col., 1983), una región 3' no traducida de napina (Kridl y col., 1991), una región 3' no traducida de globulina (Belanger y Kriz, 1991), la región 3' no traducida del gen *Adr12* de soja (auxina regulada negativamente) (Wang y col., documento WO200250295) o uno de un gen de zeína, tal como Z27 (Lopes y col., 1995). En los vectores de la invención también pueden usarse otros elementos 3' reguladores conocidos en la materia.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico que puede clonarse en cualquier vector adecuado y que puede usarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. La selección de vectores y procedimientos para construirlos son comúnmente conocidos en la materia y se describen en referencias técnicas generales (véase, en general, Recombinant DNA Part D; *Meth. Enzymol.* 153: 1-622, 1987). El vector comprenderá preferentemente secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y de terminación de la transcripción y traducción, que son específicos del tipo de huésped (por ejemplo, bacterias, hongos o planta) en el que va a introducirse el vector, según sea apropiado y teniendo en cuenta si el vector es ADN o ARN.

Pueden prepararse vectores que sean circulares o lineales que contengan una secuencia completa de ácido nucleico, como se ha descrito anteriormente, o una parte de la misma ligada a un sistema de replicación funcional en una célula huésped procarionota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivar de ColE1, plásmido de 2 μ m, fago λ , fago filamentoso f1 y especies de *Agrobacterium* (por ejemplo, *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*).

Además del sistema de replicación y de la secuencia de ácido nucleico insertada, el vector puede incluir uno o más genes marcadores que permiten la selección de huéspedes transformados o transfectados. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocida, tal como resistencia a antibióticos, metales pesados y herbicidas y complementación en un huésped auxotrófico para proporcionar prototofia.

La invención proporciona células huésped que comprenden una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, opcionalmente en forma de un vector. Como huéspedes adecuados se incluyen células vegetales, bacterianas y fúngicas, incluyendo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*. Como huéspedes de *E. coli* se incluyen TB-1, TG-2, DH5 α , XBlue MRF' (Stratagene, Austin, TX), SA2821, Y1090 y TG02. Como células vegetales se incluyen, pero sin limitación, soja, *Brassica campestris*, cáñola, colza, nabina, crambe, mostaza, semilla de ricino, cacahuate, sésamo, semilla de algodón, semilla de lino, cártamo, palma de aceite, linaza, girasol, alfalfa, maíz, trigo, cebada, avena, centeno, mijo, sorgo y arroz.

La expresión en una célula huésped puede realizarse de una manera transitoria o estable. La expresión transitoria puede producirse a partir de construcciones introducidas que contienen señales de expresión funcionales en la célula huésped, pero construcciones no replican y raramente se integran en la célula huésped, o en las que la célula huésped no es proliferante. La expresión transitoria también puede realizarse induciendo la actividad de un promotor regulable unido operativamente al gen de interés, aunque dichos sistemas inducibles frecuentemente presentan un bajo nivel de expresión basal. La expresión estable puede realizarse introduciendo una construcción que puede integrarse en el genoma del huésped o que replica de manera autónoma en la célula huésped. La expresión estable del gen de interés puede seleccionarse a través del uso de un marcador de selección localizado en o transfectado con la construcción de expresión, seguido de selección de células que expresan el marcador. Cuando resulta una expresión estable de la integración, la integración de las construcciones puede producirse al azar dentro del genoma del huésped o puede dirigirse mediante el uso de construcciones que contienen regiones de homología con el genoma del huésped suficiente para dirigir la recombinación con el locus del huésped. Cuando las construcciones se dirigen a un locus endógeno, dicho locus puede proporcionar todas o algunas de las regiones reguladoras transcripcionales y traduccionales.

La expresión en una célula huésped puede implicar técnicas de fermentación conocidas por un experto en la materia. La célula huésped fermentada puede ser de un procarionota, tal como *Escherichia coli*, o de un eucariota, tal como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o *Neurospora crassa*, un hongo filamentoso. Como ejemplos de producción de PUFA mediante fermentación se incluyen *Mortierella* (Patente de Estados Unidos 6.319.698) y *Thraustochytriales* (Patente de Estados Unidos 6.451.567).

Se contempla que pueda introducirse más de un gen y propagarse en una célula huésped a través del uso de

vectores de expresión episomales o integrados. Cuando se expresan dos o más genes de vectores de replicación distintos, es deseable que cada vector tenga un medio de replicación diferente. Cada construcción introducida, ya sea integrada o no, debe tener un medio de selección diferente y debe carecer de homología con las otras construcciones para conservar la expresión estable e impedir la reagrupación de elementos entre construcciones. Las elecciones sensatas de regiones reguladoras, medios de selección y procedimiento de propagación de la construcción introducida pueden determinarse experimentalmente de tal manera que todos los polinucleótidos introducidos se expresen a niveles necesarios para proporcionar la síntesis de los productos deseados.

Polipéptidos

La invención proporciona delta 5 desaturasas codificadas por moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. Las delta 5 desaturasas son enzimas que pueden desaturar o catalizar la formación de un doble enlace entre carbonos consecutivos en la posición 5 de uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso mono- o poli-insaturado o un precursor del mismo. El polipéptido puede comprender D-aminoácidos, L-aminoácidos o una mezcla de D- y L-aminoácidos.

Pueden prepararse modificaciones de la secuencia de aminoácidos natural para producir polipéptidos variantes mediante una diversidad de medios conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, de manera conveniente, en los polipéptidos pueden introducirse sustituciones de aminoácidos cambiando la secuencia de la molécula de ácido nucleico en el momento de la síntesis. También pueden introducirse mutaciones específicas de sitio mediante ligamiento en un vector de expresión de un oligonucleótido sintetizado que comprende la secuencia modificada. Como alternativa, pueden usarse procedimientos de mutagénesis específica de sitio, dirigida a oligonucleótido, tales como los descritos en Walder y col. (1986); Bauer y col. (1985); y en las Patentes de Estados Unidos 4.518.584 y 4.737.462.

Dentro de la experiencia del experto habitual se encuentra seleccionar aminoácidos que se producen de manera sintética y de manera natural que efectúan sustituciones conservativas o neutras para cualquier aminoácido particular que se produce de manera natural. El experto en la técnica habitual considerará, de manera deseable, el contexto en el que se realiza cualquier sustitución de aminoácido particular, además de tener en cuenta la hidrofobicidad o polaridad de la cadena lateral, el tamaño general de la cadena lateral y el valor de pK de cadenas laterales con carácter ácido o básico en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, lisina, arginina e histidina se sustituyen frecuentemente, de manera adecuada, entre sí y más frecuentemente arginina e histidina. Tal como se conoce en la técnica, esto se debe a que los tres aminoácidos tienen cadenas laterales básicas, mientras que el valor de pK para las cadenas laterales de lisina y arginina están muchos más próximos entre sí (aproximadamente 10 y 12) en comparación con histidina (aproximadamente 6). De manera similar, glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina se sustituyen con frecuencia adecuadamente entre sí, con la condición de que la glicina frecuentemente no se sustituye por los otros miembros del grupo. Esto se debe a que cada uno de estos aminoácidos es relativamente hidrófobo cuando se incorpora en un polipéptido, pero la falta de la glicina de un carbono α permite a los ángulos de rotación phi y psi (alrededor del carbono α) una libertad conformacional tal que los restos de glicina pueden provocar cambios en la conformación o estructura secundaria que no se producen con frecuencia cuando los otros aminoácidos se sustituyen entre sí. Otros grupos de aminoácidos frecuentemente sustituidos de manera adecuada entre sí incluyen, pero sin limitación, el grupo que consiste en ácidos glutámicos y aspárticos; el grupo que consiste en fenilalanina, tirosina y triptófano; y el grupo que consiste en serina, treonina y, opcionalmente, tirosina. Adicionalmente, el experto habitual en la técnica puede agrupar fácilmente aminoácidos sintéticos con aminoácidos que se producen de manera natural.

Si se desea, los polipéptidos pueden modificarse, por ejemplo, por glucosilación, amidación, carboxilación o fosforilación, o mediante la creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, en particular ésteres C-terminales y derivados de N-acilo de los polipéptidos de la invención. Los polipéptidos también pueden modificarse para crear derivados de proteína mediante la formación de complejos covalentes o no covalentes con otros restos de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Pueden prepararse complejos unidos covalentemente mediante la unión de restos químicos con grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácidos que comprenden los polipéptidos, o en los extremos N o C. De manera deseable, dichas modificaciones y conjugaciones no afectan de manera adversa a la actividad de los polipéptidos (y variantes de los mismos). Aunque dichas modificaciones y conjugaciones pueden tener mayor o menor actividad, la actividad de manera deseable no se ve anulada y es característica del polipéptido inalterado.

Los polipéptidos (y fragmentos, variantes y proteínas de fusión) pueden prepararse mediante cualquiera de las diversas técnicas convencionales. El polipéptido puede aislarse o purificarse sustancialmente de una fuente de origen natural o de una fuente recombinante. Por ejemplo, en el caso de proteínas recombinantes, un fragmento de ADN que codifica una proteína deseada puede subclonarse en un vector apropiado usando técnicas genéticas moleculares bien conocidas (véase, por ejemplo, Maniatis y col, 1989 y otras referencias citadas en el presente documento en la sección "EJEMPLOS"). El fragmento puede transcribirse y traducirse posteriormente la proteína *in vitro*. También pueden emplearse kits disponibles en el comercio (tales como, por ejemplo, los fabricados por Clontech, Mountain View, CA; Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, IL; e Invitrogen, Carlsbad, CA). Opcionalmente, en la manipulación de ácidos nucleicos, puede emplearse la reacción en cadena de la polimerasa.

Los polipéptidos pueden sintetizarse usando un sintetizador de péptidos automático de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Como alternativa, el polipéptido (y fragmentos, variantes y proteínas de fusión) puede sintetizarse usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales bien conocidas por los expertos habituales en la técnica (por ejemplo, como se resumen en Bodanszky, 1984). En particular, el polipéptido puede sintetizarse usando el procedimiento de síntesis en fase sólida (véase, por ejemplo, Merrifield, 1963; Barany y col., 1987 y la Patente de Estados Unidos 5.424.398). Si se desea, esto puede realizarse usando un sintetizador de péptidos automático. La eliminación de los grupos bloqueantes de aminoácido t-butiloxicarbonilo (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y la separación de la proteína de la resina puede conseguirse, por ejemplo, mediante tratamiento con ácido a temperatura reducida. La mezcla que contiene polipéptido puede después extraerse, por ejemplo, con éter dietílico, para eliminar compuestos orgánicos no peptídicos, y la proteína sintetizada puede extraerse del polvo de resina (por ejemplo, con ácido acético aproximadamente al 25% p/v). Después de la síntesis del polipéptido, opcionalmente, puede realizarse purificación adicional (por ejemplo, utilizando HPLC) para eliminar cualquier proteína incompleta, polipéptido, péptido o aminoácido libre. Puede realizarse un análisis de aminoácidos y/o de HPLC en el polipéptido sintetizado para validar su identidad. Para otras aplicaciones de acuerdo con la invención, puede ser preferible producir el polipéptido como parte de una proteína de fusión más grande, bien mediante conjugación química o bien a través de medios genéticos conocidos en la técnica. En este sentido, la presente invención también proporciona una proteína de fusión que comprende el polipéptido (o fragmento del mismo) o variante del mismo y uno o más polipéptidos/proteína (s) distintos que tienen cualquiera de las propiedades o funciones efectoras deseadas.

Los ensayos para la producción e identificación de proteínas específicas se basan en diversas propiedades fisicoquímicas, estructurales, funcionales u otras propiedades de las proteínas. Propiedades fisicoquímicas o estructurales exclusivas permiten a las proteínas separarse e identificarse mediante procedimientos electroforéticos, tales como electroforesis en gel natural o isoelectroenfoque, o mediante técnicas cromatográficas tales como cromatografía de intercambio iónico o de exclusión en gel. Las estructuras exclusivas de proteínas individuales ofrecen oportunidades para el uso de anticuerpos específicos para detectar su presencia en formatos tales como un ensayo ELISA. Para conseguir una especificidad incluso mayor pueden usarse combinaciones de estrategias tal como la inmunotransferencia de Western en la que se usan anticuerpos para localizar productos génicos individuales que se han separado mediante técnicas electroforéticas. Para confirmar de manera absoluta la identidad del producto de interés pueden usarse técnicas adicionales tal como la evaluación mediante secuenciación de aminoácidos tras la purificación. Aunque éstas se encuentran entre las más comunes, también pueden usarse otros procedimientos.

Los procedimientos de ensayo pueden identificar la expresión de proteínas mediante su funcionalidad, particularmente cuando la proteína expresada es una enzima que puede catalizar reacciones químicas en las que intervienen sustratos y productos específicos. Por ejemplo, en extractos de plantas, estas reacciones pueden medirse proporcionando y cuantificando la pérdida de sustratos o la generación de productos de las reacciones mediante procedimientos físicos y/o químicos.

En muchos casos, la expresión de un producto génico se determina evaluando los resultados fenotípicos de su expresión. Dichas evaluaciones pueden ser simplemente como observaciones visuales o pueden implicar ensayos. Dichos ensayos pueden adoptar muchas formas, tales como analizar cambios en la composición química, morfología o propiedades fisiológicas de la planta. La composición química puede modificarse por expresión de genes que codifican enzimas o proteínas de reserva que cambian la composición de aminoácidos y estos cambios pueden detectarse por análisis de aminoácidos, o por enzimas que cambian la cantidad del almidón, que pueden analizarse por espectrometría de reflectancia en el infrarrojo cercano o por enzimas que cambian la composición de aceite, que pueden detectarse mediante cromatografía de gases. Los cambios morfológicos pueden incluir una mayor estatura o tallos más gruesos.

