

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 351**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2007 E 10195208 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2336334**

54 Título: **Construcciones de ácido nucleico y procedimientos de producción de composiciones de aceite de semillas alteradas**

30 Prioridad:

13.02.2006 US 772614 P

10.03.2006 US 781519 P

16.03.2006 US 376328

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

26.03.2015

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)
Mail Zone E2na 800 North Lindbergh Boulevard
St Louis MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**VOELKER, TONI A.;
FILLATTI, JOANNE J.;
BRINGE, NEAL A. y
ULMASOV, TIM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 532 351 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

Construcciones de ácido nucleico y procedimientos de producción de composiciones de aceite de semillas alteradas

5 Se presentan con la presente una copia en papel del Listado de Secuencias y una forma legible por ordenador del listado de secuencias en disquete, que contiene el archivo llamado "Omni2 AS FILED.txt", que es de 60.690 bytes de tamaño (medido en MS-DOS) y que se registró el 25 de septiembre de 2003 y se presentó en la solicitud de Estados Unidos N° 10/669.888. Se presenta con la presente una copia en papel del Listado de Secuencias y una forma legible por ordenador del listado de secuencias en disquete, que contiene el archivo llamado "OmniChild.txt", que es de 61.434 bytes de tamaño (medido en MS-DOS) y que se registró el 15 de marzo de 2006.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico recombinantes, construcciones y otros agentes asociados con la manipulación coordinada de múltiples genes en la ruta de síntesis de ácidos grasos. En particular, los agentes de la presente invención están asociados con la expresión potenciada simultánea de ciertos genes en la ruta de síntesis de ácidos grasos y expresión suprimida de ciertos otros genes en la misma ruta. La presente invención también se refiere a plantas que incorporan dichos agentes, y en particular a plantas que incorporan
15 dichas construcciones donde las plantas muestran composiciones de aceite de semillas alteradas.

Antecedentes

20 Se usan aceites vegetales en una diversidad de aplicaciones. Son necesarias nuevas composiciones de aceites vegetales y enfoques mejorados para obtener composiciones de aceite, a partir de fuentes vegetales biosintéticas o naturales. Dependiendo del uso pretendido del aceite, se desean diversas composiciones de ácidos grasos diferentes. Las plantas, especialmente especies que sintetizan grandes cantidades de aceites en las semillas, son una fuente importante de aceites para usos tanto comestibles como industriales. Los aceites de semillas están compuestos casi completamente de triacilgliceroles en que los ácidos grasos están esterificados en los tres grupos hidroxilo de glicerol.

25 El aceite de soja típicamente contiene aproximadamente un 16-20 % de ácidos grasos saturados: un 13-16 % de palmitato y un 3-4 % de estearato. Véase en líneas generales Gunstone y col., The Lipid Handbook, Chapman y Hall, Londres (1994). Se han modificado aceites de soja por diversos procedimientos de cultivo para crear beneficios para mercados específicos. Sin embargo, no está disponible un aceite de soja que sea beneficioso en general para usuarios de aceite de soja importantes tales como consumidores de aceite de ensalada, aceite de cocinar y aceite de freír, y mercados industriales tales como los mercados del biodiesel y biolubricante. Los aceites de soja previos
30 eran demasiado caros o carecían de una propiedad de calidad alimentaria importante tal como estabilidad oxidativa, buen sabor en alimentos fritos o contenido en grasas saturadas, o una importante propiedad de los biodiesel tal como emisiones de óxido nítrico apropiadas o tolerancia al frío o flujo en frío.

35 Las plantas superiores sintetizan ácidos grasos mediante una ruta metabólica común, la ruta de la ácido graso sintetasa (FAS), que está localizada en los plástidos. Las β -cetoacil-ACP sintasas son importantes enzimas limitantes de la velocidad en las FAS de células vegetales y existen en varias versiones. La β -cetoacil-ACP sintasa I cataliza la elongación de cadena hasta palmitoil-ACP (C16:0), mientras que la β -cetoacil-ACP sintasa II cataliza la elongación de cadena hasta estearoil-ACP (C18:0). La β -cetoacil-ACP sintasa IV es una variante de la β -cetoacil-ACP sintasa II y también puede catalizar la elongación de cadena hasta 18:0-ACP. En soja, los principales productos de FAS son 16:0-ACP y 18:0-ACP. La desaturación de 18:0-ACP para formar 18:1-ACP está catalizada por una delta-9
40 desaturasa soluble localizada en plástidos (también denominada "estearoil-ACP desaturasa"). Véase Voelker y col., 52 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 335-61 (2001).

45 Los productos de la FAS y delta-9 desaturasa de plástidos, 16:0-ACP, 18:0-ACP y 18:1-ACP, se hidrolizan por tioesterasas específicas (FAT). Las tioesterasas vegetales pueden clasificarse en dos familias de genes basándose en la homología de secuencia y preferencia de sustrato. La primera familia, FATA, incluye acil-ACP tioesterasas de cadena larga que tienen actividad principalmente sobre 18:1-ACP. Las enzimas de la segunda familia, FATB, utilizan habitualmente 16:0-ACP (palmitoil-ACP), 18:0-ACP (estearoil-ACP) y 18:1-ACP (oleoil-ACP). Dichas tioesterasas tienen un papel importante en la determinación de la longitud de cadena durante la biosíntesis de ácidos grasos *de novo* en plantas, y por tanto estas enzimas son útiles en la provisión de diversas modificaciones de composiciones de acilo grasas, particularmente con respecto a las proporciones relativas de diversos grupos acilo grasos que están
50 presentes en aceites de almacenamiento de semillas.

55 Los productos de las reacciones de FATA y FATB, los ácidos grasos libres, dejan los plástidos y se convierten en sus respectivos acil-CoA ésteres. Los acil-CoA son sustratos para la ruta de la biosíntesis de lípidos (ruta de Kennedy), que está localizada en el retículo endoplásmico (RE). Esta ruta es responsable de la formación de lípidos de membrana así como de la síntesis de triacilgliceroles, que constituyen el aceite de las semillas. En el RE hay desaturasas unidas a membrana adicionales, que pueden desaturar adicionalmente 18:1 en ácidos grasos poliinsaturados. Una delta-12 desaturasa (FAD2) cataliza la inserción de un doble enlace en 18:1, formando ácido linoleico (18:2). Una delta-15 desaturasa (FAD3) cataliza la inserción de un doble enlace en 18:2, formando ácido

linolénico (18:3).

- Muchas rutas bioquímicas complejas se han manipulado ahora genéticamente, habitualmente por supresión o sobreexpresión de genes individuales. La explotación adicional del potencial para manipulación genética vegetal requerirá la manipulación coordinada de múltiples genes en una ruta. Se han usado varios enfoques para combinar transgenes en una planta, incluyendo cruce sexual, retransformación, contransformación y el uso de transgenes ligados. Un transgén quimérico con secuencias génicas parciales ligadas puede usarse para suprimir de forma coordinada numerosos genes endógenos vegetales. Pueden usarse construcciones basadas en poliproteínas virales para introducir simultáneamente múltiples genes codificantes en células vegetales. Para una revisión, véase Halpin y col., *Plant Mol. Biol.* 47: 295-310 (2001).
- 5 El documento WO 03/080802 desvela plantas y semillas de soja que muestran un contenido particular de composición de ácidos grasos. Sin embargo, la publicación no desvela una semilla que muestre una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprenda un contenido de ácido oleico del 42 % al 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados del 1,5 % al 8 % en peso de los ácidos grasos totales.
- 10 El documento WO 03/080802 desvela plantas y semillas de soja que muestran un contenido particular de composición de ácidos grasos. Sin embargo, la publicación no desvela una semilla que muestre una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprenda un contenido de ácido oleico del 42 % al 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados del 1,5 % al 8 % en peso de los ácidos grasos totales.
- 15 Todos los documentos WO 2004/001001, WO 01/79499, WO 2004/00871 y WO 2004/001000 desvelan diferentes procedimientos para suprimir genes implicados en la síntesis de ácidos grasos en cultivos de semillas oleaginosas de climas templados tales como soja o algodón. En los documentos WO 2004/001001 y WO 2004/001000 se suprimen FAD2 y FAD3, en el documento WO 01/79499 se suprimen la delta-9 desaturasa y FAD2 y en el documento WO 2004/00871 se suprimen FATB, FAD2 y beta-cetoacil-ACP sintasa. Ninguno de estos enfoques produjo semillas que muestren una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprenda un contenido de ácido oleico del 42 % al 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados del 1,5 % al 8 % en peso de los ácidos grasos totales.
- 20 Por tanto, un fenotipo de planta deseado puede requerir la expresión de uno o más genes y la reducción simultánea de la expresión de otro gen u otros genes. Por tanto, existe la necesidad de sobreexpresar simultáneamente uno o más genes y suprimir, o regular negativamente, la expresión de otro gen o genes en plantas usando una única construcción transgénica.
- 25

Sumario de la invención

- La presente invención proporciona semillas de soja que muestran una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprende un contenido de ácido oleico del 42 % al 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados del 1,5 % al 8 % en peso de los ácidos grasos totales, en las que dichas semillas comprenden además un genoma con una secuencia de ácido nucleico que comprende un fragmento de un intrón FAD2-1 de soja que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos contiguos de longitud y un fragmento de un gen de FATB de soja que es entre aproximadamente 40 y aproximadamente 450 nucleótidos contiguos de longitud.
- 30 La presente invención proporciona además semillas de soja que muestran una composición de aceite que comprende de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 80 % en peso de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % en peso de ácidos grasos saturados, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 45 % en peso de ácido linoleico, de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 14 % en peso de ácido linolénico, en las que una cantidad combinada del ácido oleico y el ácido linolénico es de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 90 % en peso de la composición de aceite total, y la semilla comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ADN que comprende un fragmento del intrón FAD2-1 que es entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400 nucleótidos contiguos de longitud, una región codificante de péptidos de tránsito del cloroplasto FATB, y 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de FATB.
- 35 En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una composición de aceite que comprende producir semillas de soja como se ha descrito anteriormente y procesar la semilla para producir el aceite.
- 40 También se desvelan en el presente documento procedimientos para transformar plantas con moléculas de ácido nucleico recombinantes. Los procedimientos incluyen un procedimiento para producir una planta transformada que tiene semillas con un contenido aumentado de ácido oleico, contenido reducido de ácidos grasos saturados y contenido reducido de ácidos grasos poliinsaturados que comprende (A) transformar una célula vegetal con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un primer conjunto de secuencias de ADN que es capaz, cuando se expresa en una célula huésped, de suprimir la expresión endógena de al menos uno, preferentemente dos, genes seleccionados del grupo que consiste en los genes *FAD2*, *FAD3*, y *FATB*, y un segundo conjunto de secuencias de ADN que es capaz, cuando se expresa en una célula huésped, de aumentar la expresión endógena de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de beta-cetoacil-ACP sintasa I, un gen de beta-cetoacil-ACP sintasa IV, un gen de delta-9 desaturasa y EPSPS CP4; y (B) cultivar la planta transformada, donde la planta transformada produce semillas con un contenido aumentado de ácido oleico, contenido reducido de ácidos
- 45
- 50
- 55

grasos saturados y contenido reducido de ácidos grasos poliinsaturados respecto a semillas de una planta que tiene un fondo genético similar pero que carece de la molécula de ácido nucleico recombinante.

Se desvelan además procedimientos para transformar células vegetales con las moléculas de ácido nucleico recombinantes. Los procedimientos incluyen un procedimiento para alterar la composición del aceite de una célula vegetal que comprende (A) transformar una célula vegetal con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un primer conjunto de secuencias de ADN que es capaz, cuando se expresa en una célula huésped, de suprimir la expresión endógena de al menos uno, preferentemente dos, genes seleccionados del grupo que consiste en los genes *FAD2*, *FAD3*, y *FATB*, y un segundo conjunto de secuencias de ADN que es capaz, cuando se expresa en una célula huésped, de aumentar la expresión endógena de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de beta-cetoacil-ACP sintasa I, un gen de beta-cetoacil-ACP sintasa IV, un gen de delta-9 desaturasa y EPSPS CP4; y (B) cultivar la célula vegetal en condiciones donde se inicie la transcripción del primer conjunto de secuencias de ADN y el segundo conjunto de secuencias de ADN, donde la composición del aceite está alterada respecto a una célula vegetal con un fondo genético similar pero que carece de la molécula de ácido nucleico recombinante.

Se desvela además en el presente documento una planta transformada que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un primer conjunto de secuencias de ADN que es capaz, cuando se expresa en una célula huésped, de suprimir la expresión endógena de al menos uno, preferentemente dos genes seleccionados del grupo que consiste en los genes *FAD2*, *FAD3*, y *FATB*, y un segundo conjunto de secuencias de ADN que es capaz, cuando se expresa en una célula huésped, de aumentar la expresión endógena de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de beta-cetoacil-ACP sintasa I, un gen de beta-cetoacil-ACP sintasa IV, un gen de delta-9 desaturasa y EPSPS CP4. Se desvela además una planta de soja transformada que alberga semillas, donde las semillas muestran una composición de aceite que comprende del 55 al 80 % en peso de ácido oleico, del 10 al 40 % en peso de ácido linoleico, el 6 % o menos en peso de ácido linolénico, y del 2 al 8 % en peso de ácidos grasos saturados, y materia prima, partes vegetales y semillas derivadas de la planta. Otra realización desvelada en el presente documento es una planta de soja transformada que alberga semillas, donde las semillas muestran una composición de aceite que comprende aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 3-8 % de saturados y aproximadamente el 12-32 % de poliinsaturados. También se incluye materia prima, partes vegetales y semillas derivadas de dicha planta. En otra realización, se desvela una planta de soja transformada que alberga semillas, donde las semillas muestran una composición de aceite que comprende aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 2-3,5 % de saturados y aproximadamente el 16,5-33 % de poliinsaturados. También se incluye materia prima, partes vegetales y semillas derivadas de dicha planta.

En una realización adicional se desvelan semillas de soja con una composición de aceite que comprende del 55 al 80 % en peso de ácido oleico, del 10 al 40 % en peso de ácido linoleico, el 6 % o menos en peso de ácido linolénico y del 2 al 8 % en peso de ácidos grasos saturados, y también proporciona una semilla de soja que muestra una composición de aceite que comprende el 65-80 % en peso de ácido oleico, del 10 al 30 % en peso de ácido linoleico, el 6 % o menos en peso de ácido linolénico y del 2 al 8 % en peso de ácidos grasos saturados. En otra realización, se describen semillas de soja que muestran una composición de aceite que comprende aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 3-8 % de saturados, y aproximadamente el 12-32 % de poliinsaturados. Además, se describen semillas de soja que muestran una composición de aceite que comprende aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 2-3,5 % de saturados y aproximadamente el 16,5-33 % de poliinsaturados.

También se desvelan alimentos de soja que comprenden una composición de aceite que comprende del 69 al 73 % en peso de ácido oleico, del 21 al 24 % en peso de ácido linoleico, del 0,5 al 3 % en peso de ácido linolénico y el 2-3 % en peso de ácidos grasos saturados.

El aceite de soja en bruto descrito en el presente documento muestra una composición de aceite que comprende del 55 al 80 % en peso de ácido oleico, del 10 al 40 % en peso de ácido linoleico, el 6 % o menos en peso de ácido linolénico y del 2 al 8 % en peso de ácidos grasos saturados. Otro aceite de soja en bruto descrito en el presente documento muestra una composición de aceite que comprende del 65 al 80 % en peso de ácido oleico, del 10 al 30 % en peso de ácido linoleico, el 6 % o menos en peso de ácido linolénico y del 2 al 8 % en peso de ácidos grasos saturados. En otra realización, el aceite de soja en bruto descrito en el presente documento muestra una composición de aceite que comprende aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 3-8 % de saturados y aproximadamente el 12-32 % de poliinsaturados. En otra realización, el aceite de soja en bruto descrito en el presente documento muestra una composición de aceite que comprende aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 2-3,5 % de saturados y aproximadamente el 16,5-33 % de poliinsaturados.

Se desvelan además semillas de soja que muestran una composición de aceite que comprende de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de ácido oleico y de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % en peso de ácidos grasos saturados. En otra realización, una semilla de soja descrita en el presente documento muestra una composición de aceite que comprende de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de ácido oleico, de aproximadamente el 8% a aproximadamente el 1,5 % en peso de ácidos grasos saturados, menos del 35 % en peso de ácido linolénico, en la que una cantidad combinada

del ácido oleico y el ácido linolénico es de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 90 % en peso de la composición de aceite total; y la semilla tiene una molécula de ácido nucleico recombinante con una secuencia de ADN que tiene un fragmento de intrón *FAD2-1* entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400 nucleótidos contiguos de longitud, una UTR 3' de *FATB* y una UTR 5' de *FATB*, una beta-cetoacil-ACP sintasa IV heteróloga, y una delta-9 desaturasa heteróloga en una célula huésped.

Una semilla de soja descrita en el presente documento puede mostrar una composición de aceite que comprende de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 80 % en peso de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % en peso de ácidos grasos saturados, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 45 % en peso de ácido linoleico, de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 14 % en peso de ácido linolénico, en la que una cantidad combinada del ácido oleico y el ácido linolénico es de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 90 % en peso de la composición de aceite total, y la semilla comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ADN que comprende un fragmento de intrón *FAD2-1* que es entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400 nucleótidos contiguos de longitud, una región codificante de CPT de *FATB*, y 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB*. En otra realización, una semilla de soja puede comprender una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ADN que suprime la expresión endógena de *FAD2* y *FATB*, en la que la semilla muestra una composición de aceite que comprende del 46 al 75 % en peso de ácido oleico, del 1,5 al 8,5 % en peso de ácidos grasos saturados, del 2,5 al 38 % en peso de ácido linoleico y del 4,5 al 17,5 % en peso de ácido linolénico.

La presente invención también incluye un procedimiento para reducir la cantidad de supresión del gen *FAD2* respecto a la cantidad de supresión del gen *FAD2* obtenida expresando una construcción de iARNbc que tiene una secuencia de *FAD2* recombinante que consiste en un intrón de *FAD2* completo o una UTR de *FAD2*: i) expresando una secuencia de *FAD2* recombinante en una célula vegetal, en la que la secuencia de *FAD2* recombinante deriva de un gen *FAD2* endógeno en una célula vegetal y la secuencia de *FAD2* recombinante consiste en un fragmento del intrón de *FAD2* o un fragmento de UTR de *FAD2*; y ii) suprimiendo un gen *FAD2* endógeno con la secuencia de *FAD2* recombinante, en la que la cantidad de supresión del gen *FAD2* es menor que la cantidad de expresión génica obtenida expresando la construcción de iARNbc que tiene una secuencia de *FAD2* recombinante que consiste en la longitud completa de un intrón de *FAD2* o la longitud completa de una UTR de *FAD2*.

También se proporcionan por la presente invención procedimientos para alterar la composición de aceite de una célula vegetal: transformando una célula vegetal con una secuencia de *FAD2* recombinante derivada de parte de un gen *FAD2* endógeno. La secuencia de *FAD2* recombinante consiste en un fragmento de intrón de *FAD2* o un fragmento de UTR de *FAD2*; y cultivando la célula vegetal en condiciones donde se inicia la transcripción de la secuencia de *FAD2* recombinante, mediante lo cual la composición de aceite se altera respecto a una célula vegetal con un fondo genético similar pero que carece de la secuencia de *FAD2* recombinante. En otra realización, un procedimiento para potenciar el contenido de ácido oleico y reducir el contenido de ácidos grasos saturados en una semilla vegetal: i) acortando la longitud de una primera secuencia de *FAD2* recombinante hasta que la cantidad de supresión del gen *FAD2* de una planta transformada con la primera secuencia de *FAD2* recombinante esté reducida al menos parcialmente respecto a la cantidad de supresión del gen *FAD2* en una célula vegetal que comprende un fondo genético similar y una segunda secuencia de *FAD2* recombinante, donde la segunda secuencia de *FAD2* recombinante consiste en una secuencia de *FAD2* más endógena que la primera secuencia de *FAD2* recombinante; ii) expresando una secuencia de *FATB* recombinante capaz de reducir al menos parcialmente la expresión del gen *FATB* en una célula vegetal respecto a la supresión de *FATB* en una célula vegetal con un fondo genético similar pero sin la secuencia de *FATB* recombinante; iii) cultivando una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende la primera secuencia de *FAD2* recombinante y la secuencia de *FATB* recombinante; y iv) cultivando una planta que produce semillas con un contenido reducido de ácidos grasos saturados respecto a semillas de una planta que tiene un fondo genético similar pero que carece de la primera secuencia de *FAD2* recombinante y la secuencia de *FATB* recombinante.

En otra realización más, la presente invención incluye un procedimiento para producir una planta transformada que tiene semillas con un contenido reducido de ácidos grasos saturados: transformando una célula vegetal con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ADN recombinante que suprime la expresión endógena de *FAD2* y *FATB*, donde la secuencia de ADN recombinante tiene una secuencia de ácido nucleico de *FAD2* recombinante y *FATB* recombinante, en el que la secuencia de *FAD2* consiste en menos que la secuencia completa de un intrón de *FAD2*; y cultivando la planta transformada, en el que la planta transformada produce semillas con un contenido reducido de ácidos grasos saturados respecto a semillas de una planta que tiene un fondo genético similar pero que carece de la secuencia de ADN recombinante.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para modular la composición de ácidos grasos del aceite de una semilla de un cultivo de semillas oleaginosas de clima templado aislando un elemento genético de al menos 40 nucleótidos de longitud que es capaz de suprimir la expresión de un gen endógeno en la ruta de síntesis de ácidos grasos; generando más de un fragmento acortado del elemento genético; introduciendo cada uno de los más de un fragmento acortado en una célula vegetal del cultivo de semillas oleaginosas de clima templado para producir plantas transgénicas; y seleccionando una planta transgénica que comprende un fragmento acortado de longitud y secuencia determinadas que logra un cambio deseable en la composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla.

La presente invención también incluye una semilla de soja que muestra una composición de aceite que tiene un contenido muy reducido de ácidos grasos saturados y un contenido moderadamente potenciado de ácido oleico que tiene una secuencia de ADN que suprime la expresión endógena de *FAD2* en una célula vegetal, donde la secuencia de ADN tiene una secuencia de *FAD2* recombinante que consiste en un fragmento de intrón de *FAD2*.

5 Otra realización de la presente invención es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de un intrón *FAD2-1A*, donde el fragmento del intrón *FAD2-1A* es entre aproximadamente 60 y aproximadamente 320 nucleótidos contiguos. En una realización alternativa, la presente invención también incluye una semilla de soja que tiene una primera secuencia de ADN recombinante que suprime la expresión de *FAD2-1* de soja endógeno, que comprende un intrón *FAD2-1* de soja, y una segunda secuencia de ADN recombinante que expresa niveles
10 aumentados de un gen seleccionado del grupo que consiste en *K4SI*, *delta-9 desaturasa*, *KASIV* y combinaciones de los mismos.

La presente invención también incluye una célula vegetal de soja de una semilla de soja que muestra una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de
15 ácidos grasos saturados de menos del 8 % en peso de los ácidos grasos totales. También se incluye en la presente invención una célula vegetal de soja de una semilla de soja que muestra una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de ácidos grasos totales y un contenido de ácido linolénico de menos de aproximadamente el 3 % en peso de los ácidos grasos totales.

20 La presente invención también incluye una molécula de ácido nucleico con una secuencia de un intrón *FAD2-1A*, donde el intrón *FAD2-1A* es entre aproximadamente 60 y aproximadamente 320 nucleótidos contiguos. También se incluye una construcción de ADN recombinante que comprende un fragmento de intrón *FAD2-1* de soja que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos contiguos de longitud y un fragmento del gen *FATB* de soja que es entre aproximadamente 40 y aproximadamente 450 nucleótidos contiguos de longitud. Otra realización
25 incluye una molécula de ácido nucleico recombinante que tiene una primera secuencia de ADN que suprime la expresión endógena de *FAD2-1* y *FATB* de soja, donde la primera secuencia de ADN recombinante incluye un fragmento de intrón *FAD2-1* que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos contiguos de longitud, una UTR 3' de *FATB* de soja, y una UTR 5' o área codificante de CTP de *FATB* de soja, y una segunda secuencia de ADN recombinante que aumenta la expresión de al menos uno de los genes seleccionados del grupo
30 que consiste en *beta-cetoacil-ACP sintasa IV* y *delta-9 desaturasa*.

También se desvela en el presente documento un aceite de soja no mezclado que tiene una composición de ácidos grasos que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados de aproximadamente el 1,5 % a
35 aproximadamente el 8 % en peso de los ácidos grasos totales; un aceite de soja no mezclado que tiene una composición de ácidos grasos que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados de aproximadamente el 8 % o menos en peso de los ácidos grasos totales; un aceite de soja no mezclado que tiene una composición de ácidos grasos que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de ácidos grasos totales y un contenido de ácido linolénico de menos del 3 % en
40 peso de los ácidos grasos totales; y un aceite de soja no mezclado que tiene una composición de ácidos grasos que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de los ácidos grasos totales, un contenido de ácidos grasos saturados de aproximadamente el 8 % o menos en peso de los ácidos grasos totales, y un contenido de ácido linolénico de aproximadamente el 1,5 % o menos en peso de los ácidos grasos totales.

45 También se desvela en el presente documento una harina de soja derivada de una semilla de soja que muestra una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85% en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados de menos del 8 % en peso de los ácidos grasos totales. También se incluye una harina de soja derivada de una semilla de soja que muestra una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que
50 comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85% en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácido linolénico de menos de aproximadamente el 3 % en peso de los ácidos grasos totales.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para reducir la cantidad de supresión del gen *FAD2* respecto a la cantidad de supresión del gen *FAD2* obtenida expresando una construcción de iARNbc que
55 comprende una secuencia de *FAD2* heteróloga que consiste en un intrón de *FAD2* completo o una UTR de *FAD2* completa, incluyendo el procedimiento: i) expresar una secuencia de *FAD2* heteróloga en una célula vegetal, en la que la secuencia de *FAD2* heteróloga deriva de un gen *FAD2* endógeno en una célula vegetal y consiste en un fragmento de intrón de *FAD2* o un fragmento de UTR de *FAD2*; y ii) suprimir un gen *FAD2* endógeno con la secuencia de *FAD2* heteróloga, en el que la cantidad de supresión del gen *FAD2* es menor que la cantidad de
60 expresión del gen obtenida expresando una secuencia de *FAD2* heteróloga que consiste en la longitud completa de un intrón de *FAD2* o la longitud completa de una UTR de *FAD2*.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para alterar la composición de aceite de una célula vegetal transformando una célula vegetal con una secuencia de *FAD2* heteróloga derivada de parte de un gen *FAD2* endógeno, donde la secuencia de *FAD2* heteróloga consiste en un fragmento de intrón de *FAD2* o un fragmento de UTR de *FAD2*; y cultivando la célula vegetal en condiciones en las que se inicia la transcripción de la secuencia de *FAD2* heteróloga, mediante lo cual la composición de aceite se altera respecto a una célula vegetal con un fondo genético similar pero que carece de la secuencia de *FAD2* heteróloga.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para potenciar el contenido de ácido oleico y reducir el contenido de ácidos grasos saturados en una semilla vegetal que comprende i) acortar la longitud de una primera secuencia de *FAD2* heteróloga hasta que la cantidad de supresión del gen *FAD2* de una planta transformada con la primera secuencia de *FAD2* heteróloga esté reducida al menos parcialmente respecto a la cantidad de supresión del gen *FAD2* en una célula vegetal que comprende un fondo genético similar y una segunda secuencia de *FAD2* heteróloga, en la que la segunda secuencia de *FAD2* heteróloga consiste en una secuencia de *FAD2* más endógena que la primera secuencia de *FAD2* heteróloga; ii) expresar una secuencia de *FATB* heteróloga capaz de reducir al menos parcialmente la expresión del gen *FATB* en una célula vegetal respecto a la supresión de *FATB* en una célula vegetal con un fondo genético similar pero sin la secuencia de *FATB* heteróloga; iii) cultivar una planta que comprende un genoma con la primera secuencia de *FAD2* heteróloga y la secuencia de *FATB* heteróloga; y iv) cultivar una planta que produce semillas con un contenido reducido de ácidos grasos saturados respecto a semillas de una planta que tiene un fondo genético similar pero que carece de la primera secuencia de *FAD2* heteróloga y la secuencia de *FATB* heteróloga.