Las moléculas de ácido nucleico, construcciones de ADN y polipéptidos de la presente invención pueden usarse en procedimientos agrícolas y en diversos ensayos de exploración. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede usarse para expresar delta 5 desaturasa a través de un vector en una célula huésped, para detectar transcritos de ARNm que codifican delta 5 desaturasas en una muestra biológica, para detectar una modificación genética en un gen que codifica delta 5 desaturasa mediante una transferencia de Southern, para suprimir delta 5 desaturasas o para regular positivamente delta 5 desaturasas. Los polipéptidos pueden usarse para compensar deficiencias en las delta 5 desaturasas o para detectar la presencia de una delta 5 desaturasa mutada que tiene actividad reducida o ninguna en una planta, o para tratar niveles excesivos de sustratos, ya sean directos o indirectos, de las delta 5 desaturasas en una planta. Como alternativa, los polipéptidos pueden usarse para explorar agentes por la capacidad de modular su actividad. Los anticuerpos pueden usarse para detectar y aislar los polipéptidos respectivos así como la disminución de la disponibilidad de dichos polipéptidos *in vivo*.

Transformación de plantas

En una realización preferida de la invención, se produce una planta transgénica que expresa la proteína o proteínas deseadas. En la técnica se conocen diversos procedimientos para la introducción de una secuencia de polinucleótido deseada que codifica la proteína deseada en células de plantas incluyendo: (1) procedimientos físicos tales como microinyección, electroporación y administración mediada por micropartículas (biolística o tecnología de pistola de genes); (2) administración mediada por virus; o (3) transformación mediada por *Rhizobium*, tal como transformación mediada por *Agrobacterium*.

Los procedimientos más comúnmente utilizados para la transformación de células de plantas son el proceso de transferencia de ADN mediado por *Agrobacterium* y la biolística o el proceso mediado por bombardeo de micropartículas con microproyectil. Típicamente, se desea la transformación nuclear, pero cuando es deseable transformar específicamente plástidos, tales como cloroplastos o amiloplastos, los plástidos de las plantas pueden transformarse utilizando una administración del polinucleótido deseado mediada por micropartículas.

Mediante el uso de una bacteria del suelo modificada por ingeniería genética perteneciente al género *Agrobacterium*, se consigue la transformación mediada por *Agrobacterium*. Para la transferencia génica en plantas pueden usarse diversas cepas de tipo natural y desactivadas de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* que contienen plásmidos de Ti o Ri. La transferencia génica se realiza transfiriendo un ADN específico conocido como "ADN-T", que puede modificarse por ingeniería genética, para transportar cualquier parte deseada de ADN en muchas especies de plantas, como se ha explicado, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.265.638 de Bidney y col.

La transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium* implica varias etapas. La primera etapa, en la que el *Agrobacterium* virulento y las células de la planta se ponen inicialmente en contacto entre sí, generalmente se denomina "inoculación". La inoculación va preferentemente acompañada de algún procedimiento de lesión a algunas de las células de la planta, que libera constituyentes celulares de la planta, tales como alcohol cumarílico, sinapinato (que se reduce a acetosiringona), alcohol sinapílico y alcohol coniferílico, que activan factores de virulencia en el *Agrobacterium*. Después de la inoculación, se permite que el *Agrobacterium* y los tejidos/células de la planta crezcan juntos durante un periodo de varias horas a varios días o más en condiciones adecuadas para el crecimiento y la transferencia de ADN-T. Esta etapa se denomina "cocultivo". Después del cocultivo y la administración del ADN-T, las células de la planta se tratan con agentes bactericidas o bacteriostáticos para destruir el *Agrobacterium* que queda en contacto con el explante y/o en el recipiente que contiene el explante. Si esto se realiza en ausencia de cualquier agente selectivo para promover el crecimiento preferencial de las células vegetales transgénicas frente a no transgénicas, entonces esto se denomina típicamente etapa de "retardo". Si se realiza en presencia de presión selectiva que favorece las células vegetales transgénicas, entonces se denomina etapa de "selección". Cuando se usa "retardo", va seguido típicamente de una o más etapas de "selección".

Con respecto al bombardeo de micropartículas (Patente de Estados Unidos 5.550.318 (Adams y col.); Patente de Estados Unidos 5.538.880 (Lundquist y col.), Patente de Estados Unidos 5.610.042 (Chang y col.); y documento PCT WO 95/06128 (Adams y col.)), partículas microscópicas se revisten con ácidos nucleicos y se administran al interior de las células mediante una fuerza de propulsión. Como partículas a modo de ejemplo se incluyen las compuestas por tungsteno, platino y preferentemente oro.

Una realización ilustrativa de un procedimiento para administrar ADN en células vegetales por aceleración es el Sistema de Administración de Partículas de Biolistics® (BioRad, Hercules, CA), que puede usarse para propulsar partículas revestidas con ADN o células a través de un tamiz, tal como un tamiz de acero inoxidable o de NYTEX, sobre una superficie de filtro cubierta con células vegetales monocotiledóneas cultivadas en suspensión.

Las técnicas de bombardeo de micropartículas se aplican ampliamente y pueden usarse para transformar prácticamente cualquier especie vegetal. Como ejemplos de especies que se han transformado por bombardeo de micropartículas se incluyen especies monocotiledóneas tales como maíz (documento WO 95/06128 (Adams y col.)), cebada, trigo (Patente de Estados Unidos 5.563.055 (Townsend y col.)), arroz, avena, centeno, caña de azúcar y sorgo; así como diversas dicotiledóneas incluyendo tabaco, soja (Patente de Estados Unidos 5.322.783 (Tomes y col.)), girasol, cacahuete, algodón, tomate y legumbres en general (Patente de Estados Unidos 5.563.055 (Townsend y col.)).

Para seleccionar o clasificar células vegetales transformadas independientemente de la metodología de transformación, el ADN introducido en la célula contiene un gen que actúa en un tejido vegetal regenerable para producir un compuesto que confiere al tejido vegetal resistencia a un compuesto tóxico. Los genes de interés para su uso como marcador de selección, de exploración, o de clasificación incluirían, pero sin limitación, β -glucuronidasa (GUS), proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa (LUX), genes de tolerancia a antibióticos o a herbicidas. Como ejemplos de genes de resistencia a antibióticos se incluyen los genes de penicilina, kanamicina (y neomicina, G418, bleomicina); metotrexato (y trimetoprim); clorafenicol; kanamicina y tetraciclina. En la técnica se conocen moléculas de polinucleótido que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas, e incluyen, pero sin limitación, una molécula de polinucleótido que codifica la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que se describe en la Patente de Estados Unidos 5.627.061 (Barry, y col.), Patente de Estados Unidos 5.633.435 (Barry, y col.) y Patente de Estados Unidos 6.040.497 (Spencer, y col.) y *aroA* que se describe en la Patente de Estados Unidos 5.094.945

(Comai) para tolerancia a glifosato; una molécula de polinucleótido que codifica la bromoxinil nitrilasa (Bxn) que se describe en la Patente de Estados Unidos 4.810.648 (Duerrschnebel, y col.) para tolerancia a Bromoxinil; una molécula de polinucleótido que codifica la fitoeno desaturasa (*crtI*) que se describe en Misawa y col. (1993); Misawa y col. (1994) para tolerancia a norflurazón; una molécula de polinucleótido que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, aka ALS) que se describe en Sathasiivan y col. (1990) para tolerancia a herbicidas de sulfonilurea; y tanto el gen pat, que se describe en Wohlleben y col., (1988), como el gen bar, que se describe en DeBlock y col. (1987), cada uno de los cuales proporciona tolerancia a glufosinato y bialafós.

La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas de diversos explantes transformados están bien documentados en la técnica. Este proceso de regeneración y de crecimiento típicamente incluyen las etapas de seleccionar células transformadas y cultivar esas células individualizadas a través de etapas normales de desarrollo embrionario a través de la fase de plántula enraizada. Las semillas y embriones transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan después de esto en un medio de cultivo vegetal apropiado tal como tierra. Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que se han clasificado como positivas en un ensayo de exploración, pueden cultivarse en medios que soportan la regeneración de plantas. Las plántulas en desarrollo se transfieren a una mezcla de cultivo de plantas sin tierra, y se aclimatan antes de transferirlas a un invernadero o a una cámara de cultivo para su maduración.

La presente invención puede usarse con cualquier célula o tejido transformable. Por transformable, tal como se usa en el presente documento, se entiende una célula o tejido que es capaz de propagarse adicionalmente para dar lugar a una planta. Los expertos en la técnica reconocen que diversas células o tejidos vegetales pueden transformarse ya que después de la inserción de ADN exógeno y condiciones de cultivo apropiadas las células o los tejidos vegetales pueden formarse para dar una planta diferenciada. El tejido adecuado para estos fines puede incluir, pero sin limitación, embriones inmaduros, tejido escutelar, cultivos celulares en suspensión, inflorescencia inmadura, meristemo de brote, explantes nodulares, tejido de callo, tejido hipocótilo, cotiledones, raíces y hojas. La patente de Tomes y col. '783, citada anteriormente, describe un procedimiento de tratamiento con una citocina seguido de incubación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que células no diferenciadas en tejido nodular de cotiledón se diferencien en células meristemáticas y para permitir que las células entren en las fases entre G1 y las fases de división de desarrollo, que se afirma que mejora la sensibilidad de transformación.

De acuerdo con la presente invención, puede utilizarse cualquier medio de cultivo de plantas adecuado. Los medios adecuados incluyen, pero sin limitación, medios basados en MS (Murashige y Skoog, 1962) o medios basados en N6 (Chu y col., 1975) complementados con reguladores de crecimiento de plantas adicionales incluyendo, pero sin limitación, auxinas, citocininas, ABA y giberelinas. Los expertos en la técnica están familiarizados con una diversidad de medios de cultivo de tejidos, que cuando se complementan apropiadamente, dan soporte al crecimiento y desarrollo de tejido vegetal y son adecuados para la transformación y regeneración de plantas. Estos medios de cultivo de tejidos pueden adquirirse como una preparación comercial o prepararse y modificarse a medida. Los expertos en la técnica saben que los medios y complementos de medios, tales como nutrientes y reguladores del crecimiento, para su uso en la transformación y regeneración y otras condiciones de cultivo, tales como intensidad de la luz durante la incubación, el pH y las temperaturas de incubación, pueden optimizarse para la variedad particular de interés.

Después de que una construcción de ADN se incorpora de manera estable en plantas transgénicas y que se confirma que es operativa, puede introducirse en otras plantas de la misma especie u otra especie sexualmente compatible mediante cruzamiento sexual. Puede usarse cualquiera de las diversas técnicas de reproducción convencionales, dependiendo de las especies que vayan a cruzarse. Por lo tanto, la presente invención no solo abarca una planta directamente transformada o regenerada a partir de células que se han transformado de acuerdo con la presente invención, sino también la progenie de dichas plantas. Como se usa en el presente documento, el término "progenie" indica la descendencia de cualquier generación de una planta parental preparada de acuerdo con la presente invención, comprendiendo la progenie una construcción de ADN seleccionada preparada de acuerdo con la invención. "Cruzar" una planta para proporcionar una línea vegetal que tiene uno o más transgenes o alelos añadidos con respecto a una línea vegetal de partida, tal como se describe en el presente documento, se define como las técnicas que dan como resultado a una secuencia particular que se introduce en una línea vegetal mediante cruzamiento de una línea de partida con una línea vegetal donante que comprende un transgén o alelo de la invención. Para conseguir esto podrían realizarse, por ejemplo, las siguientes etapas: (a) plantar semillas de la primera (línea de partida) y segunda (línea vegetal donante que comprende un transgén o alelo deseado) plantas parentales; (b) hacer crecer las semillas de la primera y segunda plantas parentales para dar plantas con flores; (c) polinizar una flor de la primera planta parental con polen de la segunda planta parental; y (d) recoger semillas producidas en la planta parental que tiene la flor fertilizada.

En el presente documento el retrocruzamiento se define como el proceso que incluye las etapas de: (a) cruzar una planta de un primer genotipo que contiene un gen, secuencia de ADN o elemento deseado con una planta de un segundo genotipo que carece de dicho gen, secuencia de ADN o elemento; (b) seleccionar una o más plantas de progenie que contienen el gen, secuencia de ADN o elemento deseado; (c) cruzar la planta de progenie con una planta del segundo genotipo; y (d) repetir las etapas (b) y (c) con el fin de transferir una secuencia de ADN deseada desde una planta de un primer genotipo a una planta de un segundo genotipo.

La introgresión de un elemento de ADN en un genotipo vegetal se define como el resultado del proceso de conversión por retrocruzamiento. Un genotipo vegetal en el que se realizó la introgresión de una secuencia de ADN puede denominarse un genotipo, línea, línea endogámica o híbrido convertidos por retrocruzamiento. De manera similar, un genotipo vegetal que carece de la secuencia de ADN deseada puede denominarse un genotipo, línea, línea endogámica o híbrido no convertidos.

Semillas, sémola, aceite y productos que comprenden semillas, sémola y aceite

La presente invención también proporciona un recipiente de más de aproximadamente 1000, de manera más preferente aproximadamente 20.000, e incluso de manera más preferente aproximadamente 40.000 semillas en el que por encima de aproximadamente un 10%, de manera más preferente aproximadamente un 25%, de manera más preferente aproximadamente un 50%, e incluso de manera más preferente aproximadamente un 75% o de manera más preferente aproximadamente un 90% de las semillas son semillas derivadas de una planta de la presente invención.

La presente invención también proporciona un recipiente de más de aproximadamente 10 kg, de manera más preferente aproximadamente 25 kg, e incluso de manera más preferente aproximadamente 50 kg de semillas en el que por encima de aproximadamente un 10%, de manera más preferente aproximadamente un 25%, de manera más preferente aproximadamente un 50%, e incluso de manera más preferente aproximadamente un 75% o de manera más preferente aproximadamente un 90% de las semillas son semillas derivadas de una planta de la presente invención.

Cualquiera de las plantas o partes de las mismas de la presente invención pueden recogerse y, opcionalmente, procesarse para producir una preparación de pienso, de sémola o de aceite. Una parte de la planta particularmente preferida para esta finalidad es el grano cosechado, pero también pueden recogerse otras partes de la planta y utilizarse para rastrojo o forraje. En la técnica se conocen procedimientos para producir preparaciones de pienso, sémola y aceite. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 4.957.748; 5.100.679; 5.219.596; 5.936.069; 6.005.076; 6.146.669; y 6.156.227. El grano o la sémola de la presente invención pueden combinarse con otros granos o sémolas.

Procedimientos

La presente invención proporciona un procedimiento para proporcionar plantas transgénicas con un mayor contenido de EPA o ARA. Este procedimiento puede incluir, por ejemplo, introducir ADN que codifica una delta 5 desaturasa y, opcionalmente, al menos una desaturasa adicional, en células vegetales y plantas en regeneración con un mayor contenido de EPA o ARA de las células transgénicas.

Más específicamente, la invención proporciona un procedimiento de producir alimentos o pienso, que comprende las etapas de (a) obtener la planta transgénica de la invención; y (b) producir el alimento o pienso. El alimento o pienso puede ser aceite, forraje, harina de maíz, grano, almidón, harina o proteína. La composición de alimento o pienso se define como que comprende una secuencia de polinucleótidos detectable o un polipéptido detectable proporcionado por la invención. Adicionalmente, la invención proporciona composiciones para pienso animal y para alimentos humanos que comprenden EPA o ARA.

Para el suplemento dietético, los PUFA purificados, plantas transformadas o partes de plantas o los derivados de los mismos, pueden incorporarse en los aceites, grasas o margarinas de cocción, formulados de tal forma que durante un uso normal el receptor recibiría la cantidad deseada. Los PUFA también pueden incorporarse en fórmulas para lactantes, suplementos nutricionales u otros productos alimentarios, y puede hallar un uso como agentes antiinflamatorios o reductores del colesterol.

Como se usa en el presente documento, "composición comestible" se define como composiciones que puede ingerir un mamífero, tales como sustancias comestibles, sustancias nutritivas y composiciones farmacéuticas. Como se usa en el presente documento, "sustancias comestibles" hacen referencia a sustancias que se pueden usar o preparar para usar como alimento para un mamífero e incluyen sustancias que se pueden usar en la preparación de alimentos (tales como aceites para freír) o aditivos alimentarios. Por ejemplo, sustancias comestibles incluyen animales usados para consumo humano o cualquier producto de los mismos, tal como, por ejemplo, los huevos. Sustancias comestibles típicas incluyen, entre otros, bebidas (p. ej., bebidas no alcohólicas, bebidas carbonatadas, bebidas listas para mezclar), leche para lactantes, alimentos aromatizados (p. ej., frutas y hortalizas), salsas, condimentos, aderezos para ensaladas, zumos de frutas, jarabes, postres (p. ej., pudín, gelatina, glaseados y rellenos, productos cocidos y postres congelados tales como helados y sorbetes), productos blandos congelados (p. ej., cremas congeladas, helados de crema y yogures, aderezos para cobertura, aderezos para cobertura blandos congelados tales como aderezos de crema montada lácteos o no lácteos), aceites y productos emulsionados (p. ej., manteca vegetal, margarina, mayonesa, mantequilla, aceite de cocción y aderezos para ensaladas) y alimentos de humedad intermedia (p. ej., arroz y alimentos para perros).

Además, las composiciones comestibles descritas en el presente documento también se pueden ingerir como aditivo o suplemento contenido en alimentos y bebidas. Estas se pueden formular junto con una sustancia nutritiva, tal como varias vitaminas y minerales, y se pueden incorporar en composiciones sustancialmente líquidas tales como bebidas

nutritivas, leches de soja y sopas; composiciones sustancialmente sólidas y gelatinas, o se pueden usar en forma de un polvo a incorporar en varios alimentos. El contenido del ingrediente efectivo en dicho alimento funcional o sano puede ser similar a la dosis contenida en un agente farmacéutico típico.

5 Los PUFA purificados, plantas transformadas o partes de plantas también se pueden incorporar en piensos para animales, particularmente para ganado. De este modo, los propios animales pueden beneficiarse de una dieta rica en PUFA, mientras los consumidores humanos de productos alimentarios producidos a partir de este ganado también pueden beneficiarse.

10 Para un uso farmacéutico (humano o veterinario), las composiciones pueden administrarse generalmente por vía oral, pero pueden administrarse por cualquier vía por la que se pueda absorber con éxito, por ejemplo, por vía parenteral (es decir, subcutánea, intramuscular o intravenosa), rectal o vaginal o tópicamente, por ejemplo, como una pomada o loción para la piel. Los PUFA, plantas transformadas o partes de plantas de la presente invención se pueden administrar solos o en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando están disponibles, las cápsulas de gelatina son la forma de administración oral preferida. El suplemento dietético, tal como se ha establecido anteriormente, puede proporcionar también una vía oral de administración. Los ácidos insaturados pueden administrarse en formas conjugadas, o como sales, ésteres, amidas o profármacos de los ácidos grasos. Cualquier sal farmacéuticamente aceptable está contemplada, son especialmente preferidas las sales de sodio, potasio o litio. También se contemplan las sales de N-alquilpolihidroxamina, tales como la N-metilglucamina, halladas en la publicación de PCT WO-96/33.155. Los ésteres preferidos son los ésteres de etilo. Como sales sólidas, los PUFA pueden administrarse también en forma de comprimido. Para la administración intravenosa, los PUFA o derivados de los mismos pueden incorporarse en formulaciones comerciales tales como intralípidos (Pharmacia - Upjohn, Peapack, N.J.).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar realizaciones de la invención.

Ejemplo 1

25 Clonación de las secuencias de $\Delta 5$ Desaturasa de *Hemiselms*

30 Las $\Delta 5$ desaturasas de la presente invención se clonaron de *Hemiselms virescens* y *Hemiselms rufescens*. Para clonar la $\Delta 5$ desaturasa de *Hemiselms virescens* (HvD5D), se aisló el ARN de *Hemiselms virescens* CCMP442 (CCMP, West Boothbay Harbor, ME, EE.UU.) seguido de la construcción de una biblioteca de ADNc. Se secuenciaron aproximadamente 20.000 clones independientes. La búsqueda de secuencias relacionadas con desaturasas dio un posible clon codificador de la $\Delta 5$ desaturasa, LIB5446-048-A1-M1-G2.

35 La secuencia de ADN del inserto clonado para LIB5446-048-A1-M1-G2 (SEC ID N° 5) tenía una longitud de 1613 pb y contenía un marco de lectura abierto (ORF) de 1326 pb (SEC ID N° 1) que codifica una secuencia de aminoácidos deducida de 441 aminoácidos (SEC ID N° 2). El tamaño calculado de la proteína es de 48,9 kDa con un pI estimado de 7,1. El ORF, denominado HvD5D, contenía la secuencia de aminoácidos conservada HPGG (SEC ID N° 24), que forma parte del dominio del citocromo (cytb5) condensado con el extremo N de las desaturasas "front-end". Todas las desaturasas "front-end", incluidas las $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ - y $\Delta 8$ -desaturasas tienen este dominio cytb5 en el extremo N. Además, la secuencia de aminoácidos deducida de LIB5446-048-A1-M1-G2 tiene tres cajas de histidina conservadas; de forma muy importante una secuencia QXXHH (SEC ID N° 25), que se encuentra en la tercera caja de histidina y también es diagnóstica de desaturasas *front-end* (Napier y col., 1997, Napier y col., 2003, Sperling y Heinz, 2001). Las tres cajas de histidina conservadas son parte del sitio activo y se piensa que son necesarias para unir un cofactor de dihierro requerido para la actividad.

La región de 1326 pb que contiene la supuesta región de codificación de la $\Delta 5$ desaturasa de LIB5446-048-A1-M1-G2 se amplificó mediante PCR y se ligó en el vector de expresión en levaduras pYES2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad CA), dando pMON67056 (FIG. 2). Los cebadores usados para la amplificación se muestran a continuación:

45 Hv D5 M1G2 F1 : 5'-GTCGACAAACAATGCCTCCCAACAGTGGCG-3' (SEC ID N° 6)
Hv D5 M1G2 R1 : 5'-CCTGCAGGTCAGGCCGCCTTGACCCTC-3' (SEC ID N° 7)

En el extremo 5' del oligonucleótido Hv D5 M1G2 F1 se añadió un sitio de restricción Sall y una secuencia Kozac y en el extremo 5' del oligonucleótido Hv D5 M1G2 R1 se añadió un sitio de restricción Sse8387I.

50 Para clonar la $\Delta 5$ desaturasa de *Hemiselms rufescens* (HrD5D), se aisló el ARN de *H. rufescens* CCMP439 (CCMP, West Boothbay Harbor, ME, EE.UU.) seguido de la construcción de una biblioteca de ADNc. Se realizó una detección selectiva en una biblioteca EST que consistía en 23.790 clones de secuencias que contuvieran desaturasas "front-end" consenso como se ha descrito anteriormente. Se identificó un clon parcial, LIB5445-223-A1-M1-D4, que contenía todas las secuencias conservadas previamente descritas a excepción de la región cytb5 (HPGG). Se usó una reacción 5' RACE para completar el ORF de esta supuesta desaturasa "front-end", que después se ligó en ES2.1/V5-His-TOPO © (Invitrogen, Carlsbad, CA), para dar pMON104220 (FIG. 3). Los cebadores usados para amplificar por PCR el ORF de longitud completa fueron:

H.ruf223 5'-CAGTCGACAAACAATGCCCCCAACAGCGGGCGGGAG-3' (SEC ID N° 8) y,
3'revH.Ruf223 5'-CACCTGCAGTTCAGTCGGCTTTGACCTTCCCTTCG-3' (SEC ID N° 9).

5 El ORF para este clon fue de 1323 pb (SEC ID N° 3, sin incluir el codón de terminación) que codifica una secuencia de aminoácidos deducida de 441 aminoácidos (SEC ID N° 4). Esta proteína tiene un tamaño estimado de 49 kDa y un pl de 8,2.

10 En la tabla 1 se muestra una alineación pareada de las Δ5 desaturasas de *Hemiselms rufescens*, *Hemiselms virescens*, *Pythium irregulare*, *Mortierella alpina*, *Thalassiosira pseudonana* y *Peridinium sp* CCMP626, así como una Δ6 desaturasa de *Mortierella alpina*. Las dos Δ5 desaturasas de *Hemiselms* son las más similares, con una identidad del 86,9%. Por comparación, las identidades de otras dos Δ5 desaturasas de fitoplancton, *Thalassiosira pseudonana* y *Peridinium sp* CCMP626 variaron de 48,5% a 50,9%. Las Δ5 desaturasas de *Hemiselms* comparten incluso mayor identidad con las Δ5 desaturasas de un moho del agua, *P. irregulare* (Oomicetos), y un hongo oleaginoso, *M. alpina*, con variaciones de 21,9% a 23,4%. Los niveles más altos de homología se encuentran en las zonas de alrededor de las dos cajas de histidina, la caja Q y la caja HPGG conservada del dominio cytb5 (FIG. 1).

15 **Tabla 1: Porcentaje de alineación pareada de identidades para las secuencias de aminoácidos deducidas de Δ5 y Δ6 desaturasas**

1	2	3	4	5	6	7	Organismo
-----	86,9	22,9	21,9	23	49,2	50,9	Δ5 de <i>Hemiselms rufescens</i> SEC ID N° 4
	-----	23,4	23,3	23,7	48,5	50,7	Δ5 de <i>Hemiselms virescens</i> SEC ID N° 2
		-----	39,6	20,4	22,9	23,6	Δ5 de <i>Pythium irregulare</i> SEC ID N° 10
			-----	20,4	23,6	23,1	Δ5 de <i>Mortierella Alpina</i> SEC ID N° 11
				-----	21,7	21,1	Δ6 de <i>Mortierella alpina</i> SEC ID N° 12
					-----	65,9	Δ5 de <i>Thalassiosira pseudonana</i> SEC ID N° 13
						-----	CCMP626 Δ5 de <i>Peridinium sp.</i> SEC ID N° 14
Δ5 desaturasa de <i>P. irregulare</i> (n° de acceso en GenBank AAL13311). Δ5 desaturasa de <i>M. alpina</i> (n° de acceso AAC72755). Δ5 desaturasa de <i>M. alpina</i> (n° de acceso AAF08685). Δ5 desaturasa de <i>T. pseudonana</i> (n° de acceso DJ418329). CCMP626 Δ5 desaturasa de <i>Peridinium sp</i> (US20070271632, SEC ID N° 2 del mismo).							

Ejemplo 2

Transformación y expresión en levaduras

20 Los clones pYES2.1/V5-His-TOPO ® que contienen HvD5D y HrD5D se introdujeron en la cepa huésped *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (auxotrófica para uracilo) (Invitrogen) usando el kit S.C. EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen). Los transformantes se seleccionaron en placas con medio mínimo SC menos uracilo con 2% de glucosa. Las colonias de transformantes se usaron para inocular 2 ml de medio mínimo SC menos uracilo con 2% de glucosa cultivados durante la noche a 30 °C. Para la inducción, las células de levadura en fase estacionaria se sedimentaron y se resuspendieron a 0,4 DO A600 en medio mínimo SC menos uracilo con 2% de glucosa suplementado con 2% de galactosa y ácidos grasos exógenos opcionales, y se cultivaron durante 3 días a 15 °C. Cuando se proporcionaron los ácidos grasos exógenos a los cultivos se añadió 0,01% de DGLA (18:2 Δ8,11,14) o 0,01% de ETA (20:4 Δ8,11,14,17) con 0,1% del emulsionante Tergitol. Los cultivos se recogieron mediante

centrifugación tras 3 días de incubación con estos ácidos grasos. Los sedimentos celulares se lavaron una vez con tampón TE estéril a pH 7,5 para eliminar el medio y se liofilizaron hasta sequedad. La cepa huésped transformada con el vector pYES2/CT vacío se usó como control negativo en todos los experimentos.

5 Los lípidos se extrajeron de los sedimentos de levaduras liofilizados añadiendo 0,1 ml de tolueno e incubando durante la noche a temperatura ambiente. Los lípidos extraídos se convirtieron en ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) *in situ* mediante la adición de 0,5 ml de metóxido sódico 0,6N en metanol e incubando durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron mediante la adición de 0,8 ml de NaCl al 10% (v/v) y 0,15 ml de heptano. Después de agitar enérgicamente y de la separación de fases, se retiró la capa que contenía FAME y se usó directamente para cromatografía de gases (CG). Los FAME se identificaron en una Hewlett-Packard 5890 II Plus GC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipada con un detector de ionización de llama y una columna capilar (Omegawax 250™; 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μm; Supelco, Bellefonte, PA). El inyector se mantuvo a 250 °C y el detector de ionización de llama se mantuvo a 270 °C. La temperatura de la columna se mantuvo a 180 °C durante 1,5 minutos tras la inyección, aumentó hasta 240 °C a 40 °C/min y se mantuvo a 245 °C durante 3,38 minutos.