Se describe también en el presente documento una molécula de ácido nucleico heteróloga que comprende un fragmento del intrón *FAD2-1* de soja que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos contiguos de longitud y un fragmento del gen *FATB* de soja que es entre aproximadamente 40 y aproximadamente 450 nucleótidos contiguos de longitud. Se describe además en el presente documento una molécula de ácido nucleico heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende un fragmento del intrón *FAD2-1* de soja que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos de longitud, un fragmento de un gen *FATB* de soja que es entre aproximadamente 40 y aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, y una secuencia de ácido nucleico que aumenta la expresión de una de beta-cetoacil-ACP sintasa IV y delta-9 desaturasa o ambas.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para reducir el contenido de ácido linolénico de una semilla de soja i) introduciendo en una célula de soja una molécula de ácido nucleico heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos dos miembros de la familia del gen *FAD3*; ii) expresando una secuencia de ácido nucleico de un gen *FAD3* capaz de reducir al menos parcialmente la expresión del gen *FAD3* endógeno en una célula vegetal; iii) cultivando una célula vegetal que comprende un genoma con la secuencia de ácido nucleico de al menos dos miembros de la familia del gen *FAD3*; y iv) cultivando la célula vegetal con un contenido reducido de ácido linolénico respecto a una célula vegetal que tiene un fondo genético similar pero que carece de los al menos dos miembros de la familia del gen *FAD3*. Se describe además en el presente documento una construcción de ADN recombinante con fragmentos de ADN de la menos dos miembros de la familia del gen *FAD3*.

Se describe además en el presente documento un aceite de soja no mezclado que tiene una composición de ácidos grasos que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de los ácidos grasos totales, un contenido de ácidos grasos saturados de aproximadamente el 8 % o menos en peso de los ácidos grasos totales, y un contenido de ácido linolénico de aproximadamente el 1,5 % o menos en peso de los ácidos grasos totales.

Breve descripción de los dibujos

Las FIGURAS 1-4 representan cada una configuraciones ejemplares de moléculas de ácido nucleico.

Las FIGURAS 5(a)-(d) y 6(a)-(c) representan cada una configuraciones ilustrativas de un primer conjunto de secuencias de ADN.

Las FIGURAS 7-20 representan cada una moléculas de ácido nucleico.

La FIGURA 21 representa la construcción pMON68537.

La FIGURA 22 representa la construcción pMON68539.

Descripción detallada de la invención

Descripción de las secuencias de ácido nucleico

SEC ID N°: 1 es una secuencia de ácido nucleico de un intrón 1 de *FAD2-1A*.

SEC ID N°: 2 es una secuencia de ácido nucleico de un intrón 1 de *FAD2-1B*.

- SEC ID N°: 3 es una secuencia de ácido nucleico de un promotor de *FAD2-1B*.
- SEC ID N°: 4 es una secuencia de ácido nucleico de un clon genómico de *FAD2-1A*.
- SEC ID N°: 5 y 6 son secuencias de ácido nucleico de una UTR 3' y UTR 5' de *FAD2-1A*, respectivamente.
- 5 SEC ID N°: 7-13 son secuencias de ácido nucleico de los intrones de *FAD3-JA* 1, 2, 3A, 4, 5, 3B y 3C, respectivamente.
- SEC ID N°: 14 es una secuencia de ácido nucleico del intrón 4 de *FAD3-1C*.
- SEC ID N°: 15 es una secuencia de ácido nucleico de un clon genómico de *FAD3-1A* parcial.
- SEC ID N°: 16 y 17 son secuencias de ácido nucleico de una UTR 3' y UTR 5' de *FAD3-1A*, respectivamente.
- SEC ID N°: 18 es una secuencia de ácido nucleico de un clon genómico de *FAD3-1B* parcial.
- 10 SEC ID N°: 19-25 son secuencias de ácido nucleico de los intrones de *FAD3-1B* 1, 2, 3A, 3B, 3C, 4 y 5, respectivamente.
- SEC ID N°: 26 y 27 son secuencias de ácido nucleico de una UTR 3' y UTR 5' de *FAD3-1B*, respectivamente.
- SEC ID N°: 28 es una secuencia de ácido nucleico de un clon genómico de *FATB-1*.
- 15 SEC ID N°: 29-35 son secuencias de ácido nucleico de los intrones de *FATB-1* I, II, III, IV, V, VI y VII, respectivamente.
- SEC ID N°: 36 y 37 son secuencias de ácido nucleico de una UTR 3' y UTR 5' de *FATB-1*, respectivamente.
- SEC ID N°: 38 es una secuencia de ácido nucleico de un gen *KAS I* de *Cuphea pulcherrima*.
- SEC ID N°: 39 es una secuencia de ácido nucleico de un gen *KAS IV* de *Cuphea pulcherrima*.
- 20 SEC ID N°: 40 y 41 son secuencias de ácido nucleico de genes de delta-9 desaturasa de *Ricinus communis* y *Simmondsia chinensis*, respectivamente.
- SEC ID N°: 42 es una secuencia de ácido nucleico de un ADNc de *FATB-2*.
- SEC ID N°: 43 es una secuencia de ácido nucleico de un clon genómico de *FATB-2*.
- SEC ID N°: 44-47 son secuencias de ácido nucleico de los intrones de *FATB-2* I, II, III y IV respectivamente.
- SEC ID N°: 48-60 son secuencias de ácido nucleico de cebadores de PCR.
- 25 SEC ID N°: 61 y 62 son secuencias de ácido nucleico de UTR 3' y UTR 5' de *FAD3-1C* de soja, respectivamente.

Definiciones

- 30 "ACP" se refiere a un resto de proteína vehículo de acilo. "Composición de aceite de semilla alterada" se refiere a una composición de aceite de semilla de una planta transgénica o transformada de la invención que tiene niveles alterados o modificados de los ácidos grasos en la misma, respecto a un aceite de semilla de una planta que tiene un fondo genético similar pero que no se ha transformado.
- "Supresión antisentido" se refiere a silenciamiento específico de gen que se induce por la introducción de una molécula de ARN antisentido.
- 35 La "coexpresión de más de un agente tal como un ARNm o proteína" se refiere a la expresión simultánea de un agente en marcos temporales solapantes y en la misma célula o tejido que otro agente. La "expresión coordinada de más de un agente" se refiere a la coexpresión de más de un agente cuando la producción de transcritos y proteínas de dichos agentes se lleva a cabo utilizando un promotor compartido o idéntico.
- El "complemento" de una secuencia de ácido nucleico se refiere al complemento de la secuencia a lo largo de su longitud completa.
- 40 La "cosupresión" es la reducción en niveles de expresión, habitualmente al nivel del ARN, de un gen o familia de genes endógeno particular por la expresión de una construcción con sentido homóloga que es capaz de transcribir ARNm de la misma cadena que el transcrito del gen endógeno. Napoli y col., Plant Cell 2: 279-289 (1990); van der Krol y col., Plant Cell 2: 291-299 (1990).
- El "aceite de soja en bruto" se refiere a aceite de soja que se ha extraído de semillas de soja, pero no se ha refinado, procesado o mezclado, aunque puede estar desgomado.

El "CTP" se refiere a un péptido de tránsito de cloroplastos, codificado por la "secuencia codificante de péptido de tránsito de cloroplastos".

Cuando se hace referencia a proteínas y ácidos nucleicos en el presente documento, "derivado" se refiere a obtener directamente (por ejemplo, mirando la secuencia de una proteína o ácido nucleico conocido y preparando una proteína o ácido nucleico que tenga una secuencia similar, al menos en parte, a la secuencia de la proteína o ácido nucleico conocido) o indirectamente (por ejemplo, obteniendo una proteína o ácido nucleico de un organismo que está relacionado con una proteína o ácido nucleico conocido) una proteína o ácido nucleico de una proteína o ácido nucleico conocido. Un experto en la materia conoce otros procedimientos para "derivar" una proteína o ácido nucleico de una proteína o ácido nucleico conocido.

ARN bicatenario ("ARNbc"), interferencia por ARN bicatenario ("iARNbc") e interferencia por ARN ("iARN") se refieren todos a silenciamiento específico de genes que se induce por la introducción de una construcción capaz de transcribir una molécula de ARN al menos parcialmente bicatenaria. Una "molécula de ARNbc" y una "molécula de iARN" se refieren ambas a una región de una molécula de ARN que contiene segmentos con secuencias de nucleótidos complementarias y por lo tanto pueden hibridar entre sí y formar ARN bicatenario. Dichas moléculas de ARN bicatenario son capaces, cuando se introducen en una célula u organismo, de reducir al menos parcialmente el nivel de una especie de ARNm presente en una célula o una célula de un organismo. Además, el ARNbc puede crearse después de ensamblaje *in vivo* de fragmentos de ADN apropiados mediante recombinación ilegítima y recombinación específica de sitio como se describe en la Solicitud Internacional N° PCT/US2005/004681, presentada el 11 de febrero de 2005.

"Exón" se refiere al sentido normal del término que significa un segmento de moléculas de ácido nucleico, habitualmente ADN, que codifica parte de o toda una proteína expresada.

"Ácido graso" se refiere a ácidos grasos libres y grupos de acilo graso.

"Gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que abarca una región promotora 5' asociada con la expresión del producto génico, cualquier región intrónica y exónica y regiones no traducidas 3' o 5' asociadas con la expresión del producto génico.

"Silenciamiento génico" se refiere a la supresión de la expresión génica o regulación negativa de la expresión génica.

Una "familia génica" es dos o más genes en un organismo que codifican proteínas que muestran atributos funcionales similares, y un "miembro de una familia génica" es cualquier gen de la familia génica hallado dentro del material genético de la planta, por ejemplo, un "miembro de la familia génica de FAD2" es cualquier gen FAD2 hallado dentro del material genético de la planta. Un ejemplo de dos miembros de una familia génica son FAD2-1 y FAD2-2. Una familia génica puede clasificarse adicionalmente por la similitud de las secuencias de ácido nucleico. Un gen, FAD2, por ejemplo, incluye alelos en ese locus. Preferentemente, un miembro de una familia génica muestra al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 % de identidad de secuencias de ácido nucleico en la parte de secuencia codificante del gen.

"Heterólogo" significa que no aparecen de forma natural juntos.

Se dice que una molécula de ácido nucleico se "introduce" si se inserta en una célula u organismo como resultado de la manipulación humana, independientemente de lo indirecta que sea. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico introducidas incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos que se han introducido en células mediante transformación, transfección, inyección y proyección, y las que se han introducido en un organismo mediante procedimientos incluyendo, pero sin limitación, conjugación, endocitosis y fagocitosis.

"Intrón" se refiere al sentido normal del término que significa un segmento de moléculas de ácido nucleico, habitualmente ADN, que no codifica parte de o toda una proteína expresada, y que, en condiciones endógenas, se transcribe en moléculas de ARN, pero que se separa por corte y ajuste del ARN endógeno antes de que el ARN se traduzca a una proteína. Una "molécula de ARNbc intrónica" y una "molécula de iARN intrónica" se refieren ambas a una molécula de ARN bicatenario capaz, cuando se introduce en una célula u organismo, de reducir al menos parcialmente el nivel de una especie de ARNm presente en una célula o una célula de un organismo cuando la molécula de ARN bicatenario muestre suficiente identidad con un intrón de un gen presente en la célula u organismo para reducir el nivel de un ARNm que contiene esa secuencia de intrón.

Una composición de aceite "saturado bajo" contiene entre el 3,6 y el 8 por ciento de ácidos grasos saturados.

Una "semilla de soja medio oleico" es una semilla que tiene entre el 50 % y el 85 % de ácido oleico presente en la composición de aceite de la semilla.

Una composición de aceite "de bajo linolénico" contiene menos de aproximadamente el 3 % de ácido linolénico en peso de los ácidos grasos totales.

La expresión "no codificante" se refiere a secuencias de moléculas de ácido nucleico que no codifican parte de o toda una proteína expresada. Las secuencias no codificantes incluyen pero sin limitación intrones, regiones promotoras, regiones no traducidas 3' (UTR 3') y regiones no traducidas 5' (UTR 5').

La expresión "composición de aceite" se refiere a los niveles de ácidos grasos.

- 5 Un promotor que está "unido de forma funcional" con una o más secuencias de ácido nucleico es capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias de ácido nucleico, incluyendo múltiples secuencias de ácido nucleico codificantes o no codificantes dispuestas en una configuración policistrónica.

Las secuencias de ácido nucleico "unidas físicamente" son secuencias de ácido nucleico que se encuentran en una única molécula de ácido nucleico.

- 10 Una "planta" incluye referencias a plantas completas, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células vegetales y descendencia de las mismas.

La expresión "célula vegetal" incluye, sin limitación, cultivos en suspensión de semillas, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas.

- 15 Los "promotores vegetales" incluyen, sin limitación, promotores virales vegetales, promotores derivados de plantas y promotores sintéticos capaces de funcionar en una célula vegetal para promover la expresión de un ARNm.

- 20 Un "gen policistrónico" o "ARNm policistrónico" es cualquier gen o ARNm que contenga secuencias de ácido nucleico transcritas que correspondan a secuencias de ácido nucleico de más de un gen diana de supresión o expresión. Se entiende que dichos genes o ARNm policistrónicos pueden contener secuencias que corresponden a intrones, UTR 5', UTR 3', secuencias codificantes de péptidos de tránsito, exones o combinaciones de los mismos, y que un gen o ARNm policistrónico recombinante podría, por ejemplo, sin limitación, contener secuencias que correspondan a una o más UTR de un gen y uno o más intrones de un segundo gen.

- 25 Un "promotor específico de semilla" se refiere a un promotor que está activo preferentemente o exclusivamente en una semilla. La "actividad preferente" se refiere a una actividad promotora que es sustancialmente mayor en la semilla que en otros tejidos, órganos u orgánulos de la planta. "Específico de semilla" incluye sin limitación actividad en la capa de aleurona, endosperma y/o embrión de la semilla.

"Supresión de intrón con sentido" se refiere a silenciamiento génico que se induce por la introducción de un intrón con sentido o fragmento del mismo. La supresión de intrón con sentido se describe, por ejemplo, por Fillatti en el documento PCT WO 01/14538 A2.

- 30 "Expresión simultánea" de más de un agente tal como un ARNm o una proteína se refiere a la expresión de un agente a la vez que otro agente. Dicha expresión puede solaparse solamente en parte y también puede producirse en diferente tejido o a diferentes niveles.

"Nivel de aceite total" se refiere a la cantidad agregada total de ácido graso independientemente del tipo de ácido graso. Como se usa en el presente documento, el nivel de aceite total no incluye la cadena principal de glicerol.

- 35 "Transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico asociada con la expresión de un gen introducido en un organismo. Un transgén incluye, pero sin limitación, un gen endógeno o un gen que no aparece de forma natural en el organismo. Una "planta transgénica" es cualquier planta que incorpore de forma estable un transgén de una manera que facilite la transmisión de ese transgén de una planta por cualquier procedimiento sexual o asexual.