15 Los resultados mostrados en la Tabla 2 demuestran que los clones HvD5D y HrD5D de *Hemiselmis* exhiben actividad de Δ5 desaturasa en un sistema de expresión en levadura. La actividad enzimática se dedujo a partir de un ensayo de inducción en levaduras, de modo que los cultivos de levaduras inducidos para expresar desaturasa recombinante se alimentan con DGLA o ETA. La levadura incorpora estos ácidos grasos en sus membranas, donde se convierten en sustratos para la desaturasa recombinante. Los productos de la desaturación de DGLA y ETA son ARA (20:4 Δ5,8,11,14) y EPA (20:5 Δ5,8,11,14,17), respectivamente. Se seleccionaron dos colonias individuales de levaduras para cada vector y se cultivaron por triplicado. Los valores se muestran como la media de 6 ensayos. Ambos clones de *Hemiselmis* mostraron actividad enzimática con ETA y DGLA.

Tabla 2: Actividad de delta 5 desaturasa de HvDSD y HrDSD de *Hemiselmis* spp. en un sistema de expresión en levaduras.

Construcción	Ácido graso en medio	DGLA	ETA	AA	EPA	% Conv.
HvD5D	ETA	0,0	6,5	0,0	3,7	36,2
HrD5D	ETA	0,0	6,0	0,0	4,7	44,1
Control negativo	ETA	0,0	10,2	0,0	0,0	0,0
HvD5D	DGLA	5,2	0,0	2,5	0,0	32,7
HrD5D	DGLA	5,4	0,0	3,2	0,0	37,8
Control negativo	DGLA	7,2	0,0	0,0	0,0	0,0

Ejemplo 3

25 Expresión de las Δ5 desaturasas de *Hemiselmis* spp. en soja y colza

La actividad de la Δ5 desaturasa de *Hemiselmis virescens* o *Hemiselmis rufescens* se evalúa en soja expresándola bajo el control del promotor potenciado por semilla en un fondo de soja que contiene casetes de expresión para otros ácidos grasos desaturados que producen las moléculas de ácido graso sustrato de ácido dihomo-γ-linolénico (DGLA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA) que la Δ5 desaturasa transforma en ácido araquidónico (ARA) o ácido eicosapentaenoico (EPA), respectivamente. La expresión potenciada en semillas de transgenes en plantas en general y en soja en particular está bien establecida en la técnica. Usando técnicas de clonación molecular estándar se clona el gen de interés bien como secuencia silvestre o como secuencia potenciada por codones para la expresión de la planta de interés cadena abajo de un promotor potenciado por semilla. Ejemplos de promotores potenciados con semillas de plantas dicotiledóneas tales como soja o colza son el promotor 7Sα, el promotor 7Sα', el promotor de arcelina-5, el promotor de napina y el promotor de oleosina. Entre la secuencia promotora y la región de codificación del gen de interés se inserta una región no traducida en 5' (5'-UTR) para estabilizar el ARNm. Normalmente esta secuencia incluye el sitio de inicio de la transcripción. Cadena abajo del codón de terminación de la traducción, se añade una región no traducida en 3' (3'-UTR) para estabilizar el ARNm y terminar la transcripción. En plantas, los sustratos de ETA o DGLA para la Δ5 desaturasa se pueden generar mediante la vía de Δ6 o mediante la vía de Δ8. Para generar DGLA mediante la vía de Δ6, el fondo de la planta que se transforma con un casete de expresión para la Δ5 desaturasa de *H. virescens* o de *H. rufescens* debe contener casetes de expresión potenciados en semillas para una Δ6 desaturasa, preferentemente una Δ6 desaturasa específica de omega-6, tal como la Δ6 desaturasa de *T. suecica*, la Δ6 desaturasa de *M. alpina* y una Δ6 o C 18 elongasa, tal como la Δ6 elongasa de *M. alpina*. Para la generación de ETA mediante la vía de la Δ6, el casete de expresión de la Δ6 desaturasa contiene, preferentemente, un gen que codifica una enzima preferente de omega-3, tal como la Δ6 desaturasa de *Primula juliae*. Adicionalmente, el fondo de planta también contiene, preferentemente, un casete de expresión potenciado en semillas para una Δ15 desaturasa, tal como la Δ15 desaturasa de *Aspergillus nidulans*, la Δ12/Δ15 desaturasa de *Fusarium moniliforme*, la

5 $\Delta 15$ desaturasa de *Arabidopsis thaliana* o la $\Delta 15$ desaturasa de *M. alpina*. Los casetes de expresión adicionales descritos como parte del fondo de planta se pueden transformar por separado y cruzar o combinar con el gen de interés mediante retransformación de líneas seleccionadas o se pueden cotransformar con el gen de interés en un co-bombardeo en una cotransformación mediada por *Agrobacterium*, como parte de múltiples T-ADN o en una transformación de un único constructor de ADN, por ejemplo mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. En la técnica todos estos procedimientos están bien establecidos.

10 Para generar los sustratos DGLA o ETA mediante las vías de $\Delta 8$, las construcciones de expresión de la $\Delta 5$ desaturasa tienen que transformarse en un fondo de planta que contenga un casete de expresión potenciado en semillas para una $\Delta 9$ elongasa, tal como $\Delta 9$ elongasa de *Euglena gracilis* o la $\Delta 9$ elongasa de *Isochrysis galbana*, así como un casete de expresión potenciado en semillas para una $\Delta 8$ desaturasa, tal como la $\Delta 8$ desaturasa de *Pavlova sp.*, la $\Delta 8$ desaturasa de *Tetrapleura pomquetensis* o la $\Delta 8$ desaturasa de *Euglena gracilis*. Para generar predominantemente el sustrato ETA mediante la vía de $\Delta 8$, el fondo de planta que aloja la construcción de expresión de la $\Delta 9$ elongasa y la construcción de expresión de la $\Delta 8$ desaturasa también deberán contener una construcción de expresión potenciada en semillas para una $\Delta 15$ desaturasa tal como la $\Delta 15$ desaturasa de *A. nidulans*, la $\Delta 12/\Delta 15$ desaturasa de *F. moniliforme*, la $\Delta 15$ desaturasa de *A. thaliana* o la $\Delta 15$ desaturasa de *M. alpina*. Como alternativa a la inclusión de la construcción de expresión para la $\Delta 15$ desaturasa se puede usar una construcción de expresión potenciada en semillas para una $\Delta 17$ desaturasa, tal como la $\Delta 17$ desaturasa de *S. diclina*. La última vía genera ETA predominantemente mediante el intermedio DGLA, mientras que la primera vía se puede diseñar para generar ETA predominantemente mediante el intermedio ácido estearidónico (SDA).

20 Cuando la $\Delta 5$ desaturasa se expresa en un fondo de planta que produce el sustrato DGLA a través de una de las vías descritas anteriormente, se genera ARA. Para generar EPA, DPA (n-3), o DHA se requieren desaturasas y elongasas adicionales. La expresión complementaria de una omega-3 desaturasa, tal como una $\Delta 17$ desaturasa, por ejemplo una $\Delta 17$ desaturasa de *Saprolegnia diclina*, expresada en las semillas convierte DGLA en ETA y ARA en EPA.

25 Para generar el sustrato DGLA al tiempo que se mantienen niveles bajos de ETA, la expresión de la delta-15 desaturasa celular se puede reducir o suprimir por completo mediante expresión potenciada en semillas de una construcción de ARNi al mismo tiempo que se co-expresa una C18 elongasa con una delta-8 desaturasa. En dicho entorno, la expresión potenciada por semillas de una delta-5 desaturasa tiene como resultado una formación predominante de ARA.

30 Los fondos de plantas que contienen adicionalmente un casete de expresión potenciada en semillas que contiene una C20 elongasa, por ejemplo, la C20 elongasa de *Euglena gracilis* o C20 elongasa, y una construcción de expresión de la Δ -4 desaturasa acumulan DPA o DPA/DHA, respectivamente. Un ejemplo de una Δ -4 desaturasa de la invención es el agregado de $\Delta 4$ desaturasa de *Schizochytrium aggregatum*.

Las estrategias para expresar la $\Delta 5$ desaturasa de *H. virescens* o *H. rufescens* en colza son idénticas a las estrategias en plantas de soja u otras dicotiledóneas.

35 Mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se obtienen explantes de dicotiledóneas transformados que contienen construcciones como se ha descrito anteriormente. Las plantas se regeneran a partir de tejido transformado. Después, se analiza la composición en aceite de las plantas cultivadas en invernadero.

40 Por ejemplo, la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa de *H. virescens* o *H. rufescens* se determinó en soja también transformada con otros genes necesarios para la producción de PUFA. Estos casetes incluyeron la $\Delta 15$ desaturasa de *Neurospora crassa* dirigida por el promotor de US'88, la $\Delta 6$ desaturasa de *M. alpina* dirigida por el promotor 7S α ' y la $\Delta 6$ elongasa de *M. alpina* dirigida por el promotor 7S α . Las plantas que contienen los 3 casetes descritos anteriormente se denominarán plantas control. Para comparar, las $\Delta 5$ desaturasas de *Saprolegnia diclina* e *Isochrysis galbana* también se transformaron en el mismo entorno. Cada $\Delta 5$ desaturasa se expresó bajo el control del promotor de USP88. Mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se obtienen los explantes de soja transformados que contienen las construcciones como se ha descrito anteriormente. Las plantas se regeneraron a partir de tejido transformado. Después, se analizó la composición en aceite de las plantas cultivadas en invernadero. Para cada $\Delta 5$ desaturasa y para el control se muestran múltiples acontecimientos de transformación.

Tabla 3: Actividad de delta 5 desaturasa de *Hemiselmis spp.* HvD5D y HrD5D en soja (ácidos grasos 18:1 a través de 18:2)

Elemento	Oleico	18:2D5,9	18:2D6,9
Control	21,45	0,00	0,25
Control	25,30	0,05	0,56
Control	26,11	0,00	0,55

50

ES 2 432 619 T3

(continuación)

Elemento	Oleico	18:2D5,9	18:2D6,9
Control	17,06	0,00	0,32
Control	13,97	0,00	0,11
Control	16,69	0,00	0,18
Control	25,10	0,00	0,64
Control	16,01	0,00	0,17
Control	18,07	0,00	0,24
Control	16,85	0,00	0,16
Control	19,09	0,00	0,32
Control	16,02	0,01	0,15
Control	26,77	0,00	0,89
Control	18,59	0,00	0,23
Control	20,69	0,00	0,32
Control	33,35	0,00	1,26
Control	20,30	0,00	0,33
Control	18,75	0,00	0,30
Control	17,60	0,00	0,21
Control	18,66	0,01	0,30
Control	27,01	0,01	0,48
Control	18,84	0,00	0,37
Control	16,40	0,00	0,24
HvD5d	29,48	0,15	0,77
HvD5d	18,84	0,16	0,25
HvD5d	30,02	0,11	0,75
HvD5d	23,67	0,00	1,67
HvD5d	19,46	0,10	0,28
HvD5d	22,45	0,12	0,39
HvD5d	23,56	0,08	0,39
HvD5d	17,60	0,02	0,42
HvD5d	20,86	0,11	0,35
HvD5d	16,23	0,01	0,15
HvD5d	20,36	0,06	0,22
HvD5d	23,09	0,00	0,25
HvD5d	17,18	0,06	0,19

ES 2 432 619 T3

(continuación)

Elemento	Oleico	18:2D5,9	18:2D6,9
HvD5d	20,89	0,06	0,44
HvD5d	14,30	0,12	0,14
HvD5d	18,67	0,08	0,22
HvD5d	17,32	0,05	0,23
HrD5D	33,77	0,27	0,69
HrD5D	34,96	0,38	1,35
HrD5D	32,17	0,29	0,76
HrD5D	33,11	0,48	0,60
HrD5D	28,29	0,21	0,53
HrD5D	25,28	0,21	0,38
HrD5D	24,69	0,33	0,60
HrD5D	30,52	0,22	0,68
HrD5D	15,29	0,11	0,10
HrD5D	33,60	0,34	0,95
HrD5D	20,36	0,18	0,42
HrD5D	23,02	0,18	0,30
HrD5D	18,64	0,16	0,22
HrD5D	23,85	0,18	0,38
HrD5D	18,92	0,17	0,17
HrD5D	42,04	0,17	1,03
HrD5D	30,66	0,23	0,87
HrD5D	20,47	0,01	0,45
HrD5D	20,09	0,06	0,24
HrD5D	17,22	0,02	0,20
HrD5D	22,06	0,06	0,42
HrD5D	20,13	0,00	0,94
SdD5D	31,92	4,48	0,95
SdD5D	28,14	3,34	0,55
SdD5D	17,89	2,00	0,11
SdD5D	40,70	6,81	1,50
SdD5D	19,05	1,68	0,26
SdD5D	35,14	5,01	1,03
SdD5D	28,02	3,57	0,38

ES 2 432 619 T3

(continuación)

Elemento	Oleico	18:2D5,9	18:2D6,9
SdD5D	30,57	3,34	0,85
SdD5D	27,84	2,60	0,96
SdD5D	26,63	2,87	0,54
SdD5D	22,45	0,00	0,47
SdD5D	18,41	1,71	0,21
SdD5D	37,35	5,42	1,06
SdD5D	24,61	3,45	0,50
SdD5D	21,24	0,16	0,40
SdD5D	25,79	3,67	0,47
SdD5D	27,36	0,10	0,58
SdD5D	24,47	1,68	0,38
SdD5D	20,00	0,08	0,36
SdD5D	33,69	4,46	1,07
SdD5D	35,88	2,02	1,80
SdD5D	18,75	0,05	0,30
SdD5D	14,49	0,11	0,05
SdD5D	15,65	0,08	0,19
SdD5D	13,83	0,05	0,17
IgD5D	21,72	0,04	0,45
IgD5D	21,45	0,03	0,45
IgD5D	19,44	0,04	0,51
IgD5D	23,26	0,06	0,48
IgD5D	26,69	0,09	0,86
IgD5D	17,03	0,00	0,31
IgD5D	18,02	0,00	0,24
IgD5D	42,95	0,08	1,83
IgD5D	20,32	0,02	0,32
IgD5D	18,35	0,03	0,35
IgD5D	19,44	0,02	0,32
IgD5D	17,48	0,00	0,22
IgD5D	21,69	0,07	0,48
IgD5D	18,27	0,02	0,25
IgD5D	20,08	0,07	0,19

ES 2 432 619 T3

(continuación)

Elemento	Oleico	18:2D5,9	18:2D6,9
IgD5D	16,68	0,03	0,26
IgD5D	40,86	0,09	0,96
IgD5D	19,19	0,02	0,38

Tabla 4: Actividad de delta 5 desaturasa de *Hemiselmis* spp. HvD5D y HrD5D e n soja (ácidos grasos 18:3 y mayores)

Elemento	LA	GLA	DGLA	EDA	AA	ALA	SDA	ETA	EtrA	JA	EPA	DPA
Control	9,24	5,14	4,57	2,37	0,0	17,60	6,59	7,52	4,82	0,00	0,0	0,00
Control	6,79	6,19	3,76	1,23	0,0	16,21	8,67	6,81	3,29	0,00	0,0	0,00
Control	7,27	3,78	2,97	1,77	0,0	18,77	6,69	6,77	5,33	0,00	0,0	0,00
Control	9,56	8,43	4,50	1,26	0,0	20,41	10,58	6,47	2,80	0,00	0,0	0,00
Control	9,73	6,90	4,10	1,38	0,0	23,05	10,31	6,36	3,23	0,00	0,0	0,00
Control	10,48	8,10	4,02	1,33	0,0	21,11	10,16	5,81	2,88	0,01	0,0	0,00
Control	8,98	7,04	4,62	1,68	0,0	16,24	7,79	5,71	3,31	0,00	0,0	0,00
Control	9,15	7,59	3,57	1,12	0,0	22,65	12,01	5,47	2,79	0,00	0,0	0,00
Control	10,87	9,27	3,92	1,03	0,0	20,84	10,87	4,99	2,08	0,01	0,0	0,00
Control	9,82	7,66	3,01	0,99	0,0	23,38	10,94	4,98	2,47	0,00	0,0	0,00
Control	11,93	7,66	4,76	2,37	0,0	17,53	6,77	4,96	3,53	0,00	0,0	0,00
Control	8,66	7,54	2,64	1,01	0,0	23,90	12,48	4,86	2,80	0,00	0,0	0,00
Control	7,00	8,70	3,67	0,91	0,0	15,37	11,81	4,77	1,76	0,00	0,0	0,00
Control	10,24	8,92	3,26	1,23	0,0	20,37	10,61	4,33	2,58	0,00	0,0	0,00
Control	12,07	8,93	3,96	1,41	0,0	18,41	8,93	4,19	2,09	0,00	0,0	0,00
Control	8,90	8,42	3,20	0,77	0,0	13,80	8,65	4,02	1,59	0,01	0,0	0,00
Control	11,37	8,76	3,56	1,39	0,0	19,37	9,62	3,99	2,30	0,00	0,0	0,00
Control	10,23	9,74	2,76	0,90	0,0	20,84	12,84	3,33	1,56	0,00	0,0	0,00
Control	14,17	9,61	3,16	1,29	0,0	20,73	9,03	3,20	1,91	0,00	0,0	0,00
Control	14,11	10,82	2,46	0,91	0,0	20,39	10,06	2,48	1,21	0,00	0,0	0,00
Control	10,11	10,60	0,02	0,00	0,0	19,95	15,42	0,02	0,01	0,00	0,0	0,00
Control	11,64	10,76	0,00	0,00	0,0	24,88	15,57	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00
Control	11,43	11,89	0,00	0,00	0,0	25,18	17,02	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00
HvD5D	5,71	5,01	2,83	1,40	0,0	15,03	7,34	4,07	3,20	1,42	3,4	1,29
HvD5D	10,52	5,56	3,00	2,52	1,3	19,41	6,31	2,75	3,82	1,64	2,6	0,04
HvD5D	7,51	6,45	3,53	1,70	1,1	14,56	7,00	2,94	2,39	0,90	2,2	0,04

ES 2 432 619 T3

(continuación)

Elemento	LA	GLA	DGLA	EDA	AA	ALA	SDA	ETA	EtrA	JA	EPA	DPA
HvD5D	9,53	8,39	2,66	1,05	0,9	16,56	10,11	2,49	1,43	0,51	2,2	0,97
HvD5D	12,25	8,54	2,96	1,98	1,1	19,02	7,64	2,14	2,23	1,03	1,8	0,00
HvD5D	11,28	8,47	2,49	1,51	0,9	18,19	9,43	1,96	1,87	0,95	1,8	0,00
HvD5D	12,14	8,61	2,66	1,54	0,3	17,67	8,73	1,92	1,50	0,90	1,8	0,10
HvD5D	14,85	8,32	3,06	2,04	1,3	19,43	6,83	1,86	1,90	0,78	1,7	0,00
HvD5D	12,14	8,17	2,36	1,92	0,9	18,60	8,52	1,76	2,26	1,11	1,7	0,00
HvD5D	13,54	9,42	2,11	1,16	0,8	22,28	10,22	1,68	1,36	0,83	1,6	0,68
HvD5D	14,32	9,81	2,44	1,16	0,0	19,88	9,11	1,56	1,11	0,50	1,2	0,06
HvD5D	12,80	10,49	1,25	0,67	0,5	20,34	10,80	0,97	0,82	0,45	0,9	0,07
HvD5D	15,29	10,28	1,76	1,04	0,6	21,88	10,44	1,01	0,91	0,39	0,9	0,21
HvD5D	15,57	11,80	0,89	0,65	0,3	20,09	10,62	0,56	0,58	0,24	0,5	0,22
HvD5D	17,79	8,54	6,97	4,27	0,1	14,59	5,59	3,82	3,11	0,02	0,2	0,01
HvD5D	15,67	12,64	0,02	0,13	0,0	23,43	13,04	0,01	0,02	0,00	0,0	0,00
HvD5D	14,16	12,37	0,02	0,03	0,0	24,59	14,39	0,02	0,01	0,00	0,0	0,00
HrD5d	4,69	4,60	2,79	1,39	1,2	12,39	6,24	3,24	2,53	1,64	3,1	0,00
HrD5d	4,00	5,65	2,45	0,90	1,1	10,63	8,15	3,03	1,51	1,41	3,0	1,06
HrD5d	6,37	6,68	2,39	1,18	1,0	13,37	8,42	2,28	1,53	1,28	2,3	0,20
HrD5d	9,02	6,23	3,15	1,86	1,4	12,87	5,69	2,05	1,47	1,37	2,1	0,15
HrD5d	9,63	8,07	2,87	1,14	1,0	15,84	8,25	2,26	1,19	0,92	2,0	0,15
HrD5d	10,62	8,29	3,12	1,48	1,2	15,86	7,66	2,15	1,44	1,12	2,0	0,00
HrD5d	9,85	7,65	2,95	2,01	1,4	15,98	7,75	1,92	1,81	1,55	2,0	0,00
HrD5d	8,17	8,05	2,84	1,19	1,1	13,95	8,91	2,14	1,12	0,96	1,9	0,65
HrD5d	13,13	7,86	2,55	1,90	1,2	21,98	8,66	1,80	2,10	1,46	1,9	0,66
HrD5d	6,22	7,49	2,40	0,96	1,0	13,28	9,74	1,96	1,01	0,96	1,9	0,64
HrD5d	11,08	8,29	2,90	1,71	1,2	18,65	8,55	2,01	1,81	1,31	1,9	0,00
HrD5d	12,24	8,35	2,58	1,35	1,0	18,18	8,00	1,83	1,43	1,02	1,8	0,00
HrD5d	11,39	8,38	2,22	1,20	0,9	21,05	10,50	1,83	1,42	1,03	1,7	0,02
HrD5d	10,67	8,89	2,48	1,19	0,9	17,80	9,64	1,69	1,18	0,87	1,6	0,00
HrD5d	13,14	9,44	2,75	1,73	1,2	18,87	8,66	1,58	1,54	1,11	1,5	0,23
HrD5d	7,49	5,37	1,61	1,25	0,8	11,21	5,31	1,24	1,39	0,73	1,5	0,00
HrD5d	8,82	8,59	1,90	0,95	0,7	15,75	9,98	1,40	1,02	0,64	1,2	1,07
HrD5d	8,67	5,32	2,90	2,06	0,0	17,32	9,66	6,49	4,21	0,00	0,8	0,22

ES 2 432 619 T3

(continuación)

Elemento	LA	GLA	DGLA	EDA	AA	ALA	SDA	ETA	EtrA	JA	EPA	DPA
HrD5d	9,67	6,29	4,11	2,49	0,1	19,35	7,47	4,78	4,53	0,01	0,6	0,50
HrD5d	12,15	10,89	0,23	0,16	0,1	25,44	15,22	0,21	0,21	0,19	0,2	0,19
HrD5d	10,99	12,81	0,01	0,02	0,0	21,15	16,46	0,01	0,01	0,00	0,0	0,49
HrD5d	10,80	12,61	0,00	0,00	0,0	22,06	17,22	0,00	0,00	0,00	0,0	0,29
SdD5D	6,60	5,43	1,78	1,17	0,6	13,68	7,32	2,02	1,99	1,19	1,5	0,23
SdD5D	12,21	8,00	2,23	0,42	0,8	17,20	7,45	1,89	0,42	0,26	1,4	
SdD5D	13,42	7,88	2,63	1,55	0,9	20,56	7,70	2,01	1,67	0,72	1,4	
SdD5D	4,78	4,22	1,82	0,96	0,7	9,45	4,95	1,46	1,11	0,94	1,3	0,21
SdD5D	13,80	8,38	1,97	1,26	0,8	21,02		1,74	1,77	0,81	1,3	
SdD5D	8,53	6,32	1,80	1,00	0,7	11,95	5,73	1,47	1,12	0,84	1,1	0,18
SdD5D	8,97	6,49	1,95	1,76	0,7	14,44	7,23	1,59	2,22	1,17	1,1	0,27
SdD5D	10,79	7,86	2,16	1,02	0,7	14,12	6,75	1,52	1,03	0,69	1,0	0,00
SdD5D	9,97	8,26	1,67	0,87	0,6	15,95	9,49	1,47	1,04	0,67	1,0	0,29
SdD5D	11,74	7,90	2,31	1,41	0,8	15,54	7,60	1,52	1,26	0,74	1,0	0,00
SdD5D	10,14	6,60	3,52	2,45	0,6	17,21	7,45	3,80	3,79	0,25	1,0	0,07
SdD5D	14,47	8,99	1,87	1,34	0,6	20,24	8,57	1,33	1,42	0,76	0,9	
SdD5D	7,12	5,77	1,75	1,33	0,6	10,82	5,21	1,24	1,28	0,91	0,9	0,12
SdD5D	11,56	8,11	1,76	1,55	0,6	16,70	7,63	1,05	1,41	0,90	0,8	0,00
SdD5D	11,29	8,28	2,70	1,12	0,3	19,81	10,54	3,05	2,00	0,14	0,7	0,22
SdD5D	12,68	8,86	1,22	1,27	0,5	14,48	7,39	0,81	1,19	0,79	0,7	0,25
SdD5D	9,49	7,11	2,05	1,39	0,3	17,21	9,63	3,14	2,50	0,01	0,6	0,00
SdD5D	13,22	9,18	1,54	0,97	0,5	18,75	8,41	0,88	0,84	0,41	0,6	0,00
SdD5D	12,13	9,46	2,06	1,28	0,2	19,45	11,20	2,24	2,01	0,12	0,6	0,00
SdD5D	8,53	7,40	1,49	0,62	0,4	13,52	7,75	1,03	0,69	0,47	0,5	
SdD5D	7,82	9,32	0,50	0,32	0,2	14,56	9,62	0,45	0,37	0,00	0,4	0,19
SdD5D	13,65	12,00	0,44	0,28	0,2	22,20	14,32	0,37	0,35	0,18	0,3	
SdD5D	32,50	3,67	1,65	6,99	0,3	11,88	2,60	1,07	2,44	0,05	0,2	
SdD5D	14,53	10,71	3,32	1,17	0,0	21,25	9,46	3,16	1,69	0,02	0,0	0,30
SdD5D	15,47	13,31	0,00	0,07	0,0	25,00	13,74	0,00	0,00	0,00	0,0	0,12
IgD5D	10,26	7,52	0,64	1,67	3,0	18,27	8,04	1,31	3,16	0,00	3,1	
IgD5D	11,88	8,04	0,85	1,83	3,7	17,40	6,53	1,20	2,76	0,00	2,9	
IgD5D	12,35	9,90	0,39	1,14	3,0	19,15	9,90	0,76	1,70	0,00	2,7	
IgD5D	10,76	6,76	0,61	2,43	2,4	17,37	7,17	1,27	3,88	0,00	2,6	

(continuación)

Elemento	LA	GLA	DGLA	EDA	AA	ALA	SDA	ETA	EtrA	JA	EPA	DPA
IgD5D	9,23	8,57	0,50	0,74	2,5	17,26	10,46	1,02	1,29	0,00	2,6	
IgD5D	12,04	9,80	0,25	1,05	2,8	21,77	9,66	0,86	1,98	0,00	2,6	
IgD5D	14,29	9,96	0,47	1,22	2,9	20,20	8,03	0,83	1,85	0,00	2,3	
IgD5D	5,01	3,35	1,15	1,51	2,0	9,62	4,62	2,63	2,52	0,00	2,3	
IgD5D	14,52	9,96	0,67	1,18	2,7	18,26	8,32	0,83	1,52	0,00	2,2	
IgD5D	14,17	8,57	0,48	1,89	2,4	20,34	8,34	0,66	2,30	0,00	2,2	
IgD5D	16,82	9,91	0,66	1,16	2,5	18,54	7,47	0,74	1,33	0,00	1,8	
IgD5D	16,22	11,17	0,37	1,07	2,4	19,85	9,13	0,41	1,40	0,00	1,7	
IgD5D	11,72	10,05	0,39	0,67	1,8	20,12	10,56	0,75	1,20	0,00	1,7	
IgD5D	10,83	7,99	2,48	1,56	0,4	20,94	10,26	3,79	2,90	0,02	0,3	
IgD5D	12,64	6,44	2,45	2,32	0,3	19,38	8,14	4,14	3,80	0,00	0,2	
IgD5D	15,94	4,43	2,51	4,11	0,2	17,48	5,61	4,56	5,22	0,00	0,1	
IgD5D	17,93	3,31	0,72	3,22	0,0	8,02	5,05	0,69	0,99	0,00	0,0	
IgD5D	15,45	12,73	0,00	0,01	0,0	21,43	13,30	0,00	0,00	0,00	0,0	

Las $\Delta 5$ desaturasas de *H. virescens* y *H. rufescens* produjeron ambas una media de aproximadamente 3 veces más de EPA y AA, lo que indica una preferencia por el sustrato omega-3. La cantidad de ácidos grasos 18:2 D5,9 y 18:2D6,9 era del 0,5% o menor. Por el contrario, la $\Delta 5$ desaturasa de *Isochrysis galbana* produjo niveles de AA ligeramente mayores en comparación con los niveles de EPA, lo que indica una ligera preferencia por los ácidos grasos omega-6. La $\Delta 5$ desaturasa de *Saproligna diclina* produjo una media de 2,5% de 18:2D5,9 al mismo tiempo que producía menos del 1% de EPA de media.