Una composición de aceite de "cero saturados" contiene menos del 3,6 por ciento de ácidos grasos saturados.

- 40 Cuando se hace referencia a proteínas y ácidos nucleicos en el presente documento, el uso de mayúsculas normales, por ejemplo, "FAD2", indica una referencia a una enzima, proteína, polipéptido o péptido, y el uso de mayúsculas en cursiva, por ejemplo, "FAD2", se usa para referirse a ácidos nucleicos, incluyendo sin limitación genes, ADNc y ARNm. Una célula u organismo puede tener una familia de más de un gen que codifica una enzima particular, y la letra mayúscula que sigue la terminología génica (A, B, C) se usa para designar el miembro de la familia, es decir, *FAD2-1A* es un miembro de la familia génica diferente de *FAD2-1B*.

- 45 Como se usa en el presente documento, cualquier intervalo expuesto incluye los puntos finales del intervalo a no ser que se indique de otro modo.

A. Agentes

- 50 Los agentes desvelados en el presente documento serán preferentemente "biológicamente activos" con respecto a un atributo estructural, tal como la capacidad de una molécula de ácido nucleico de hibridar con otra molécula de ácido nucleico, o la capacidad de una proteína de unirse con un anticuerpo (o de competir con otra molécula por dicha unión). Como alternativa, dicho atributo puede ser catalítico y por tanto implicar la capacidad del agente de mediar una reacción química o respuesta. Los agentes preferentemente estarán "sustancialmente purificados". La

expresión "sustancialmente purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula separada sustancialmente de todas las otras moléculas normalmente asociadas con ella en sus condiciones ambientales nativas. Más preferentemente una molécula sustancialmente purificada es la especie predominante presente en una preparación. Una molécula sustancialmente purificada puede estar más del 60 % libre, más del 75 % libre, preferentemente más del 90 % libre, y más preferentemente más del 95 % libre de las otras moléculas (excluyendo el disolvente) presentes en la mezcla natural. No se pretende que la expresión "sustancialmente purificado" abarque moléculas presentes en sus condiciones ambientales nativas.

Los agentes también pueden ser recombinantes. Como se usa en el presente documento, el término "recombinante" significa cualquier agente (por ejemplo, incluyendo pero sin limitación ADN o péptidos), que es, o resulta, sin importar lo indirectamente que sea, de la manipulación genética de una molécula de ácido nucleico. También se entiende que los agentes de la invención pueden marcarse con reactivos que facilitan la detección del agente, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores químicos y/o bases modificadas.

Los agentes incluyen moléculas de ADN que tienen una secuencia de nucleótidos que puede transcribirse en orientaciones con sentido y antisentido que forman al menos una molécula de ARN que es, al menos en parte, bicatenaria. En una realización preferida, un agente es una molécula de ARN bicatenario que tiene una secuencia de nucleótidos que es un fragmento de *FAD2*, *FATB*, o *FAD2* y *FATB*. En otra realización, un agente es una molécula de ADN capaz de transcribirse para producir orientaciones con sentido y antisentido de una secuencia de nucleótidos en una célula huésped. En otra realización, una molécula de ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos en una orientación con sentido y en una orientación antisentido, o en otra realización, una molécula de ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos en una orientación con sentido o una orientación antisentido. Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar unidas de forma funcional al mismo promotor, diferentes promotores, un promotor individual, o más de un promotor. Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar en una única molécula de ADN o más de una molécula de ADN.

Los agentes incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ADN que es al menos un 50 %, un 60 % o un 70 % idéntica sobre su longitud completa a una región codificante o región no codificante de la planta, o a una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de una región codificante o no codificante de la planta. Se prefieren más secuencias de ADN que son, sobre su longitud completa, al menos un 80 % idénticas; al menos un 85 % idénticas; al menos un 90 % idénticas; al menos un 95 % idénticas; al menos un 97 % idénticas; al menos un 98 % idénticas; al menos un 99 % idénticas; o un 100 % idénticas a una región codificante o región no codificante de la planta, o a una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de una región codificante o no codificante de la planta.

"Identidad", como se entiende bien en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias moleculares de ácido nucleico, que se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o de moléculas de ácido nucleico, que se determina por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. La "identidad" puede calcularse fácilmente por procedimientos conocidos incluyendo, pero sin limitación, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, ed., Oxford University Press, Nueva York 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, ed., Academic Press, Nueva York 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin y Griffin, eds., Humana Press, Nueva Jersey 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, Academic Press 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov y Devereux, eds., Stockton Press, Nueva York 1991; y Carillo y Lipman, *SIAM J. Applied Math*, 48: 1073 1988.

Se diseñan procedimientos para determinar la identidad que proporcionen la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Además, están codificados en programas públicamente disponibles procedimientos para determinar la identidad. Los programas informáticos que puede usarse para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, GCG; un conjunto de cinco programas de BLAST, tres diseñados para consultas de secuencias de nucleótidos (BLASTN, BLASTX y TBLASTX) y dos diseñados para consultas de secuencias de proteínas (BLASTP y TBLASTN). El programa BLASTX está públicamente disponible en el NCBI y otras fuentes, por ejemplo, *BLAST Manual*, Altschul y col., NCBI NLM NIH, Bethesda, MD 20894; Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). El algoritmo de Smith Waterman bien conocido también puede usarse para determinar la identidad.

Los parámetros para comparación de secuencias polipeptídicas típicamente incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919 (1992); Penalización de Hueco: 12; Penalización de Longitud de Hueco: 4. Un programa que puede usarse con estos parámetros está públicamente disponible como programa "gap" de Genetics Computer Group ("GCG"), Madison, Wisconsin. Los parámetros anteriores junto con la ausencia de penalización de hueco final son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos.

Los parámetros para comparación de secuencias de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias - +10; faltas de coincidencia = 0; Penalización de Hueco: 50; Penalización de Longitud de Hueco: 3. Como se usa en el presente documento, el "% de identidad" se determina usando los parámetros anteriores como los parámetros por defecto

para comparaciones de secuencias de moléculas de ácido nucleico y el programa "gap" de GCG, versión 10.2.

- Subconjuntos de las secuencias de ácido nucleico incluyen moléculas de ácido nucleico fragmentarias. "Molécula de ácido nucleico fragmentaria" se refiere a un trozo de una molécula de ácido nucleico más grande, y puede consistir en una parte o partes significativas de, o de hecho la mayoría de, la molécula de ácido nucleico más grande. La molécula de ácido nucleico fragmentaria puede comprender un oligonucleótido más pequeño que tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 400 nucleótidos contiguos y más preferentemente, de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 nucleótidos contiguos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 nucleótidos contiguos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos contiguos, de aproximadamente 21 a aproximadamente 30 nucleótidos contiguos, de aproximadamente 21 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos, de aproximadamente 21 a aproximadamente 24 nucleótidos contiguos, de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos, o de aproximadamente 21 nucleótidos contiguos. Las moléculas de ácido nucleico fragmentarias pueden consistir en una parte o partes significativas de, o de hecho la mayor parte de, una región codificante o no codificante de planta, o como alternativa pueden comprender oligonucleótidos más pequeños. En una realización preferida, un fragmento muestra el 100 % de identidad con la región codificante o no codificante de planta. En otra realización preferida, un fragmento comprende una parte de una secuencia de ácido nucleico más grande. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico fragmentaria tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 15, 25, 50, 100, 200, 300 o 400 nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico. En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 15, 25, 50, 100, 200, 300 o 400 nucleótidos contiguos de una región codificante o no codificante de planta. En una realización más preferida, una molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene aproximadamente el 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % de los nucleótidos contiguos de una región codificante o no codificante completa. En una realización preferida, una región codificante o no codificante completa puede ser un elemento génico seleccionado de un gen completo, un exón individual, un intrón individual, una secuencia señal, o una región no traducida (UTR). Un elemento génico que no tiene la secuencia completa de un elemento génico completo puede ser un fragmento de un elemento génico. En un aspecto preferido un elemento génico es de al menos 40 nucleótidos de longitud. En un aspecto un fragmento de un gen es una parte del elemento génico completo y dicho fragmento contiene nucleótidos contiguos de aproximadamente el 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % del elemento génico completo. En un aspecto una molécula de ácido nucleico fragmentaria es entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 70 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 90 % de la longitud de un elemento génico completo.
- En una realización preferida, un fragmento de intrón de *FAD2-1* es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420, aproximadamente 30 y aproximadamente 420, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 320, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 420, entre aproximadamente 60 y aproximadamente 320, aproximadamente 70 y aproximadamente 220, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 320, entre aproximadamente 150 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 150 y aproximadamente 220, entre aproximadamente 150 y aproximadamente 400, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 300, o entre aproximadamente 300 y aproximadamente 400 nucleótidos contiguos. En otra realización preferida, un fragmento de intrón de *FAD2-1* es de aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 220, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 320 o aproximadamente 350 nucleótidos contiguos de longitud. En otra realización preferida, un fragmento de intrón de *FAD2-1* está reducido en longitud en aproximadamente 20, aproximadamente 40, aproximadamente 60, aproximadamente 80, aproximadamente 100, aproximadamente 120, aproximadamente 140, aproximadamente 160, aproximadamente 180, aproximadamente 200, aproximadamente 220, aproximadamente 240, aproximadamente 260, aproximadamente 280, aproximadamente 290, aproximadamente 300, aproximadamente 320, aproximadamente 340, aproximadamente 360, aproximadamente 380, aproximadamente 400 nucleótidos contiguos en comparación con la longitud de la SEC ID N°: 1. Para todos estos fragmentos de intrón de *FAD2-1*, el truncamiento o la delección puede comenzar en el extremo 5', comenzar en el extremo 3', o ser interno de un intrón de *FAD2-1*. Para todos estos fragmentos de intrón de *FAD2-1*, la secuencia de un intrón de *FAD2-1* puede ser la SEC ID N°: 1.
- En una realización preferida, un fragmento de un gen *FATB* es de aproximadamente 80 a aproximadamente 450, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, de aproximadamente 70 a aproximadamente 500, de aproximadamente 200 a aproximadamente 400, de aproximadamente 150 a aproximadamente 300, de aproximadamente 250 a aproximadamente 350, de aproximadamente 200 a aproximadamente 350 nucleótidos contiguos de un gen *FATB*. En una realización preferida, un fragmento de *FATB* deriva de la mitad de los nucleótidos totales en *FATB* que comienzan en el extremo 5'. Para todos estos fragmentos de *FATB*, el truncamiento o delección puede comenzar en el extremo 5', comenzar en el extremo 3', o ser interno de *FATB*. En una realización preferida, un fragmento de *FATB* deriva de la mitad de los nucleótidos totales en *FATB* que comienza en el extremo 5' de *FATB*, deriva de un tercio de los nucleótidos totales en *FATB* que están más cerca del extremo 5'. En una

realización particularmente preferida, un fragmento de *FATB* contiene una secuencia que codifica un péptido de tránsito, que codifica preferentemente el péptido de tránsito de cloroplastos. En una realización particularmente preferida, un fragmento de *FATB* es un fragmento de una secuencia que codifica un péptido de tránsito, que preferentemente codifica el péptido de tránsito de cloroplastos. En otra realización particularmente preferida, un fragmento de *FATB* incluye además aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, 38, 39, 40, 41, 42, 43, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55 o aproximadamente 60 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB*. En una realización más preferida, un fragmento incluye una combinación de dos o más fragmentos discontinuos o elementos génicos separados, tal como una UTR 3' de *FATB* fusionada con una UTR 5' de *FATB*. Los agentes incluyen moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, los agentes incluyen moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, sin limitación, en un aspecto la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de intrón de la SEC ID N°: 19, 20, 21, 22, 23, 25, 32, 33, 34, 35, 44, 45, 46 o 47 o fragmentos de la misma o complementos de la misma. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que cuando se introduce en una célula u organismo, es capaz de suprimir la producción de un ARN o proteína expresando, coexpresando o expresando de forma coordinada simultáneamente otro ARN o proteína. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que cuando se introduce en una célula u organismo es capaz de suprimir, recudir al menos parcialmente, reducir, reducir sustancialmente, o eliminar eficazmente la expresión de ARN de *FAD2*, *FAD3* y/o *FATB* endógeno coexpresando, expresando simultáneamente o expresando de forma coordinada al mismo tiempo al menos uno de beta-cetoacil-ACP sintasa I, beta-cetoacil-ACP sintasa IV, delta-9 desaturasa, y/o ARN o proteína de EPSPS CP4.

Suprimiendo, reduciendo al menos parcialmente, reduciendo, reduciendo sustancialmente o eliminando eficazmente la expresión de al menos uno o más genes endógenos, la cantidad de *FAD2* y/o *FAD3* disponible en una célula vegetal se reduce, es decir se reducen los niveles en estado estacionario de la proteína, y puede proporcionarse un porcentaje reducido de ácidos grasos poliinsaturados tales como linoleato (C18:2) y linolenato (C18:3). Las modificaciones en la combinación de ácidos grasos disponibles para su incorporación en triacilglicérols pueden afectar de forma similar a la composición de los aceites en la célula vegetal. Por lo tanto, una reducción de la expresión de *FAD2* y/o *FAD3* puede dar como resultado un aumento de la proporción de ácidos grasos monoinsaturados tales como oleato (C18:1). Cuando se reduce la cantidad de *FATB* en una célula vegetal, puede proporcionarse una cantidad reducida de ácidos grasos saturados tales como palmitato y estearato. Por tanto, una reducción de la expresión de *FATB* puede dar como resultado un aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados tales como oleato (18:1). La supresión simultánea de la expresión de *FAD2*, *FAD3* y *FATB* da como resultado de este modo que la ruta FAS se dirija hacia un aumento general de ácidos grasos monoinsaturados de 18 carbonos de longitud, tales como oleato (C18:1). Véase la patente de Estados Unidos N° 5.955.650.

Aumentando la cantidad de beta-cetoacil-ACP sintasa I (KAS I) y/o beta-cetoacil-ACP sintasa IV (KAS IV) disponibles en una célula vegetal, puede proporcionarse un porcentaje reducido de ACP 16:0, lo que conduce a un aumento del porcentaje de ACP 18:0. Una cantidad mayor de ACP 19:0 en combinación con la supresión simultánea de uno o más de *FAD2*, *FAD3* y *FATB*, ayuda por lo tanto a dirigir la composición oleosa hacia un aumento general del oleato (C18:1). Aumentando la cantidad de delta-9 desaturasa disponible en una célula vegetal, puede proporcionarse un porcentaje aumentado de ácidos grasos insaturados, dando como resultado una reducción general de estearato y saturados totales.

Estas combinaciones de expresión aumentada y reducida de enzimas pueden manipularse para producir composiciones oleosas, incluyendo ácidos grasos, que tengan un nivel aumentado de oleato, niveles reducidos de linoleato, linolenato, estearato y/o palmitato, y un nivel general reducido de saturados. La potenciación de la expresión génica en plantas puede producirse mediante la introducción de copias adicionales de secuencias codificantes de los genes en la célula vegetal o, preferentemente, la incorporación de copias adicionales de secuencias codificantes del gen en el genoma vegetal. También puede producirse sobreexpresión mediante el aumento de las actividades de los mecanismos reguladores que regulan la expresión de genes, es decir, la regulación positiva de la expresión génica.

La producción de EPSPS CP4 en una célula vegetal proporciona a la célula vegetal resistencia o tolerancia a glifosato, proporcionando de este modo un procedimiento conveniente para la identificación de transformantes exitosos mediante selección tolerante a glifosato.

La supresión de la expresión génica en plantas, también conocida como silenciamiento génico, se produce tanto a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional. Hay diversos procedimientos para la supresión de la expresión de secuencias endógenas en una célula huésped, incluyendo, pero sin limitación, supresión antisentido, cosupresión, ribozimas, combinaciones de sentido y antisentido (iARN bicatenario), silenciamiento de promotores y proteínas de unión a ADN tales como proteínas en dedos de zinc (véanse por ejemplo, documentos WO 98/53083, WO 01/14538, y patente de Estados Unidos 5.759.829 (Shewmaker.)). Algunos de estos mecanismos están asociados con la homología de ácidos nucleicos a nivel de ADN o ARN. Dicha homología se refiere a la similitud de las secuencias de ADN o proteína dentro de la misma especie o entre diferentes especies. El silenciamiento génico se produce si la secuencia de ADN introducida en una célula huésped es suficientemente homóloga a un gen endógeno de modo que la transcripción de la secuencia de ADN introducida induzca silenciamiento génico transcripcional o postranscripcional del gen endógeno. La homología suficiente para la supresión de los niveles de expresión en estado estacionario puede ser al menos el 50 %, aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 70

- 5 % idéntica sobre la longitud completa de una secuencia de ADN para una región codificante o región no codificante de planta, o para una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de una región codificante o no codificante de planta. Se prefieren más las secuencias de ADN que son, sobre su longitud completa, al menos un 80 % idénticas; al menos un 85 % idénticas; al menos un 90 % idénticas; al menos un 95 % idénticas; al menos un 97 % idénticas; al menos un 98 % idénticas; al menos un 99 % idénticas; o un 100 % idénticas a una región codificante o región no codificante de planta, o a una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de una región codificante o no codificante de planta. En plantas, las moléculas de ARN bicatenario pueden inducir silenciamiento específico de secuencia. El silenciamiento génico se denomina con frecuencia ARN bicatenario ("iARNbc") en plantas, como interferencia por ARN o iARN en *Caenorhabditis elegans* y en animales, y como apagado en hongos.
- 10 En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende un primer conjunto de secuencias de ADN, cada una de las cuales muestra suficiente homología con una o más secuencias codificantes o no codificantes de un gen vegetal de modo que cuando se exprese, sea capaz de eliminar eficazmente, reducir sustancialmente o al menos reducir parcialmente el nivel de un transcrito de ARNm o proteína codificada por el gen del cual se derivó la secuencia codificante o no codificante, o cualquier gen que tenga homología con la secuencia codificante o no codificante diana.
- 15 En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende (a) un primer conjunto de secuencias de ADN, cada una de las cuales muestra suficiente homología con una o más secuencias codificantes o no codificantes de un gen vegetal de modo que cuando se exprese, sea capaz de eliminar eficazmente, reducir sustancialmente o reducir al menos parcialmente el nivel de un transcrito de ARNm o proteína codificada por el gen del cual se derivó la secuencia codificante o no codificante, o cualquier gen que tenga homología con la secuencia no codificante diana, y (b) un segundo conjunto de secuencias de ADN, cada una de las cuales muestra suficiente homología con un gen vegetal de modo que cuando se exprese, sea capaz de potenciar al menos parcialmente, aumentar, potenciar o potenciar sustancialmente el nivel de un transcrito de ARNm o proteína codificada por el gen.
- 20 Como se usa en el presente documento, "un conjunto" de secuencias de ADN puede ser una o más secuencias, que codifican o no codifican una proteína. Por ejemplo, un primer conjunto de secuencias de ADN puede estar compuesto de solamente un promotor, una región no codificante, y un terminador. Un segundo conjunto de secuencias de ADN puede estar presente o no delante o detrás de un primer conjunto de secuencias de ADN.
- 25 Como se usa en el presente documento, "una reducción" del nivel o cantidad de un agente tal como una proteína o ARNm significa que el nivel o cantidad está reducido respecto a una célula u organismo que carece de una secuencia de ADN capaz de reducir el agente. Por ejemplo, "al menos una reducción parcial" se refiere a una reducción de al menos el 25 %, "una reducción sustancial" se refiere a una reducción de al menos el 65 %, y "una eliminación eficaz" se refiere a una reducción de más del 95 %, siendo todas estas reducciones en el nivel o cantidad del agente respecto a una célula u organismo que carece de una secuencia de ADN capaz de reducir el agente.
- 30 Como se usa en el presente documento, un nivel o cantidad "potenciado" o "aumentado" de un agente tal como una proteína o ARNm significa que el nivel o cantidad es mayor que el nivel o cantidad de agente presente en una célula, tejido o planta con un fondo genético similar pero que carece de una molécula de ácido nucleico introducida que codifica la proteína o ARNm. Por ejemplo, un nivel "al menos parcialmente potenciado" se refiere a un aumento de al menos el 25 %, y un nivel "sustancialmente potenciado" se refiere a un aumento de al menos el 100 %, siendo todos estos aumentos en el nivel o cantidad de un agente respecto al nivel o cantidad de un agente que está presente en una célula, tejido o planta con un fondo genético similar pero que carece de una molécula de ácido nucleico introducida que codifica la proteína o ARNm. En una realización preferida, un aumento de la expresión puede ser cualquier expresión en la que la proteína sea heteróloga del sistema. Por ejemplo, cualquier expresión de EPSPS CP4 puede ser un aumento de la expresión si no había expresión en la planta antes de la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína.
- 35 Cuando se comparan los niveles de un agente, dicha comparación se lleva a cabo preferentemente entre organismos con un fondo genético similar. Preferentemente, un fondo genético similar es un fondo en el que los organismos que se comparan comparten el 50 % o más, más preferentemente el 75 % o más, y, aún más preferentemente el 90 % o más de identidad de secuencia de un material genético nuclear. En otro aspecto preferido, un fondo genético similar es un fondo en el que los organismos que se comparan son plantas, y las plantas son isogénicas excepto por cualquier material genético introducido originalmente usando técnicas de transformación de plantas. La medición del nivel o cantidad de un agente puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento adecuado, cuyos ejemplos no limitantes incluyen la comparación de los niveles de transcrito de ARNm, niveles de proteína o péptido, y/o el fenotipo, especialmente contenido de aceite. Como se usa en el presente documento, los transcritos de ARNm incluyen transcritos de ARNm procesados y no procesados, y las proteínas o los péptidos incluyen proteínas o péptidos con o sin ninguna modificación postraduccional.
- 40 45 50 55 60 Las secuencias de ADN del primer conjunto de secuencias de ADN pueden ser secuencias codificantes, secuencias intrónicas, secuencias de UTR 3', secuencias de UTR 5', secuencias promotoras, otras secuencias no codificantes, o cualquier combinación de las anteriores. El primer conjunto de secuencias de ADN codifica una o más secuencias que, cuando se expresan, son capaces de reducir selectivamente la proteína o el transcrito codificado por un gen

- seleccionado del grupo que consiste en *FAD2*, *FAD3* y *FATB* o ambos. En una realización preferida, el primer conjunto de secuencias de ADN es capaz de expresar ARN antisentido, en el que las secuencias antisentido individuales pueden unirse en un transcrito, o pueden estar en transcritos individuales no unidos. En una realización más preferida, el primer conjunto de secuencias de ADN son secuencias físicamente unidas que son capaces de expresar una única molécula de ARNbc. En una realización preferida diferente, el primer conjunto de secuencias de ADN es capaz de expresar ARN de cosupresión con sentido, en el que las secuencias con sentido individuales pueden unirse en un transcrito, o pueden estar en transcritos individuales no unidos. Se describen realizaciones ejemplares del primer conjunto de secuencias de ADN en la Parte B de la Descripción Detallada y en los Ejemplos.
- El segundo conjunto de secuencias de ADN codifica una o más secuencias que, cuando se expresan, son capaces de aumentar la proteína o el transcrito codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en beta-cetoacil-ACP sintasa I (*KAS I*), beta-cetoacil-ACP sintasa IV (*KAS IV*), delta-9 desaturasa y EPSPS CP4 o ambos. Las secuencias de ADN del segundo conjunto de secuencias de ADN pueden ser secuencias unidas físicamente. Se describen realizaciones ejemplares del segundo conjunto de secuencias de ADN a continuación en las Partes C y D de la descripción detallada.
- Por tanto, los procedimientos para alterar la composición de ácidos grasos y compuestos que contienen dichos ácidos grasos, tales como ácidos, ceras y grasas.
- También se desvelan en el presente documento procedimientos para la producción de ácidos grasos particulares en plantas de células huésped. Dichos procedimientos emplean el uso de los casetes de expresión descritos en el presente documento para la modificación de la ruta de FAS de la célula vegetal huésped.
- B. Primer conjunto de secuencias de ADN**
- En un aspecto una molécula de ácido nucleico comprende un primer conjunto de secuencias de ADN, que cuando se introduce en una célula u organismo, expresa una o más secuencias capaces de eliminar eficazmente, reducir sustancialmente o reducir al menos parcialmente los niveles de transcritos de ARNm o proteínas codificadas por uno o más genes. Los aspectos preferidos incluyen como una diana un gen endógeno, un gen vegetal y un gen no viral.
- En un aspecto una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ADN que muestra suficiente homología con una o más secuencias codificantes o no codificantes de un gen vegetal, que cuando se introduce en una célula vegetal o planta y se expresa, es capaz de eliminar eficazmente, reducir sustancialmente o reducir al menos parcialmente el nivel de un transcrito de ARNm o proteína codificado por el gen del que derivaron la secuencia o las secuencias codificantes o no codificantes. Las secuencias de ADN del primer conjunto de secuencias de ADN transcriben secuencias de ARN o fragmentos de ARN que muestran al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, o más preferentemente el 100 % de identidad con una región codificante o no codificante derivada del gen del que se va a suprimir. Dicho porcentaje de identidad puede ser en comparación con otro fragmento de ácido nucleico.
- Preferentemente, la secuencia no codificante es una UTR 3', UTR 5', una fracción de una secuencia que codifica una proteína o un intrón de un gen vegetal. Más preferentemente, la secuencia no codificante es una secuencia promotora, UTR 3', UTR 5', o un intrón de un gen vegetal. El intrón puede localizarse entre exones, o localizarse dentro de una UTR 5' o 3' de un gen vegetal. La secuencia codificante es preferentemente una fracción de una fase que codifica una proteína.
- La secuencia o las secuencias del primer conjunto de secuencias de ADN pueden diseñarse para producir ARNbc, un ARN de supresión con sentido o un ARN antisentido o cualquier otro transcrito supresor para conseguir el efecto deseado cuando se introduce en una célula vegetal o planta. Dicha secuencia o secuencias de ADN pueden ser moléculas de ácido nucleico fragmentarias.
- Un intrón vegetal puede ser cualquier intrón vegetal de un gen, bien endógeno o bien introducido. Las secuencias de ácido nucleico de dichos intrones de organismos pueden obtenerse o derivarse de una multitud de fuentes, incluyendo, sin limitación, bases de datos tales como EMBL y Genbank que pueden encontrarse en Internet en ebi.ac.uk/swisprot/; expasy.ch/; emblheidelberg.de/; y ncbi.nlm.nih.gov. Las secuencias de ácido nucleico de dichos intrones también pueden derivar, sin limitación, de fuentes tales como el programa GENSCAN que puede encontrarse en Internet en genes.mit.edu/GENSCAN.html.
- También pueden obtenerse intrones adicionales por procedimientos que incluyen, sin limitación, cribar una biblioteca genómica con una sonda de secuencias exónicas o intrónicas conocidas, comparar la secuencia genómica con su secuencia de ADNc correspondiente, o clonar un intrón tal como un ADNc de soja por alineamiento con una secuencia genómica de otro organismo, tal como, por ejemplo *Arabidopsis*. Además, otras secuencias de ácido nucleico de intrones resultarán evidentes para un experto habitual en la materia. Los procedimientos anteriormente descritos también pueden usarse para derivar y obtener otras secuencias no codificantes, incluyendo pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias de UTR 3' y secuencias de UTR 5'.
- Un gen "*FAD2*", de " Δ 12 desaturasa" u "omega-6 desaturasa" codifica una enzima (*FAD2*) capaz de catalizar la

inserción de un doble enlace en un resto de acilo graso en la duodécima posición contando desde el extremo carboxilo terminal. El término "FAD2-1" se usa para hacer referencia a un gen FAD2 que se expresa de forma natural de una manera específica en tejido de semillas, y el término "FAD2-2" se usa para hacer referencia a un gen FAD2 que es (a) un gen diferente de un gen FAD2-1 y (b) se expresa de forma natural en múltiples tejidos, incluyendo las semillas. Las secuencias de FAD2 Representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° 10/176.149 presentada el 21 de junio de 2002 y en las SEC ID N°: 1-6.

Un gen "FAD3", de "Δ15 desaturasa" u "omega-3 desaturasa" codifica una enzima (FAD3) capaz de catalizar la inserción de un doble enlace en un resto de acilo graso en la decimoquinta posición contando desde el extremo carboxilo terminal. Los términos "FAD3-1, FAD3-A, FAD3-B y FAD3-C" se usan para hacer referencia a miembros de la familia del gen FAD3 que se expresan de forma natural en múltiples tejidos, incluyendo las semillas. Las secuencias de FAD3 representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en la Solicitud de patente de Estados Unidos N° 10/176.149 presentada el 21 de junio de 2002 y en SEC ID N°: 7-27.