Ejemplo 4

Expresión de las $\Delta 5$ desaturasas de *Hemiselmis spp.* en maíz

En muchas plantas monocotiledóneas como el maíz (*Zea mays*), la mayor parte del aceite se acumula en la semilla. Por tanto, se puede modificar mediante ingeniería la biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados en estas plantas mediante expresión de la $\Delta 5$ desaturasa así como de las desaturasas y elongasas complementarias (las enzimas basales) bajo el control de los promotores específicos de la semilla, tales como el promotor de oleosina, el promotor glob o el promotor PER1 de *Hordeum vulgare*. Además, con el fin de potenciar la expresión génica en plantas monocotiledóneas con frecuencia se añaden intrones tales como el intrón HSP70 o el intrón de la actina del arroz, en la secuencia 5'-UTR. Además, la secuencia Kozak se puede modificar ligeramente para reflejar las preferencias por la expresión en plantas monocotiledóneas. Todos los demás aspectos del fondo de la planta y el casete de expresión de interés permanecen equivalentes a los del Ejemplo 3.

Mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se obtienen explantes de maíz transformados que contienen construcciones como se ha descrito anteriormente. Las plantas se regeneran a partir de tejido transformado. Después, se analiza la composición en aceite de las plantas cultivadas en invernadero.

Referencias

Las referencias que se enumeran a continuación complementan, explican, proporcionan información o enseñan metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en el presente documento.

Patentes de Estados Unidos 4.518.584; 4.737.462; 4.810.648; 4.957.748; 5.094.945; ; 5.100.679; 5.196.525; 5.219.596; 5.290.924; 5.322.783; 5.359.142; 5.424.398; 5.500.365; 5.530.196; 5.424.412; 5.538.880; 5.550.318; 5.563.055; 5.610.042; 5.627.061; 5.633.435; 5.641.876; 5.936.069; 6.005.076; 6.040.497; 6.051.753; 6.146.669; 6.156.227; 6.265.638; 6.319.698; 6.433.252; y 6.451.567.
Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030093828; 20030229918; y 20070271632. Barany y col., Int. J. Peptide Protein Res., 30:705-739, 1987.
Bauer y col., Gene, 37:73, 1985.

- Belanger y Kriz, *Genetics*, 129:863-872, 1991.
 Bevan y col., *Nucleic Acids Res.*, 11:369-385, 1983.
 Bodanszky, In: *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1984. Bustos y col., *Plant Cell*, 1: 839-853, 1989.
- 5 Callis y col., *Genes Dev.*, 1:1183-1200, 1987.
 Chen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8560-8564, 1986.
 Chu y col., *Scientia Sinica*, 18:659, 1975.
 DeBlock y col., *EMBO J.*, 6:2513-2519, 1987.
 Ebert y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5745-5749, 1987.
- 10 Freitag y Selker, *Curr Opin Genet Dev.* 15:191-9, 2005.
 Gallie y col., *The Plant Cell*, 1:301, 1999.
 Haymes y col., (*Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC, 1985.
 Hudspeth y col., *Plant Mol. Biol.*, 12:579, 1989.
 Ingelbrecht y col., *Plant Cell*, 1:671-680, 1989.
- 15 Joshi, *Nucleic Acids Res.*, 15:6643, 1987.
 Kridl y col., *Seed Sci. Res.*, 1:209-219, 1991.
 Lopes y col., *Mol. Gen. Genet.*, 247:603-613, 1995.
 Maniatis y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- 20 Maundrell, *J. Biol. Chem.*, 265:10857-10864, 1990.
 McElroy y col., *Mol Gen Genet* 231:150-160, 1991.
 Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963.
 Misawa y col., *Plant J.*, 6:481-489, 1994.
 Murashige y Skoog, *Physiol. Plant*, 15:473-497, 1962.
- 25 Napier y col., *Biochem. J.*, 328, 717-720, 1997.
 Napier y col., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68:135-143, 2003.
 Documentos WO 02/050295; WO 95/06128 y WO 96/33155
 Prem Das y col., *NAR*, 19:3325-3330, 1991.
 Recombinant DNA Part D, *Methods in Enzymology*, 153:1-622, Wu and Grossman (Eds.), Academic Press, 1987.
- 30 Sambrook y col., In: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
 Sathasiivan y col., *Nucl. Acids Res.*, 18:2188-2193, 1990.
 Sperling and Heinz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103:158-180, 2001.
 Stacey y col., *Plant Mol. Biol.*, 31:1205-1216, 1996.
 Turner y Foster, *Mol. Biotechnol.*, 3:225-36, 1995.
- 35 Vasil y col., *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
 Walder y col., *Gene*, 42:133, 1986.
 Wohlleben y col., *Gene*, 70:25-37, 1988.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Froman, Byron Ursin, Virginia Screen, Steven Lehman, Lori
 <120> Utilización de desaturasas de ácidos grasos de *Hemiselmis* spp
 <130> MONS:219WO
- 45 <140> Desconocido
 <141> 14-10-2009
- 50 <150> 61/105.316
 <151> 14-10-2008
- <160> 25
- <170> PatentIn version 3.5
- 55 <210> 1
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> *Hemiselmis virescens*
- 60 <400> 1

ES 2 432 619 T3

atgcctocca acagtggcgc gggaggcgcct gcctccgacc tcgaggtctt cccctccgcc 60
 gatgaccttc ccgaggggta catcgccatc gatggggagg tctacgacct caaggggttc 120
 gaccacccccg gaggggaatc catcaatctc ttcgggggca acgacgtttc ggtgcagtat 180
 cggatgatcc atcccttcca tcagggcaag ggggccgtca acaagatgaa gaaggtgggc 240
 aggctcgcca gctctcgctt cgactacaag tttggcagcg acttcgagaa ggatgttatc 300
 gccgcctgcg ccaaggttgt caaaccacgc gagcgctttg cgacgcccgg attctgggtc 360
 cgctgcgggtg cttacgtcac tgcttacggg gggcttacct acgtgtacgt caccaagggc 420
 tccagcctgc ccctctgcat tgccattggc atgtctcagg cctcaatcgg cctaaacgtg 480
 cagcacgatg cgaatcacgg cgctgtgtcc gcttccccgt tctggaacga cctcctgggc 540
 ttcggggcgg acatgattgg gggatgcaag tacctttggc ttcagcagca ctggacgcac 600
 cagccttta caaacgacat taccctgtac ccgcagcctt cgagcacgga ccccttcttc 660
 ctcttccacg actatggcaa ggagactccc gtccgcaagg ccttccacat gtttcagcac 720
 ttctacatgg tgcccgtgct cgcgatgtac tgggcatcct cgatcttcaa caccaatgtc 780
 gttacgctgc agcacgcggg cgcggcggag ggggggatga agttcgcaa ctcgtaccgt 840
 gagggcacc gccccatctc gatcgccctc cgtcactctt acctcggact ctactgcgcg 900
 acccccttct gctggcacag ctggcccacg gccctctctc atgtgtggac gatggctgtg 960
 tcggagagcc tcacccttgc catccccttt gcgctttccc acaactttat ggagagcgag 1020
 aggcaccocg tggaacacgg gcaggcctgc tggtaaacgg cgcaggtcga gacgtcttcg 1080
 acgtatgggg ggtacatcgc tgggtggctc acggggggcc tcaactacca gattgagcac 1140
 cacctgttcc ccaggatgtc atcggttgg taccctaca tccagcccgc ggtgcgcgag 1200
 gtctgcaaga agcacggcgt aaactacgtc tattaccaa acatatttgc caacctcgc 1260
 tccacgttcc agtacattgc gcagggtggc caggggatct atgagaggag ggtcaaggcg 1320
 gcctga 1326

<210> 2
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> *Hemiselmis virescens*

 <400> 2

5

ES 2 432 619 T3

Met Pro Pro Asn Ser Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ser Asp Leu Glu Val
1 5 10 15

Phe Pro Ser Ala Asp Asp Leu Pro Glu Gly Tyr Ile Ala Ile Asp Gly
20 25 30

Glu Val Tyr Asp Leu Lys Gly Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Ser Ile
35 40 45

Asn Leu Phe Gly Gly Asn Asp Val Ser Val Gln Tyr Arg Met Ile His
50 55 60

Pro Phe His Gln Gly Lys Gly Ala Val Asn Lys Met Lys Lys Val Gly
65 70 75 80

Arg Leu Ala Ser Ser Arg Leu Asp Tyr Lys Phe Gly Ser Asp Phe Glu
85 90 95

Lys Asp Val Ile Ala Ala Val Ala Lys Val Val Lys Pro Ser Glu Arg
100 105 110

Phe Ala Thr Pro Gly Phe Trp Phe Arg Cys Gly Ala Tyr Val Thr Ala
115 120 125

Tyr Ala Gly Leu Thr Tyr Val Tyr Val Thr Lys Gly Ser Ser Leu Pro
130 135 140

Leu Cys Ile Ala Ile Gly Met Ser Gln Ala Ser Ile Gly Leu Asn Val
145 150 155 160

Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Val Ser Ala Ser Pro Phe Trp Asn
165 170 175

Asp Leu Leu Gly Phe Gly Ala Asp Met Ile Gly Gly Cys Lys Tyr Leu
180 185 190

Trp Leu Gln Gln His Trp Thr His His Ala Phe Thr Asn Asp Ile Thr

ES 2 432 619 T3

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

ES 2 432 619 T3

<210> 3
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> *Hemiselmis rufescens*

5

<400> 3

```

atgccccca acagcggcgc gggagggcgc gcctccgacc tccaggtctt cccgtccgcc      60
gaccagctcc ccgagggcta cgtggcgatc gacggcgagg tctacgacct caaggggttt      120
gaccaccccg ggggggagtc catcctgctc ttccggggga acgatgtgtc tgtgcagtat      180
cgcatgatcc acccctttca cgcgggcaag ggttcgggtga acaagatgaa gaaggtgggc      240
aggctcgcaa agtcgcgcct cgactacact tttgggagcg agtttgagag ggatctcgtg      300
gccgctgtcc agaaggttgt caagcccagc cagcgccttcg ctaccgcggg cttttggttc      360
agatgcatct tctacatctc cctctacgcc gtgctgacct acttttacgt ctcgaggggc      420
tcgagcatcg cgctgtgcat tgccatcggc atgtctcagg cctcaatcgg gctaaacctg      480
cagcacgacg cgaatcacgg cgccgtctcg cctccccgtt tttggaacga cttctgggc      540
ttcggggctg acatgattgg aggctgcaag tatctgtggc tgcagcagca ctggacgcac      600
cacgccttca ccaacgatat cacgcgcgac cctgatgogt cgagcacgga ccctttttc      660
ctcttccaag actatggcaa gaatggggca gtccgcaagg cgggtgcacgt gttccagcac      720
ttctacatga tccccgtgct ggcaatgtac tgggcatcct ccatcttcaa cacaacgtc      780
gtcaccctgc agcacacggg cgcccccgac gcgggcatga agtttgcaa ctcttaccgt      840
gaggcgcacc gccccatctc gatcctcctc cgatccctct acctcgctct ctactgcgca      900
tctcccttct accaccacca ctgggccacg gcgctgctgc atgtttgac gatggcagtg      960
agtgagagcc tcaccctcgc catccccctt gccctctcgc acaactttct ggagagcgag     1020
aggcaccctg tcgccaacgg ccaggtttgc tggtaacaagt cacaggtgga gacctcctcc     1080
acttacgggg gctacgtcgc ggggtggctg acgggggggc tcaactttca gattgagcac     1140
cacctcttcc ctaggatgtc ttctgcttgg taccctaca tccagccagc cgtgcgcgaa     1200
gtatgcaaga agcacggcgt gaactatgtc tactacccaa acatcttcag caaccttgtt     1260
tccaccttta cctatattgc tcaggttggg aggggggcgt acgaaggaa ggtcaaagcc     1320
gactga                                           1326
    
```

10

<210> 4
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> *Hemiselmis rufescens*

15

<400> 4

ES 2 432 619 T3

Met Pro Pro Asn Ser Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ser Asp Leu Gln Val
1 5 10 15

Phe Pro Ser Ala Asp Gln Leu Pro Glu Gly Tyr Val Ala Ile Asp Gly
 20 25 30

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

Leu Leu Arg Ser Leu Tyr Leu Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Pro Phe Tyr
 290 295 300

His His His Trp Ala Thr Ala Leu Leu His Val Trp Thr Met Ala Val
 305 310 315 320

Ser Glu Ser Leu Thr Leu Ala Ile Pro Phe Ala Leu Ser His Asn Phe
 325 330 335

Leu Glu Ser Glu Arg His Pro Val Ala Asn Gly Gln Val Cys Trp Tyr
 340 345 350

Lys Ser Gln Val Glu Thr Ser Ser Thr Tyr Gly Gly Tyr Val Ala Gly
 355 360 365

Trp Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro
 370 375 380

Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Gln Pro Ala Val Arg Glu
 385 390 395 400

Val Cys Lys Lys His Gly Val Asn Tyr Val Tyr Tyr Pro Asn Ile Phe
 405 410 415

Ser Asn Leu Val Ser Thr Phe Thr Tyr Ile Ala Gln Val Gly Arg Gly
 420 425 430

Ala Tyr Glu Gly Lys Val Lys Ala Asp
 435 440

<210> 5
 <211> 1613
 <212> ADN
 <213> *Hemiselmis virescens*

<400> 5

5

ES 2 432 619 T3

ccacgcgtcc gcttgctcag aaatccccca gtcttcatgc ctccaacag tggcgcggga 60
 ggcgctgcct ccgacctega ggtcttcccc tccgccgatg accttcccga ggggtacatc 120
 gccatcgatg gggaggtcta cgacctcaag gggttcgacc accccggagg ggaatccatc 180
 aatctcttcg ggggcaacga cgtttcgggtg cagtatcgga tgatccatcc cttccatcag 240
 ggcaaggggg ccgtcaacaa gatgaagaag gtgggcaggc tcgccagctc tcgcctcgac 300
 tacaagtttg gcagcgactt cgagaaggat gttatcgccg ccgtcgccaa ggttgtcaaa 360
 cccagcgagc gctttgcgac gcccggtatc tggttccgct gcggtgctta cgtcactgct 420
 tacgcggggc ttacctacgt gtacgtcacc aagggtcca gcctgccct ctgcattgcc 480
 attggcatgt ctcaggctc aatcggccta aacgtgcagc acgatgcgaa tcacggcgct 540
 gtgtccgctt ccccgttctg gaacgcctc ctgggcttcg gggcggacat gattggggga 600

 tgcaagtacc tttggttca gcagcactgg acgcaccacg cctttacaaa cgacattacc 660
 cgtgaccccg acgcctcgag cacggacccc ttcttctct tccacgacta tggcaaggag 720
 actcccgctc gcaaggcctt ccacatgttt cagcacttct acatggtgcc cgtgctcgcg 780
 atgtactggg catcctcgat cttcaacacc aatgtcgtta cgctgcagca cgcgggcgcg 840
 gcggaggggg ggatgaagtt cgccaactcg taccgtgagg cgcaccgcc catctcgatc 900
 gccctccgct cactctacct cggactctac tgcgcgaccc ccttctgctg gcacagctgg 960
 cccacggccc tctctcatgt gtggacgatg gctgtgtcgg agagcctcac ccttgccatc 1020
 ccctttgcgc tttcccacaa ctttatggag agcgagaggc acccgggtggc aaacgggcag 1080
 gcctgctggt acaaggcgca ggtcgagacg tcttcgacgt atggggggta catcgctggg 1140
 tggctcacgg ggggcctcaa ctaccagatt gagcaccacc tgttcccag gatgtcatcg 1200
 gcttggtagc cctacatcca gcccgcggtg cgcgaggtct gcaagaagca cggcgtaaac 1260
 tacgtctatt acccaaacat atttgccaac ctgcctcca cgttccagta cattgcgcag 1320
 gtgggccagg ggatctatga gaggagggtc aaggcggcct gatcacgcgg tccgacgtcc 1380
 gaccaaaggg gtctgacgcc tgaccccaga cccgcgtgcc gtgcgcggg gggcgggggg 1440
 cctgcgctct ggggtctcag gggggggggg gggggggggt aggcgccccg gcgtagggcc 1500
 gcaaggctgc gtgcgcgtta ggtcccggg cgtgggtgga ttctggggtc caagggtgc 1560
 taatgagttg ccaagtgcta ctacagagtt gctcgggaaa aaaaaaaaaa aag 1613

<210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213>Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador

10

<400> 6
 gtcgacaaac aatgcctccc aacagtggcg 30

<210> 7

ES 2 432 619 T3

<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Cebador

<400> 7
cctgcaggtc aggccgcctt gaccctc 27

10
<210> 8
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Cebador

<400> 8
cagtcgacaa acaatgcccc ccaacagcgg cgcgggag 38

<210> 9
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Cebador

30
<400> 9
cacctgcagg tcagtcggct ttgacctcc cttcg 35μ

<210> 10
<211> 456
<212> PRT
<213> *Pythium irregulare*

35
<400> 10

ES 2 432 619 T3

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Gln Glu Val Ala Lys
 1 5 10 15

His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Ile Ile Arg Gly Glu Val Tyr
 20 25 30

Asp Val Thr Glu Trp Ala Asp Lys His Pro Gly Gly Ser Glu Leu Ile
 35 40 45

Val Leu His Ser Gly Arg Glu Cys Thr Asp Thr Phe Tyr Ser Tyr His
 50 55 60

Pro Phe Ser Asn Arg Ala Asp Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Lys Ile Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Val Gly Gly Tyr Glu Phe Pro Val Phe Lys Pro Asp Ser Gly
 85 90 95

Phe Tyr Lys Glu Cys Ser Glu Arg Val Ala Glu Tyr Phe Lys Thr Asn
 100 105 110

Asn Leu Asp Pro Lys Ala Ala Phe Ala Gly Leu Trp Arg Met Val Phe
 115 120 125

Val Phe Ala Val Ala Ala Leu Ala Tyr Met Gly Met Asn Glu Leu Ile
 130 135 140

Pro Gly Asn Val Tyr Ala Gln Tyr Ala Trp Gly Val Val Phe Gly Val
 145 150 155 160

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

ES 2 432 619 T3

Cys Lys Lys Tyr Asn Ile Lys Tyr Thr Val Leu Pro Thr Phe Thr Glu
420 425 430

Ala Leu Leu Ala His Phe Lys His Leu Lys Asn Met Gly Glu Leu Gly
435 440 445

Lys Pro Val Glu Ile His Met Gly
450 455

5

- <210> 11
- <211> 446
- <212> PRT
- <213> Mortierella alpina

- <400> 11

ES 2 432 619 T3

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala
 1 5 10 15

His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr
 20 25 30

Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Val Asp Thr Leu
 35 40 45

Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His
 50 55 60

Ala Phe Gly Ala Ala Asp Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr
 65 70 75 80

Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Ile Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His
 85 90 95

Lys Thr Ile Lys Thr Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Asp Arg Asn Ile
 100 105 110

Asp Pro Lys Asn Arg Pro Glu Ile Trp Gly Arg Tyr Ala Leu Ile Phe
 115 120 125

Gly Ser Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Ala Gln Leu Phe Val Pro Phe Val
 130 135 140

Val Glu Arg Thr Trp Leu Gln Val Val Phe Ala Ile Ile Met Gly Phe
 145 150 155 160

Ala Cys Ala Gln Val Gly Leu Asn Pro Leu His Asp Ala Ser His Phe
 165 170 175

Ser Val Thr His Asn Pro Thr Val Trp Lys Ile Leu Gly Ala Thr His
 180 185 190

Asp Phe Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Val Trp Met Tyr Gln His Met
 195 200 205

Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val
 210 215 220

Ser Thr Ser Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp
 225 230 235 240

Phe Val Asn His Ile Asn Gln His Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly
 245 250 255

Leu Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe
 260 265 270

Val Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His
 275 280 285

Thr Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu
 290 295 300

Ile Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln
 325 330 335

Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn
 340 345 350

Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln
 355 360 365

Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu
 370 375 380

Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His
 385 390 395 400

Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys
 405 410 415

Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His
 420 425 430

Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu
 435 440 445

<210> 12
<211> 457
<212> PRT
<213> *Mortierella alpina*

5

<400> 12

Met Ala Ala Ala Pro Ser Val Arg Thr Phe Thr Arg Ala Glu Val Leu
1 5 10 15

Asn Ala Glu Ala Leu Asn Glu Gly Lys Lys Asp Ala Glu Ala Pro Phe
20 25 30

Leu Met Ile Ile Asp Asn Lys Val Tyr Asp Val Arg Glu Phe Val Pro
35 40 45

Asp His Pro Gly Gly Ser Val Ile Leu Thr His Val Gly Lys Asp Gly
50 55 60

Thr Asp Val Phe Asp Thr Phe His Pro Glu Ala Ala Trp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Ala Asn Phe Tyr Val Gly Asp Ile Asp Glu Ser Asp Arg Asp Ile Lys
85 90 95

Asn Asp Asp Phe Ala Ala Glu Val Arg Lys Leu Arg Thr Leu Phe Gln
100 105 110

Ser Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Ala Tyr Tyr Ala Phe Lys Val
115 120 125

Ser Phe Asn Leu Cys Ile Trp Gly Leu Ser Thr Val Ile Val Ala Lys
130 135 140

Trp Gly Gln Thr Ser Thr Leu Ala Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu
145 150 155 160

Gly Leu Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His
165 170 175

His Gln Val Phe Gln Asp Arg Phe Trp Gly Asp Leu Phe Gly Ala Phe
180 185 190

Leu Gly Gly Val Cys Gln Gly Phe Ser Ser Ser Trp Trp Lys Asp Lys
195 200 205

His Asn Thr His His Ala Ala Pro Asn Val His Gly Glu Asp Pro Asp
210 215 220

Ile Asp Thr His Pro Leu Leu Thr Trp Ser Glu His Ala Leu Glu Met

Met Pro Pro Asn Ala Glu Val Lys Asn Leu Arg Ser Arg Ser Ile Pro
1 5 10 15

Thr Lys Lys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ala Asn Asp Asp Pro Ala
20 25 30

Thr Gln Ser Thr Ser Pro Val Asn Arg Thr Leu Lys Ser Leu Asn Gly
35 40 45

Asn Glu Ile Ala Ile Asp Gly Val Ile Tyr Asp Ile Asp Gly Phe Val
50 55 60

His Pro Gly Gly Glu Val Ile Ser Phe Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr
65 70 75 80

Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Asn Ser Lys His Leu Glu
85 90 95

Lys Met Arg Ala Val Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Ser Thr Glu Tyr Lys
100 105 110

Phe Asp Thr Pro Phe Glu Arg Glu Ile Lys Ser Glu Val Phe Lys Ile
115 120 125

Val Arg Arg Gly Arg Glu Phe Gly Thr Thr Gly Tyr Phe Leu Arg Ala
130 135 140

Phe Phe Tyr Ile Ala Leu Phe Phe Thr Met Gln Tyr Thr Phe Ala Thr
145 150 155 160

Cys Thr Thr Phe Thr Thr Tyr Asp His Trp Tyr Gln Ser Gly Val Phe
165 170 175

Ile Ala Ile Val Phe Gly Ile Ser Gln Ala Phe Ile Gly Leu Asn Val
180 185 190

Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Ala Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn
195 200 205

Asp Leu Leu Gly Ser Gly Ala Asp Leu Ile Gly Gly Cys Lys Trp Asn
210 215 220

Trp Leu Ala Gln His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Asp
225 230 235 240

Lys Asp Pro Asp Ser Phe Ser Ser Glu Pro Val Phe Asn Phe Asn Asp
245 250 255

Tyr Pro Ile Gly His Pro Lys Arg Lys Trp Trp His Arg Phe Gln Gly
 260 265 270
 Leu Tyr Phe Leu Ile Met Leu Ser Phe Tyr Trp Val Ser Met Val Phe
 275 280 285
 Asn Pro Gln Val Ile Asp Leu Arg His Ala Gly Ala Ala Tyr Val Gly
 290 295 300
 Phe Gln Met Glu Asn Asp Phe Ile Val Lys Arg Arg Lys Tyr Ala Met
 305 310 315 320
 Ala Leu Arg Ala Met Tyr Phe Tyr Phe Asn Ile Tyr Cys Pro Ile Val
 325 330 335
 Asn Asn Gly Leu Thr Trp Ser Thr Val Gly Ile Ile Leu Leu Met Gly
 340 345 350
 Val Ser Glu Ser Phe Met Leu Ser Gly Leu Phe Val Leu Ser His Asn
 355 360 365
 Phe Glu Asn Ser Glu Arg Asp Pro Thr Ser Glu Tyr Arg Lys Thr Gly
 370 375 380
 Glu Gln Val Cys Trp Phe Lys Ser Gln Val Glu Thr Ser Ser Thr Tyr
 385 390 395 400
 Gly Gly Ile Val Ala Gly Cys Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val
 405 410 415
 Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Phe Ile
 420 425 430
 Ala Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Lys Lys His Gly Val Arg Tyr Ala
 435 440 445
 Tyr Tyr Pro Tyr Ile Trp Gln Asn Leu His Ser Thr Val Ser Tyr Met
 450 455 460
 His Gly Thr Gly Thr Gly Ala Arg Trp Glu Leu Gln Pro Leu Ser Gly
 465 470 475 480
 Arg Ala

<210> 14
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> *Peridinium sp.* CCMP626
 <400> 14

ES 2 432 619 T3

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Lys Ala Gln Ser Ile
1 5 10 15

Gln Asp Thr Ala Asp Ser Gln Ala Thr Glu Leu Lys Ile Gly Thr Leu
20 25 30

Lys Gly Leu Gln Gly Thr Glu Ile Val Ile Asp Gly Asp Ile Tyr Asp
35 40 45

Ile Lys Asp Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Ser Ile Met Thr Phe Gly
50 55 60

Gly Asn Asp Val Thr Ala Thr Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Ser
65 70 75 80

Lys His His Leu Glu Lys Met Lys Lys Val Gly Arg Val Pro Asp Tyr
85 90 95

Thr Ser Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Pro Phe Glu Arg Glu Ile Lys Gln
100 105 110

Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Arg Glu Phe Gly Thr Pro Gly
115 120 125

Tyr Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Gly Leu Phe Phe Tyr Leu Gln
130 135 140

Tyr Leu Trp Val Thr Thr Pro Thr Thr Phe Ala Leu Ala Ile Phe Tyr
145 150 155 160

Gly Val Ser Gln Ala Phe Ile Gly Leu Asn Val Gln His Asp Ala Asn
165 170 175

His Gly Ala Ala Ser Lys Lys Pro Trp Ile Asn Asn Leu Leu Gly Leu
180 185 190

Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Met Asn Gln His
195 200 205

Trp Thr His His Thr Tyr Thr Asn His His Glu Lys Asp Pro Asp Ala
210 215 220

Leu Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Gly His
225 230 235 240

Pro Lys Arg Thr Leu Ile His His Phe Gln Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe
245 250 255