Un gen "FATB" o de "palmitoil-ACP tioesterasa" codifica una enzima (FATB) capaz de catalizar la escisión hidrolítica del enlace tioéster carbono-azufre en el grupo prostático de patógeno de palmitoil-ACP como su reacción preferida. La hidrólisis de otros tioésteres de ácido graso-ACP también puede catalizarse por esta enzima. Las secuencias de FATB-1 representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/390.185 presentada el 21 de junio de 2002; las Patentes de Estados Unidos N° 5.955.329; 5.723.761; 5.955.650; y 6.331.664; y SEC ID N°: 28-37. Las secuencias de FATB-2 representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en SEC ID N°: 42-47.

C. Segundo conjunto de secuencias de ADN

En un aspecto una molécula de ácido nucleico comprende un segundo conjunto de secuencias de ADN, que cuando se introducen en una célula u organismo, son capaces de potenciar parcialmente, aumentar, potenciar o potenciar sustancialmente los niveles de transcritos de ARNm o proteínas codificadas por uno o más genes. En un aspecto un gen es un gen endógeno. En otro aspecto, un gen puede ser un gen heterólogo. En un aspecto preferido, los genes heterólogos y endógeno pueden estar en la misma molécula de ácido nucleico. En un aspecto, un gen es un gen vegetal. En otro aspecto, un gen es un gen truncado en el que el gen truncado es capaz de catalizar la reacción catalizada por el gen completo. En un aspecto un gen es un gen de beta-cetoacil-ACP sintasa I, gen de beta-cetoacil-ACP sintasa IV, gen de delta-9 desaturasa, gen de EPSPS CP4, o una combinación de estos genes.

Un gen puede ser cualquier gen, bien endógeno o bien introducido. Las secuencias de ácido nucleico de dichos genes pueden derivar de una multitud de fuentes, incluyendo, sin limitación, bases de datos tales como EMBL y Genbank que pueden encontrarse en Internet en ebi.ac.uk/swisprot/; expasy.ch/; emblheidelberg.de/; y ncbi.nlm.nih.gov. Las secuencias de ácido nucleico de dichos genes también pueden derivar, sin limitación, de fuentes tales como el programa GENSCAN, que puede encontrarse en Internet en genes.mit.edu/GENSCAN.html.

También pueden obtenerse genes adicionales por procedimientos que incluyen, sin limitación, cribar una biblioteca genómica o una biblioteca de ADNc con una sonda o secuencias génicas conocidas, clonar un gen por alineamiento con un gen o sonda de otro organismo, tal como, por ejemplo, *Arabidopsis*. Además, otras secuencias de ácido nucleico de genes serán evidentes para un experto habitual en la materia. Los genes adicionales pueden, por ejemplo, sin limitación, amplificarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Además, otras secuencias de ácido nucleico de genes serán evidentes para un experto habitual en la materia.

Puede emplearse sintetizadores de ácidos nucleicos automáticos para este fin, y para realizar una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia también hallada en una célula y organismo. En lugar de dicha síntesis, pueden usarse moléculas de ácido nucleico para definir un par de cebadores que pueden usarse con la PCR para amplificar y obtener cualquier molécula de ácido nucleico deseado o fragmento de un primer gen.

Un gen "KAS I" o de "beta-cetoacil-ACP sintasa r" codifica una enzima (KAS I) capaz de catalizar el elongamiento de un resto de acilo graso hasta palmitoil-ACP (C16:0). Las secuencias de KAS I representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en la patente de Estados Unidos N° 5.475.099 y la Publicación de PCT WO 94/10189, y en SEC ID N°: 38.

Un gen "KAS IV" o de "beta-cetoacil-ACP sintasa IV" codifica una enzima (KAS IV) capaz de catalizar la condensación de acil-ACP de cadena media y potenciar la producción de ACP 18:0. Las secuencias de KAS IV representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en la Publicación de PCT WO 98/46776, y en SEC ID N°: 39.

Un gen de "delta-9 desaturasa" o "estearoil-ACP desaturasa" u "omega-9 desaturasa" codifica una enzima capaz de catalizar la inserción de un doble enlace en un resto de acilo graso en la novena posición contada desde el extremo carboxilo terminal. Una delta-9 desaturasa preferida es una delta-9 desaturasa de planta o cianobacteria, y más preferentemente una delta-9 desaturasa que también se encuentra en un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Carthamus tinctorius*, *Ricinus communis*, *Simmonsia chinensis* y *Brassica campestris*. Las secuencias de delta-9 desaturasa representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en la patente de Estados Unidos N° 5.723.595 y SEC ID N°: 40-41.

Un gen de "EPSPS CP4" o "5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa CP4" codifica una enzima (EPSPS CP4) capaz de conferir un grado sustancial de resistencia a glifosato a la célula vegetal y plantas generadas de la misma. La secuencia de EPSPS CP4 puede ser una secuencia de EPSPS CP4 derivada de *Agrobacterium tumefaciens* sp. CP4 o una variante o forma sintética de la misma, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.633.435.

5 Las secuencias de EPSPS CP4 representativas incluyen, sin limitación, las expuestas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.627.061 y 5.633.435.

D. Vectores y construcciones recombinantes

Puede usarse una o más de las construcciones de ácido nucleico en la transformación o transfección de plantas. Los niveles de productos tales como transcritos o proteínas pueden aumentarse o reducirse en todo un organismo tal como una planta o localizarse en uno o más órganos o tejidos específicos del organismo. Por ejemplo los niveles de productos pueden aumentarse o reducirse en uno o más de los tejidos y órganos de una planta incluyendo sin limitación: raíces, tubérculos, tallos, hojas, troncos, fruto, bayas, nueces, corteza, vainas, semillas y flores. Un órgano preferido es una semilla. Por ejemplo, puede transferirse material genético exógeno a una célula vegetal y la célula vegetal regenerarse en una planta o parte de planta completa, fértil o estéril.

15 "Material genético exógeno" es cualquier material genético, bien de origen natural o bien de otro tipo, de cualquier fuente que sea capaz de insertarse en cualquier organismo. Dicho material genético exógeno incluye, sin limitación, moléculas de ácido nucleico y construcciones. El material genético exógeno puede transferirse a una célula huésped mediante el uso de un vector de ADN o construcción diseñado para dicho fin. De forma similar, un virus puede transferir material genético exógeno a una célula huésped. El material genético exógeno puede tener una secuencia de ADN idéntica al gen endógeno, pero se ha reintroducido a la célula huésped mediante el uso de un vector de ADN o construcción para el fin de suprimir la expresión del gen endógeno. El diseño de dicho vector está generalmente dentro del alcance de la técnica (véase, por ejemplo, *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Clark (ed.), Springer, Nueva York (1997)). En una realización preferida, el material genético exógeno es ADN recombinante.

25 Una construcción o vector puede incluir un promotor funcional en una célula vegetal, o un promotor vegetal, para expresar una molécula de ácido nucleico de elección. Se han descrito varios promotores que están activos en células vegetales en la bibliografía, y se prefieren los promotores de CaMV 35S y FMV para su uso en plantas. Otros ejemplos de promotores preferidos incluyen arcelina de judía y 7S alfa. Son promotores preferidos adicionales versiones potenciadas o duplicadas de los promotores 35S de CaMV y 35S de FMV. Odell y col., *Nature* 313: 810-812 (1985); patente de Estados Unidos N° 5.378.619. Se describen promotores adicionales que pueden utilizarse, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.378.619; 5.391.725; 5.428.147; 5.447.858; 5.608.144; 5.608.144; 5.614.399; 5.633.441; 5.633.435; y 4.633.436. Además, puede usarse un potenciador específico de tejido.

También pueden usarse promotores particularmente preferidos para expresar una molécula de ácido nucleico en semillas o frutos. De hecho, en una realización preferida, 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., *Seed Sci. Res.* 1: 209-219 (1991)), faseolina, estearoil-ACP desaturasa, 7S α , 7S α' (Chen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 8560-8564 (1986)), USP, arcelina y oleosina. Son promotores preferidos para la expresión en la semilla 7S α , 7S α' , napina y promotores de *FAD2-1A*.

40 Las construcciones o vectores también pueden incluir otros elementos genéticos, incluyendo pero sin limitación, terminadores transcripcionales 3', señales de poliadenilación 3, otras secuencias de ácido nucleico no traducidas, secuencias de tránsito o dirección, marcadores seleccionables o cribables, promotores, potenciadores y operadores. Las construcciones o vectores también pueden contener un gen sin promotor que puede utilizar un promotor endógeno tras su inserción.

45 Se han descrito moléculas de ácido nucleico ejemplares en la Parte A de la Descripción Detallada, y se describen moléculas de ácido nucleico ejemplares no limitantes adicionales posteriormente y se ilustran en las FIGURAS 1-4, y en los Ejemplos.

Haciendo referencia ahora a los dibujos, se muestran las realizaciones de la molécula de ácido nucleico en las FIGURAS 1-4. Como se ha descrito anteriormente, la molécula de ácido nucleico comprende (a) un primer conjunto de secuencias de ADN y (b) un segundo conjunto de secuencias de ADN, que se localizan en una o más regiones de ADN-T, cada una de las cuales está flanqueada por un extremo derecho y un extremo izquierdo. Dentro de las regiones de ADN-T la dirección de la transcripción se muestra por flechas. Las moléculas de ácido nucleico descritas pueden tener sus secuencias de ADN dispuestas en configuraciones monocistrónicas o policistrónicas. Las configuraciones preferidas incluyen una configuración en la que el primer conjunto de secuencias de ADN y el segundo conjunto de secuencias de ADN se localizan en una única región de ADN-T.

55 En cada una de las realizaciones ilustradas, el primer conjunto de secuencias de ADN comprende una o más secuencias que cuando se expresan son capaces de reducir selectivamente una, dos o todas las proteínas y transcritos codificados por un gen seleccionado del grupo que consiste en *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. Preferentemente cada secuencia en el primer conjunto de secuencias de ADN es capaz, cuando se expresa, de suprimir la expresión

de un gen diferente, incluyendo sin limitación diferentes miembros de la familia del gen. Las secuencias pueden incluir secuencias codificantes, secuencias intrónicas, secuencias de UTR 3', secuencias de UTR 5', otras secuencias no codificantes, o cualquier combinación de las anteriores. El primer conjunto de secuencias de ADN puede expresarse en cualquier forma adecuada, incluyendo como construcción de ARNbc, una construcción de cosupresión con sentido, o como una construcción antisentido. El primer conjunto de secuencias de ADN está unido de forma funcional con al menos un promotor que conduce la expresión de las secuencias, que puede ser cualquier promotor funcional en una planta, o cualquier promotor vegetal. Los promotores preferidos incluyen, pero sin limitación, un promotor de napina, un promotor de 7S α , un promotor de 7S α' , un promotor de arcelina o un promotor de *FAD2-1A*.

El segundo conjunto de secuencias de ADN comprende secuencias codificantes, cada una de las cuales es una secuencia de ADN que codifica una secuencia que cuando se expresa es capaz de aumentar uno o ambos de la proteína y transcrito codificados por un gen seleccionado del grupo que consiste en *KASI*, *KAS IV*, delta-9 desaturasa y EPSPS CP4. Cada secuencia codificante se asocia con un promotor, que puede ser cualquier promotor funcional en una planta, o cualquier promotor vegetal. Los promotores preferidos para uso en el segundo conjunto de secuencias de ADN son un promotor de FMV y/o promotores específicos de semilla. Los promotores específicos de semilla particularmente preferidos incluyen, pero sin limitación, un promotor de napina, un promotor de 7S α , un promotor de 7S α' , un promotor de arcelina, un promotor de delta-9 desaturasa o un promotor de *FAD2-1A*.

En las realizaciones representadas en las FIGURAS 1 y 2, el primer conjunto de secuencias de ADN, cuando se expresa, es capaz de formar una molécula de ARNbc que es capaz de suprimir la expresión de uno o ambos de la proteína y el transcrito codificados por, o transcritos a partir de, un gen seleccionado del grupo que consiste en *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. El primer conjunto de secuencias de ADN representado en la FIGURA 1 comprende tres secuencias no codificantes, cada una de las cuales expresa una secuencia de ARN (no mostrada) que muestra identidad con una región no codificante de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. Las secuencias no codificantes expresan, cada una, una secuencia de ARN que muestra al menos el 90 % de identidad con una región no codificante de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. El primer conjunto de secuencias de ADN también comprende tres secuencias antisentido, cada una de las cuales expresa una secuencia de ARN antisentido (no mostrada) que es capaz de formar una molécula de ARN bicatenario con su secuencia de ARN correspondiente respectiva (como se expresa por las secuencias no codificantes).

Las secuencias no codificantes puede separarse de las secuencias antisentido por una secuencia espaciadora, preferentemente una que promueve la formación de una molécula de ARNbc. Los ejemplos de dichas secuencias espaciadoras incluyen las expuestas en Wesley y col., *Plant J.*, 27(6): 581-90 (2001), y Hamilton y col., *Plant J.*, 15: 737-746 (1988). En un aspecto preferido, la secuencia espaciadora es capaz de formar una estructura en horquilla como se ilustra en Wesley y col., mencionado anteriormente. Son secuencias espaciadores particularmente preferidas en este contexto intrones o partes de los mismos. Un intrón vegetal particularmente preferido es un intrón con capacidad de corte y ajuste. Los intrones con capacidad de corte y ajuste incluyen, pero sin limitación, un intrón seleccionado del grupo que consiste en intrón de PDK, intrón de *FAD3-1A* o *FAD3-1B* N° 5, intrón de *FAD3* N° 1, intrón de *FAD3* N° 3A, intrón de *FAD3* N° 3B, intrón de *FAD3* N° 3C, intrón de *FAD3* N° 4, intrón de *FAD3* N° 5, intrón de *FAD2* N° 1 e intrón de *FAD2-2*. Los intrones con capacidad de corte y ajuste preferidos incluyen, pero sin limitación, un intrón seleccionado del grupo que consiste en intrón de *FAD3* N° 1, intrón de *FAD3* N° 3A, intrón de *FAD3* N° 3B, intrón de *FAD3* N° 3C e intrón de *FAD3* N° 5. Otros intrones con capacidad de corte y ajuste preferidos incluyen, pero sin limitación, un intrón con capacidad de corte y ajuste que es de aproximadamente 0,75 kb a aproximadamente 1,1 kb de longitud y es capaz de facilitar una estructura en horquilla de ARN. Un ejemplo no limitante de un intrón con capacidad de corte y ajuste particularmente preferido es el intrón de *FAD3* N° 5.