Val Leu Ala Gly Tyr Trp Val Ser Ser Val Phe Asn Pro Gln Ile Leu
 260 265 270

Asp Leu Gln His Arg Gly Ala Gln Ala Val Gly Met Lys Met Glu Asn
 275 280 285

Asp Tyr Ile Ala Lys Ser Arg Lys Tyr Ala Ile Phe Leu Arg Leu Leu
 290 295 300

Tyr Ile Tyr Thr Asn Ile Val Ala Pro Ile Gln Asn Gln Gly Phe Ser
 305 310 315 320

Leu Thr Val Val Ala His Ile Leu Thr Met Gly Val Ala Ser Ser Leu
 325 330 335

Thr Leu Ala Thr Leu Phe Ala Leu Ser His Asn Phe Glu Asn Ala Asp
 340 345 350

Arg Asp Pro Thr Tyr Glu Ala Arg Lys Gly Gly Glu Pro Val Cys Trp
 355 360 365

Phe Lys Ser Gln Val Glu Thr Ser Ser Thr Tyr Gly Gly Phe Ile Ser
 370 375 380

Gly Cys Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His His Leu Phe
 385 390 395 400

Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro Thr Val Arg
 405 410 415

Glu Val Cys Lys Lys His Gly Val Lys Tyr Ala Tyr Tyr Pro Trp Val
 420 425 430

Trp Gln Asn Leu Ile Ser Thr Val Lys Tyr Leu His Gln Ser Gly Thr
 435 440 445

Gly Ser Asn Trp Lys Asn Gly Ala Asn Pro Tyr Ser Gly Lys Leu
 450 455 460

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213>Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 15

5

10

Leu Phe Gly Gly Asn Asp Val Ser Val Gln Tyr Arg Met Ile
1 5 10

5 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213>Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 16

Ile Ala Ile Gly Met Ser Gln Ala Ser Ile Gly Leu Asn Val Gln
1 5 10 15

15 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213>Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 17

Gly Ala Asp Met Ile Gly Gly Cys Lys Tyr Leu Trp Leu Gln
1 5 10

25 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213>Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 18

Ala Ser Ser Thr Asp Pro Phe Phe Leu Phe His Asp Tyr Gly Lys
1 5 10 15

40 <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213>Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 19

Leu Ala Met Tyr Trp Ala Ser Ser Ile Phe Asn Thr Asn Val Val Thr
1 5 10 15

50 Leu Gln His
 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT

<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Péptido sintético

10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 25

15

Gln Xaa Xaa His His
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de:
- a) una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4;
 - b) una secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3;
 - 5 c) una secuencia de ácido nucleico que hibrida con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 o un complemento de la misma, en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42 °C y codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5; y
 - d) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con al menos 75% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5,
- 10 en la que la molécula polinucleotídica está unida operativamente con un promotor heterólogo.
2. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 1, que comprende
- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4;
 - (ii) una secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3;
 - 15 (iii) una secuencia de ácido nucleico que hibrida con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 o un complemento de la misma, en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42 °C y codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5; o
 - (iv) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con al menos 75% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 5, o
 - 20 (v) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos uno de los motivos de aminoácidos seleccionados de: SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22 y SEC ID N°: 23.
3. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 1, que comprende además al menos una secuencia polinucleotídica adicional que codifica elongasa o desaturasa de ácidos grasos.
- 25 4. La molécula polinucleotídica de la reivindicación 1, en la que el promotor heterólogo es un promotor potenciado en semillas.
5. Una célula huésped transformada con la molécula polinucleotídica de la reivindicación 1.
6. La célula huésped de la reivindicación 5, en la que
- 30 (i) la célula huésped es una célula vegetal, una célula fúngica o célula bacteriana; o
 - (ii) la célula huésped muestra biosíntesis de ácidos grasos alterada en relación con una célula del mismo genotipo que dicha célula huésped pero que carece de dicha molécula polinucleotídica; o
 - (iii) la célula ha heredado dicha molécula polinucleotídica de un progenitor de la célula.
7. Una planta transgénica o parte de la planta transformada con la molécula polinucleotídica de la reivindicación 1.
- 35 8. La planta transgénica o parte de planta de la reivindicación 7 en la que la planta es seleccionada de canola, *Brassica campestris*, colza oleaginosa, colza, soja, crambe, mostaza, semilla de ricino, cacahuate, sésamo, semilla de algodón, linaza, cártamo, palma aceitera, lino, girasol, maíz, arroz, cebada, mijo, centeno, trigo, avena, alfalfa y sorgo.
9. La planta transgénica o parte de planta de la reivindicación 7, que comprende además al menos un polinucleótido adicional que codifica una desaturasa o elongasa de ácidos grasos, preferentemente la planta transgénica o parte de planta comprende además un polinucleótido que codifica una $\Delta 6$ desaturasa, una $\Delta 6$ elongasa, una $\Delta 18$ elongasa,
- 40 una $\Delta 15$ desaturasa, una $\Delta 9$ elongasa, una $\Delta 8$ desaturasa, una $\Delta 17$ desaturasa, una $\Delta 4$ desaturasa o una C20 elongasa.
10. Una planta descendiente de la planta transgénica de la reivindicación 7, en la que la planta descendiente comprende dicha molécula polinucleotídica.
- 45 11. Una semilla de una planta transgénica de la reivindicación 7, en la que la semilla comprende dicha molécula polinucleotídica.
12. Un procedimiento de producción de una composición de alimento o pienso, que comprende las etapas de:
- (a) obtener la planta transgénica o parte de planta de acuerdo con la reivindicación 7; y
 - (b) producir dicha composición de alimento o pienso.
- 50 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el alimento o pienso es aceite, ensilaje, sémola, grano, almidón, harina o proteína.

FIG. 1 (continuación)

```

210 A S I G L N V Q H D A N H G A V S P S P F M N D L L G - - F G A D M I G G C K Y L W L Q Q H M T - H H r D 5 D
211 A S I G L N V Q H D A N H G A V S A S P F M N D L L G - - F G A D M I G G C K Y L W L Q Q H M T - H H r D 5 D
212 A L P L L H V M H D S S H A A C S S P A M W Q I I G R G V M D W F A G A S M V S W L N Q H V V G H P I D 5 D
213 A Q V G L M P L H D A S H F S V T H N P T V W K I L G - A T H D F F M G A S Y L V M M Y Q H M L G H M a d 5 D
214 Q Q C G W - L A H D F L H H Q V F Q R D R F M G D L F G A F L G G V C Q G F S S S W M K D K H N T - H M a d 6 D
215 A F I G L N V Q H D A N H G A A S K R P W V N D L L G - - S G A D L I G G C K M N W L A Q H M T - H T p D 5 D
216 A F I G L N V Q H D A N H G A A S K K F W I H N L L G - - L S A D F I G G S Y M L M M N Q H M T - H P D 5 D

260 H A F T N D I T R D P D A S S T D P F F L - - - P H D Y G K N G A V R K A V H V F O H F Y M I P V L H r D 5 D
261 H A F T N D I T R D P D A S S T D P F F L - - - F H D Y G K E T P V P K A F H M F Q H F Y M V P V L H r D 5 D
262 H P Y T N V A G A D P D L P V D F - - - E S D V R R I V H R Q V L L P I Y K F Q H I Y L P P P I D 5 D
263 H A A P N V H G E D P D I D T H P L L T W S E H A L E M F S D V P D E L T R M W S R F M V L N Q T M a d 5 D
264 H A Y T N H A D K D P D S F S E P V F H - - - F M D Y P I G H P K R K W M H R F Q G L Y F L I M L T p D 5 D
265 H T Y T E H H E K L P A L G A E F M I L - - - F E D Y P L G H P K E T L I H H F Q A F Y L L F V L P D 5 D

310 A M Y M A S S I F N T N V V T L Q H T G A A D A G M K F G N S Y R E A H R P I S I L L R S L Y L A L H r D 5 D
311 A M Y M A S S I F N T N V V T L Q H A G A A E Z G G M K F A M S Y R E A H R P I S I A L L R S L Y L G L H r D 5 D
312 L Y G V L G L K F R I Q D D V F E T F V S L T N G P V R V N - P H P V S D W V Q M I F A K A F W T F Y P I D 5 D
313 L Y G L L A F K V R I Q D I N I L Y F V K T N D A I R V N - P I S T W H T V M F W G G K A F F V M Y M a d 5 D
314 W F Y F F I L S F A R L S W C L Q S I L F V L P N G Q A H K P S G A R V P I S L V E Q L S L A M H W M a d 6 D
315 S F Y M V S M V F N P Q V I D L R H A G A M Y V G F Q M E N D F I V K R R K Y A M A L R R A M Y F Y F T p D 5 D
316 A G Y M V S V F M P Q I L D L Q H R G A Q A V S M K M E N D Y I A K S E K Y A I F L F L L Y I Y T P D 5 D

360 Y C A S P P T H H H O A - - - T A L L H V W T M A V S E S L T L A I P F A L S H H F L E S E R H P V H r D 5 D
361 Y C A T P F C W H S M P - - - T A L L S H V M T M A V S E S L T L A I P F A L S H H F M E S E P H P V H r D 5 D
362 R I Y I P L W L K I T P - - - S T F M G V F F L A E F T T G W Y L A F N F Q V S H V S T E C E Y P C G P I D 5 D
363 R L Y L A T M P L F I K D P V N M L V Y F L V S Q A V C G N L L A I V P S L M H M G M P V I S K E E M a d 5 D
364 M I Y C P I V N N G L T M - - - S T V G I L L M G V S E S F M L S G L F V L S H N F F M S E R D P T T p D 5 D
365 N I V A E I Q N Q G F S L - - - T V V A H I L L T M G V A S S L T L A T L F A L S H H F E N A D F D F T P D 5 D

```


FIG. 2

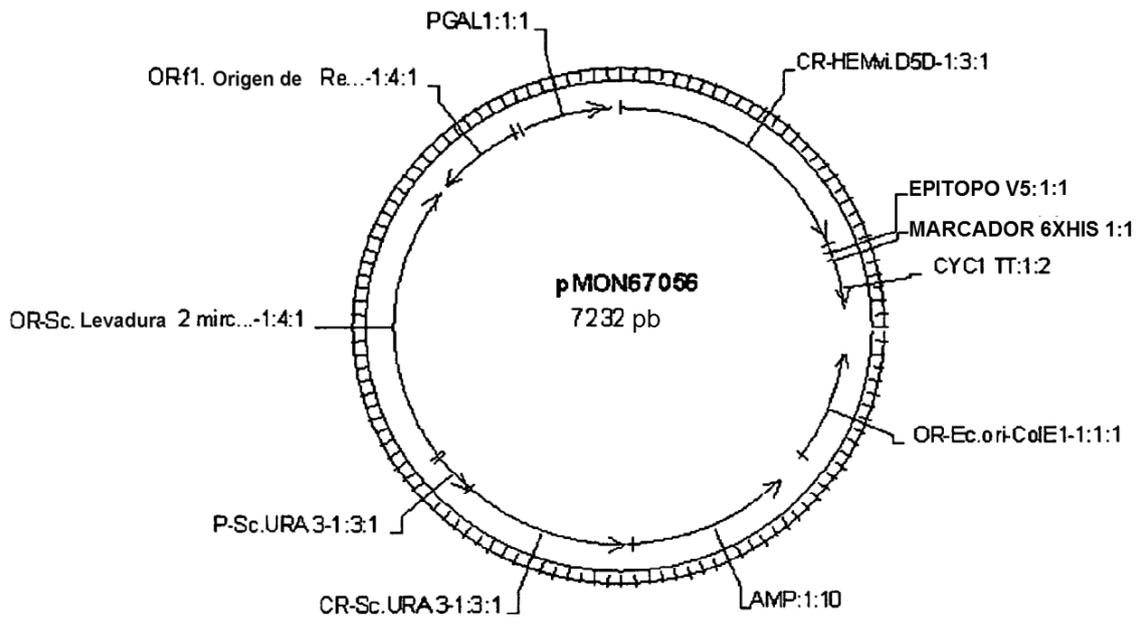


FIG. 3

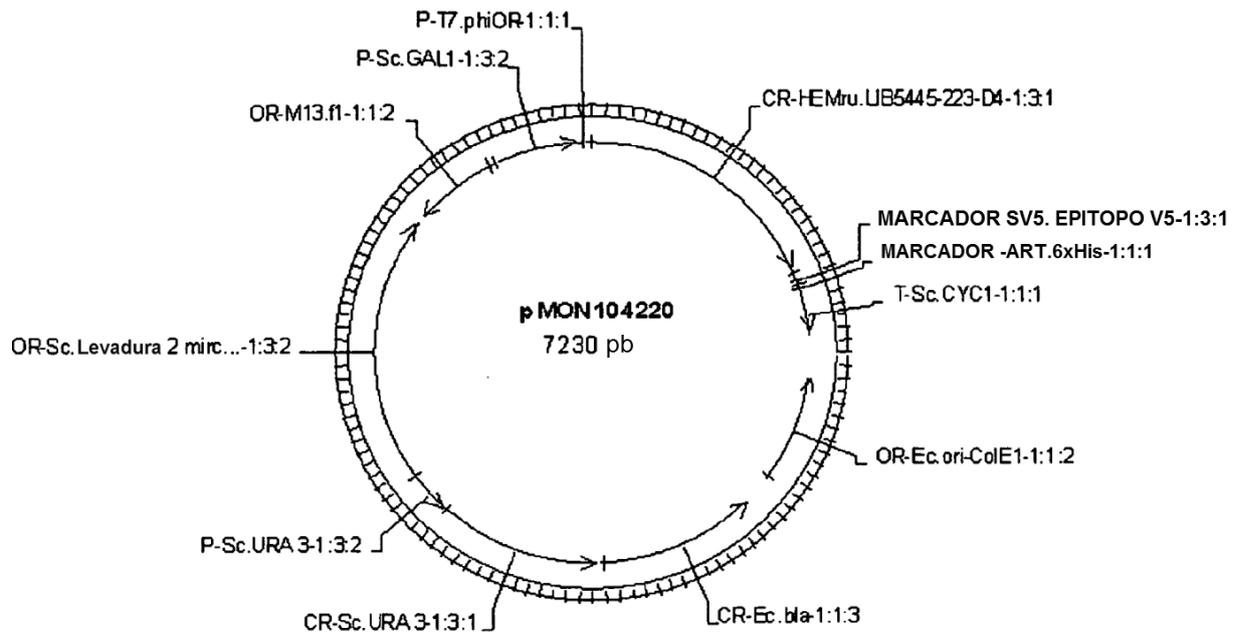


FIG. 4