Las moléculas no codificantes, orientadas con sentido pueden separarse opcionalmente de las moléculas orientadas antisentido correspondientes por un segmento espaciador de ADN. El segmento espaciador puede ser un fragmento génico o ADN artificial. El segmento espaciador puede ser corto para facilitar la formación de ARNbc en horquilla o largo para facilitar el ARNbc sin una estructura en horquilla. El espaciador puede proporcionarse extendiendo la longitud de una de las moléculas con sentido o antisentido como se desvela en el documento US 2005/0176670 A1. Como alternativa, puede crearse una secuencia de extremo derecho-extremo derecho ("RB-RB") después de la inserción en el genoma vegetal como se desvela en la Solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0183170.

Haciendo referencia o relación ahora la FIGURA 1, la molécula de ácido nucleico comprende dos regiones de ADN-T, cada una de las cuales está flanqueada por un extremo derecho y un extremo izquierdo. La primera región de ADN-T comprende un primer conjunto de secuencias de ADN que está unido de forma funcional con un promotor, y la primera región de ADN-T comprende además una primera parte del segundo conjunto de secuencias de ADN que comprende un primer promotor unido de forma funcional con una primera secuencia codificante, y un segundo promotor unido de forma funcional con una segunda secuencia codificante. La segunda región ADN-T comprende una segunda parte del segundo conjunto de secuencias de ADN que comprende un tercer promotor de forma funcional con una tercera secuencia codificante. En una realización preferida representada en la FIGURA 2, la molécula de ácido nucleico comprende una única región de ADN-T, que está flanqueada por un extremo derecho y un extremo izquierdo. Los primero y segundo conjuntos de secuencias de ADN están todos localizados en la región

de ADN-T individual.

En las realizaciones que expresan ARNbc mostradas en las FIGURAS 1 y 2, el orden de las secuencias puede alterarse del ilustrado y descrito, sin embargo las secuencias no codificantes y las secuencias antisentido preferentemente se disponen alrededor de la secuencia espaciadora de modo que, cuando se exprese, la primera secuencia codificante puede hibridar con la primera secuencia antisentido, la segunda secuencia no codificante puede hibridar con la segunda secuencia antisentido y la tercera secuencia codificante puede hibridar con la tercera secuencia antisentido de modo que pueda formarse una única molécula de ARNbc. Preferentemente las secuencias no codificantes están en una orientación con sentido, y las secuencia antisentido están en una orientación antisentido respecto al promotor. Los números de secuencias no codificantes, antisentido y codificantes, y las diversas posiciones relativas de las mismas en la región o las regiones de ADN-T también pueden alterarse de cualquier manera adecuada para conseguir los objetivos.

En referencia ahora a las FIGURAS 3 y 4, la molécula de ácido nucleico ilustrada comprende una región de ADN-T flanqueada por un extremo derecho y un extremo izquierdo, en la que se localizan el primer y segundo conjuntos de secuencias de ADN. El primer conjunto de secuencias de ADN está unido de forma funcional con un promotor y una señal de terminación de la transcripción. El segundo conjunto de secuencias de ADN que comprende un primer promotor unido de forma funcional con una primera secuencia codificante, un segundo promotor unido de forma funcional con una segunda secuencia codificante y un tercer promotor unido de forma funcional con una tercera secuencia codificante. La señal de terminación de la transcripción puede ser cualquier señal de terminación de la transcripción funcional en una planta, o cualquier señal de terminación de la transcripción de planta. Las señales de terminación de la transcripción preferidas incluyen, pero sin limitación, una secuencia de Rubisco E9 3' de guisante, una secuencia de napina 3' de *Brassica*, una secuencia de *tml* 3' y una secuencia de *nos* 3'.

En la realización representada en la FIGURA 3, el primer conjunto de secuencias de ADN, cuando se expresa, es capaz de formar una construcción de cosupresión con sentido que es capaz de suprimir la expresión de una o más proteínas o transcritos codificados por, o derivados de, un gen seleccionado del grupo que consiste en *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. El primer conjunto de secuencias de ADN comprende tres secuencias no codificantes, cada una de las cuales expresa una secuencia de ARN (no mostrada) que muestra suficiente identidad con una o más regiones no codificantes de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. Las secuencias no codificantes expresan, cada una, una secuencia de ARN que muestra al menos el 90 % de identidad con una o más regiones no codificantes de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. El orden de las secuencias no codificantes dentro del primer conjunto de secuencias de ADN puede alterarse del ilustrado y descrito en el presente documento, pero las secuencias no codificantes se disponen en una orientación con sentido respecto al promotor.

La FIGURA 4 representa una realización en la que el primer conjunto de secuencias de ADN, cuando se expresa, es capaz de formar una construcción antisentido que es capaz de suprimir la expresión de una o más proteínas o transcritos codificados por, o derivados de, un gen seleccionado del grupo que consiste en *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. El primer conjunto de secuencias de ADN comprende tres secuencias antisentido, cada una de las cuales expresa una secuencia de ARN antisentido (no mostrada) que muestra identidad con una o más regiones no codificantes de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. Las secuencias antisentido expresan, cada una, una secuencia de ARN antisentido que muestra al menos el 90 % de identidad con una o más regiones no codificantes de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes *FAD2*, *FAD3* y *FATB*. El orden de las secuencias antisentido dentro del primer conjunto de secuencias de ADN puede alterarse del ilustrado y descrito en el presente documento, pero las secuencias antisentido se disponen en una orientación antisentido respecto al promotor.

E. Organismos transgénicos y procedimientos de producción de los mismos

Puede introducirse cualquiera de las moléculas y construcciones de ácido nucleico en una planta o célula vegetal de una manera permanente o transitoria. Las construcciones y moléculas de ácido nucleico preferidas se han descrito anteriormente las Partes A a D de la Descripción Detallada, y en los Ejemplos. Otra realización descrita en el presente documento es un procedimiento para producir plantas transgénicas que comprende en general las etapas de seleccionar una planta o célula vegetal adecuada, transformar la planta o célula vegetal con un vector recombinante, y obtener una célula huésped transformada.

En una realización preferida la planta o célula es, o deriva de una planta implicada en la producción de aceites vegetales para usos comestibles e industriales. Se prefieren especialmente cultivos de semillas oleaginosas templados. Las plantas de interés incluyen, pero sin limitación, colza (variedades canola y de Alto Ácido Erúcido), maíz, soja, crambe, mostaza, ricino, cacahuete, sésamo, algodón, linaza, cártamo, palma de aceite, lino, girasol y coco. El procedimiento es aplicable igualmente a especies monocotiledóneas o dicotiledóneas, y será fácilmente aplicable para técnicas de transformación y reguladoras nuevas y/o mejoradas.

Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos y tecnología para la introducción de ADN en células vegetales, y prácticamente cualquier procedimiento por el que puedan introducirse moléculas de ácido nucleico en una célula es adecuado para su uso en la presente invención. Los ejemplos no limitantes de procedimientos

adecuados incluyen: procedimientos químicos; procedimientos físicos tales como microinyección, electroporación, la pistola génica, bombardeo de microproyectiles e infiltración al vacío; vectores virales y mecanismos mediados por receptor. Otros procedimientos de transformación celular también pueden usarse e incluyen pero sin limitación introducción de ADN en plantas por transferencia de ADN directo en polen, por inyección directa de ADN en órganos reproductores de una planta, o por inyección directa de ADN en las células de embriones inmaduros seguido de la rehidratación de embriones desecados.

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para introducir genes en células vegetales. Véase, por ejemplo, Fraley y col., *Bio/Technology* 3: 629-635 (1985); Rogers y col., *Methods Enzymol.* 153: 253-277 (1987). La región de ADN para transferir se define por las secuencias límite y se inserta habitualmente ADN intermedio en el genoma vegetal. Spielmann y col., *Mol. Gen. Genet.* 205: 34 (1986). Los vectores de transformación por *Agrobacterium* modernos son capaces de replicar en *E. coli* así como en *Agrobacterium*, permitiendo manipulaciones convenientes. Klee y col., In: *Plant DNA Infectious Agents*, Hohn y Schell (eds.), Springer-Verlag, Nueva York, pp. 179-203 (1985).

La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas a partir de transformantes protoplastos vegetales individuales o de diversos explantes transformados se conocen bien en la técnica. Véase en general, Maliga y col., *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995); Weissbach y Weissbach, In: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA (1988). Las plantas pueden ser parte de o generarse de un programa de cultivo, y también pueden reproducirse usando apomixis. Se conocen en la técnica procedimientos para la producción de plantas apomícticas. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.811.636.

En una realización preferida, una planta incluye secuencias de ácido nucleico que cuando se expresan son capaces de reducir selectivamente el nivel de una proteína FAD2, FAD3 y/o FATB, y/o un transcrito de FAD2, FAD3 y/o FATB se cruza con otra planta que incluye secuencias de ácido nucleico que cuando se expresan son capaces de sobreexpresar otra enzima. Preferentemente la otra enzima se selecciona del grupo que consiste en beta-cetoacil-ACP sintasa I, beta-cetoacil-ACP sintasa IV, delta-9 desaturasa y EPSPS CP4.

En otro aspecto, una planta puede cruzarse con otra planta que es transgénica o no transgénica. Una planta puede cruzarse con otra planta que tiene una composición de aceite que contiene niveles modificados de ácidos grasos, por ejemplo sin limitación, una variedad con una composición de aceite que tiene un nivel menor de ácido linolénico. En una realización preferida, una planta se cruza con una variedad con menos del 3 % en peso de ácido linolénico, o en otra realización, una planta se cruza con otra planta que tiene más del 20 % en peso de ácido esteárico. Dichas plantas que tienen niveles modificados de ácidos grasos se conoce en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hawkins y Kridl (1998) *Plant Journal* 13(6): 743-752 y patente de Estados Unidos N° 6.365.802.

F. Productos de la presente invención

Las plantas pueden usarse completas o en parte. Las partes de plantas preferidas incluyen partes reproductoras o de almacenamiento. La expresión "partes de plantas" como se usa en el presente documento incluye, sin limitación, semilla, endosperma, óvulo, polen, raíces, tubérculos, tallos, hojas, troncos, fruto, bayas, nueces, corteza, vainas, semillas y flores. En una realización particularmente preferida de la presente invención, la parte de la planta es una semilla.

Cualquiera de las plantas o partes de las mismas pueden procesarse para producir un pienso, harina, proteína o preparación oleosa.

Una parte de planta particularmente preferida es una semilla. En una realización preferida el pienso, harina, proteína o preparación oleosa se diseña para animales de ganadería, peces o seres humanos, o cualquier combinación. Se conocen en la técnica procedimientos para producir pienso, harina, proteína y preparaciones oleosas. Véase, por ejemplo 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. En una realización preferida, la preparación de proteínas es una preparación de alto nivel de proteínas. Dicha preparación de alto nivel de proteínas preferentemente tiene un contenido de proteínas de más del 5 % p/v, más preferentemente del 10 % p/v, y aún más preferentemente del 15 % p/v.

En una preparación de aceite preferida, la preparación de aceite es una preparación de alto aceite con un contenido de aceite derivado de una planta o parte de la misma de más del 5 % p/v, más preferentemente del 10 % p/v, y aún más preferentemente del 15 % p/v. En una realización preferida la preparación de aceite es un líquido y de un volumen mayor de 1, 5, 10 o 50 litros. Se describe además en el presente documento aceite producido por un procedimiento de la presente invención. Dicho aceite puede mostrar estabilidad oxidativa potenciada. Además, dicho aceite también puede ser un componente menor o importante de cualquier producto resultante.

Además, dicho aceite puede mezclarse con otros aceites. En una realización preferida, el aceite producido de plantas generadas por un procedimiento de la presente invención constituye más del 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 90 % en volumen o peso del componente de aceite de cualquier producto. En otra realización, la preparación de aceite puede mezclarse y puede constituir más del 10 %, 25 %, 35 %, 50 % o 75 % de la mezcla en volumen. El aceite producido de una planta puede mezclarse con uno o más disolventes orgánicos o destilados del petróleo.

Las semillas de las plantas pueden colocarse en un recipiente. Como se usa en el presente documento, un recipiente es cualquier objeto capaz de contener dichas semillas. Un recipiente preferentemente contiene más de aproximadamente 500, 1.000, 5.000 o 25.000 semillas en las que al menos aproximadamente el 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 % de las semillas derivan de una planta como se ha descrito anteriormente. Además se describe en el presente documento un recipiente de más de aproximadamente 10.000, más preferentemente de aproximadamente 20.000 y aún más preferentemente de aproximadamente 40.000 semillas donde más de aproximadamente el 10 %, más preferentemente aproximadamente el 25%, más preferentemente el 50 % y aún más preferentemente aproximadamente el 75 % o 90 % de las semillas de la presente invención. Se describe además en el presente documento un recipiente de más de aproximadamente 10 kg, más preferentemente aproximadamente 25 kg, y aún even más preferentemente de aproximadamente 50 kg de semillas en las que más de aproximadamente el 10 %, más preferentemente aproximadamente el 25 %, más preferentemente aproximadamente el 50 % y aún más preferentemente aproximadamente el 75 % o 90 % de las semillas son semillas de la presente invención.

G. Composiciones de aceite

Para muchas aplicaciones de aceite, los niveles de ácidos grasos saturados son preferentemente menores del 8 % en peso, y más preferentemente aproximadamente del 2-3 % en peso. Los ácidos grasos saturados tienen altos puntos de fusión que son indeseables en muchas aplicaciones. Cuando se usan como una materia prima o combustible, los ácidos grasos saturados provocan enturbiamiento a temperaturas bajas, y confieren propiedades de mal flujo en frío tal como puntos de vertido y puntos de taponado de filtros en frío al combustible. Los productos de aceite que contienen niveles de ácidos grasos saturados bajos pueden preferirse por los consumidores y la industria alimentaria debido a que se perciben como más sanos y/o pueden etiquetarse como "sin grasas saturadas" de acuerdo con las directrices de la FDA. Además, los ácidos saturados bajos reducen o eliminan la necesidad de preparar el aceite para el invierno para aplicaciones alimentarias tales como aceites para ensalada. En aplicaciones de biocombustible y lubricantes los aceites con niveles de ácidos grasos saturados bajos confieren propiedades de flujo en frío mejoradas y no enturbian a temperaturas bajas.

Los factores que dominan las propiedades físicas de un aceite particular son complejos. Los ácidos palmítico, esteárico y otros ácidos grasos saturados son típicamente sólidos a temperatura ambiente, a diferencia de los ácidos grasos insaturados, que permanecen líquidos. Debido a que los ácidos grasos saturados no tienen dobles enlaces en la cadena de acilo, permanecen estables a la oxidación a temperaturas elevadas. Los ácidos grasos saturados son componentes importantes en las margarinas y formulaciones de chocolate, pero para muchas aplicaciones alimentarias, se desean niveles reducidos de ácidos grasos saturados.

El ácido oleico tiene un doble enlace, pero aún es relativamente estable a temperaturas altas, y los aceites con altos niveles de ácido oleico son adecuados para cocinar y otros procesos en los que se requiere calor. Recientemente, se ha recomendado el mayor consumo de ácidos alto oleicos, debido a que el ácido oleico parece reducir los niveles en sangre de lipoproteínas de baja densidad ("LDL") sin afectar a los niveles de lipoproteínas de alta densidad ("HDL"). Sin embargo, es deseable alguna limitación de los niveles del ácido oleico, debido a que cuando el ácido oleico se degrada a temperaturas altas, crea compuestos de sabor negativo y reduce los sabores positivos creados por la oxidación del ácido linoleico. Neff y col., JAOCS, 77: 1303-1313 (2000); Warner y col., J. Agric. Food Chem. 49: 899-905 (2001). Los ácidos preferidos tienen niveles de ácido oleico que son del 65-85 % o menos en peso, para limitar los sabores indeseables en aplicaciones alimentarias tales como aceite para freír y alimentos fritos. Otros aceites preferidos tienen niveles de ácido oleico que son mayores del 55 % en peso para mejorar la estabilidad oxidativa.

El ácido linoleico es un ácido graso poliinsaturado importante en alimentos y es un nutriente esencial para seres humanos. Es un componente deseable para muchas aplicaciones alimentarias por que es un precursor importante de sustancias saporíferas para alimentos fritos tales como 2,4 decadienal, que hace que los alimentos fritos sepan bien. Sin embargo, el ácido linoleico tiene estabilidad limitada cuando se calienta. Los aceites alimentarios preferidos tienen niveles de ácido linoleico que son del 10 % o mayores en peso, para potenciar la formación de sustancias saporíferas de alimentos fritos deseables, y también son del 25 % o menos en peso, de modo que se reduce la formación de sabores indeseables. El ácido linoleico también tiene propiedades de reducción de colesterol, aunque un exceso dietético puede reducir la capacidad de las células humanas para protegerse del daño oxidativo, provocando de este modo el riesgo de enfermedad cardiovascular. Toborek y col., Am J. Clin. J. 75: 119-125 (2002). Véase en general Flavor Chemistry of Lipid Foods, editores D. B. Min y T. H. Smouse, Am Oil Chem. Soc., Champaign, IL (1989).

El ácido linoleico, que tiene un menor punto de fusión que el ácido oleico, contribuye además a mejores propiedades de flujo en frío deseables en aplicaciones de biocombustible y biolubricante. Los aceites preferidos para la mayoría de las aplicaciones tienen niveles de ácido linoleico del 30 % o menos en peso, debido a que la oxidación del ácido linoleico limita el almacenamiento útil o tiempo de uso de aceite para freír, alimentos, pienso, combustible y productos lubricantes. Véase en general, Physical Properties of Fats, Oils, and Emulsifiers, ed. N. Widlak, AOCS Press (1999); Erhan y Asadauskas, Lubricant Basestocks from Vegetable Oils, Industrial Crops and Products, 11: 277-282 (2000). Además, los niveles de ácido linoleico altos en pienso para vacas pueden conducir a niveles indeseablemente altos de ácido linoleico en la leche de las vacas lecheras, y por lo tanto mala estabilidad oxidativa y sabor. Timmons y col., J. Dairy Sci. 84: 2440-2449 (2001). Una composición de aceite útil en general tiene niveles de

ácido linoleico del 10-25 % en peso.

El ácido linoleico también es un componente importante de la dieta humana. Se usa para sintetizar la familia ω -3 de ácidos grasos de cadena larga y las prostaglandinas derivadas de los mismos. Sin embargo, sus dobles enlaces son altamente susceptibles de oxidación, de modo que los aceites con altos niveles de ácido linolénico se deterioran rápidamente tras su exposición al aire, especialmente a temperaturas altas. La hidrogenación parcial de dichos aceites es con frecuencia necesaria antes de poder usarlos en productos alimentarios para retardar la formación de sabores indeseables y enraizamiento cuando se calienta el aceite, pero la hidrogenación crea ácidos grasos en *trans* poco saludables que pueden contribuir a la enfermedad cardiovascular. Para mejorar la estabilidad oxidativa mejorada, y reducir la necesidad de aceite hidrogenado, los aceites preferidos tienen niveles de ácido linolénico que son del 8 % o menos en peso, el 6 % o menos, el 4 % o menos, menos de aproximadamente el 3 % y más preferentemente el 0,5-2 % en peso de los ácidos grasos totales en el aceite.

El aceite de soja de la presente invención también puede usarse como una fuente de mezcla para realizar un producto de aceite mezclado. Por una fuente de mezcla, se entiende que el aceite de una soja de la presente invención puede mezclarse con otros aceites vegetales para mejorar las características, tales como composición de ácidos grasos, sabor y estabilidad oxidativa, de los otros aceites. La cantidad de aceite de una soja de la presente invención que puede usarse dependerá de las propiedades deseadas que se intentan conseguir en el producto de aceite mezclado final resultante. Los ejemplos de productos de aceite mezclados incluyen, pero sin limitación, margarinas, grasas comestibles de cadena corta, aceites para freír, aceites para ensalada, etc. El aceite de una soja de la presente invención puede ser un aceite mezclado, aceite sintetizado o en una realización preferida un aceite generado a partir de una semilla oleaginosa que tenga una composición de aceite apropiada. Un aceite generado directamente de una semilla oleaginosa es un aceite no mezclado. En otro aspecto, un aceite es directamente de una semilla oleaginosa madura. En este aspecto, una semilla madura se define por una semilla que se recolecta en el campo para prácticas agrícolas comerciales, tales como venta para piensos. En una realización preferida, el aceite es un aceite de soja. El aceite puede ser un aceite crudo tal como aceite de soja crudo, o puede ser un aceite procesado, por ejemplo el aceite puede ser refinado, blanqueado, desodorizado y/o preparado para el invierno. Como se usa en el presente documento, "refinar" se refiere a un procedimiento para tratar una grasa o un aceite natural o procesado para eliminar impurezas, y puede conseguirse tratando la grasa o el aceite con sosa cáustica, seguido de centrifugación, lavado con agua, y calentamiento al vacío. "Blanqueo" se refiere a un proceso para tratar una grasa o un aceite para eliminar o reducir los niveles de materiales colorantes en la grasa o el aceite. El blanqueo puede conseguirse tratando la grasa o el aceite con carbono activado o tierra de Fuller (diatomea). La "desodorización" se refiere a un procedimiento para eliminar componentes de una grasa o un aceite que contribuyen a sabores u olores cuestionables al producto final, y puede conseguirse mediante el uso de lavado con vapor supercalentado y alto vacío. La "preparación para el invierno" se refiere a un procedimiento para eliminar glicéridos saturados de un aceite, y puede conseguirse enfriando y retirando las partes solidificadas de la grasa de un aceite.

Un aceite preferido tiene una composición de aceite de baja saturación, o una composición de aceite de saturación cero. En otras realizaciones preferidas, los aceites tienen niveles de ácido oleico aumentados, niveles de ácidos grasos saturados reducidos, y niveles de ácidos grasos poliinsaturados reducidos. En realizaciones preferidas adicionales, los aceites tienen niveles de ácido oleico aumentados y niveles de ácidos grasos saturados reducidos. En una realización preferida, el aceite es un aceite de soja. Los porcentajes de contenido de ácidos grasos, o en niveles de ácidos grasos, usados en el presente documento se refieren a porcentajes en peso.

En una primera realización, un aceite preferentemente tiene una composición de aceite que es del 55 al 80 % de ácido oleico, de aproximadamente el 12 al 43 % de poliinsaturados, y del 2 al 8 % de ácidos grasos saturados; más preferentemente tiene una composición de aceite que es del 55 al 80 % de ácido oleico, aproximadamente del 14 al 42 % de poliinsaturados y del 3 al 6 % de ácidos grasos saturados; y aún más preferentemente tiene una composición de aceite que es del 55 al 80 % de ácido oleico, aproximadamente del 16,5 al 43 % de poliinsaturados, y del 2 al 3,6 % de ácidos grasos saturados.

En una segunda realización, un aceite preferentemente tiene una composición de aceite que es del 65 al 80 % de ácido oleico, aproximadamente del 12 al 33 % de poliinsaturados y del 2 al 8 % de ácidos grasos saturados; más preferentemente tiene una composición de aceite que es del 65 al 80 % de ácido oleico, aproximadamente del 14 al 32 % de poliinsaturados y del 3 al 6 % de ácidos grasos saturados; y aún más preferentemente tiene una composición de aceite que es del 65 al 80 % de ácido oleico, aproximadamente del 16,5 al 33 % de poliinsaturados y del 2 al 3,6 % de ácidos grasos saturados.

En una tercera realización, un aceite preferentemente tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 42 a aproximadamente el 85 % de ácido oleico y de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados; más preferentemente, la composición de aceite tiene además una cantidad combinada de de ácido oleico y ácido linolénico igual a aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 95 % en peso de la composición de aceite total. Aún más preferentemente, la composición de aceite tiene una cantidad combinada de de ácido oleico y ácido linolénico igual a aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 % en peso de la composición de aceite total.

En una cuarta realización, un aceite preferentemente tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 42 a aproximadamente el 85 % de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados, de aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 15 % en peso de ácido linolénico; más preferentemente tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 42 a aproximadamente el 85 % de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados, menos del 35 % en peso de ácido linolénico; y aún más preferentemente tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 42 a aproximadamente el 85 % de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados, aproximadamente el 9 % en peso de ácido linolénico.

En una quinta realización, un aceite tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 85 % de ácido oleico y de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados; más preferentemente de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 85 % de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados, de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 14 % en peso de ácido linolénico; más preferentemente tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 85 % de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados, menos del 35 % en peso de ácido linolénico; y aún más preferentemente tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 42 a aproximadamente el 85 % de ácido oleico, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 1,5 % de ácidos grasos saturados, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 45 % en peso de ácido linolénico.

En otra realización, un aceite tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 3-8 % de saturados y aproximadamente el 12-32 % de poliinsaturados. En otra realización, un aceite tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 65-80 % de ácido oleico, aproximadamente el 2-3,5 % de saturados y aproximadamente el 16,5-33 % de poliinsaturados.

En una realización particularmente preferida, un aceite tiene una composición de aceite que es de aproximadamente el 47- 83 % de ácido oleico y aproximadamente el 5 % de saturados; aproximadamente el 60-80 % de ácido oleico y aproximadamente el 5 % de saturados; aproximadamente el 50-85 % de ácido oleico y aproximadamente el 2-7 % de saturados; aproximadamente el 55-85 % de ácido oleico y aproximadamente el 2,5-7 % de saturados; aproximadamente el 47-88 % de ácido oleico y aproximadamente el 3-7 % de saturados; aproximadamente el 43-85 % de ácido oleico y aproximadamente el 5-7 % de saturados; aproximadamente el 81-85 % de ácido oleico y aproximadamente el 5 % de saturados; aproximadamente el 74-83 % de ácido oleico y aproximadamente el 6 % de saturados; aproximadamente el 65-87 % de ácido oleico y aproximadamente el 6 % de saturados; aproximadamente el 66-80 % de ácido oleico y aproximadamente el 6 % de saturados; aproximadamente el 42-77 % de ácido oleico y aproximadamente el 5-8 % de saturados; aproximadamente el 60-77 % de ácido oleico y aproximadamente el 6 % de saturados; aproximadamente el 70-81 % de ácido oleico y aproximadamente el 5-7 % de saturados; aproximadamente el 52-71 % de ácido oleico y aproximadamente el 5-7 % de saturados; aproximadamente el 44-71 % de ácido oleico y aproximadamente el 6 % de saturados; aproximadamente el 61-71 % de ácido oleico y aproximadamente el 8 % de saturados; aproximadamente el 57-71 % de ácido oleico y aproximadamente el 7 % de saturados; aproximadamente el 23-58 % de ácido oleico y aproximadamente el 8-14 % de saturados; aproximadamente el 20-70 % de ácido oleico y aproximadamente el 6 % de saturados; aproximadamente el 21-35 % de ácido oleico y aproximadamente el 5-6 % de saturados; o aproximadamente el 19-28 % de ácido oleico y aproximadamente el 5 % de saturados.

En otras realizaciones, el porcentaje de ácido oleico es el 50 % o más; el 55 % o más, el 60 % o más; el 65 % o más, el 70 % o más; el 75 % o más, o el 80 % o más; o es un intervalo del 50 al 80 %; del 55 al 80 %; del 55 al 75 %; del 55 al 65 %; del 60 al 85 %; del 60 al 80 %; del 60 al 75 %; del 60 al 70 %; del 65 al 85 %; del 65 al 80 %; del 65 al 75 %; del 65 al 70 %; o del 69 al 73 %. Los intervalos de porcentajes adecuados para contenido de ácido oleico en aceites también incluyen intervalos en los que el límite inferior se selecciona de los siguientes porcentajes: 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 por ciento; y el límite superior se selecciona de los siguientes porcentajes: 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 por ciento.

En estas otras realizaciones, el porcentaje de ácido linoleico en un aceite es un intervalo del 10 al 40 %; del 10 al 39 %; del 10 al 30 %; del 10 al 29 %; del 10 al 28 %; del 10 al 25 %; del 10 al 21 %; del 10 al 20 %; del 11 al 30 %; del 12 al 30 %; del 15 al 25 %; del 20 al 25 %; del 20 al 30 %; o del 21 al 24 %. Los intervalos de porcentajes adecuados para contenido de ácido oleico en aceites también incluyen intervalos en los que el límite inferior se selecciona de los siguientes porcentajes: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 por ciento; y el límite superior se selecciona de los siguientes porcentajes: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 por ciento.

En estas otras realizaciones, el porcentaje de ácido linolénico en un aceite es del 10 % o menos; el 9 % o menos; el 8 % o menos; el 7 % o menos; el 6 % o menos; el 5 % o menos; el 4,5 % o menos; el 4 % o menos; el 3,5 % o menos; el 3 % o menos; el 3,0 % o menos; el 2,5 % o menos; o el 2 % o menos; o es un intervalo del 0,5 al 2 %; del 0,5 al 3 %; del 0,5 al 4,5 %; del 0,5 % al 6 %; del 3 al 5 %; del 3 al 6 %; del 3 al 8 %; del 1 al 2 %; del 1 al 3 %; o del 1 al 4 %. En estas otras realizaciones, el porcentaje de ácidos grasos saturados en una composición de aceite es del 15 % o menos; el 14 % o menos; el 13 % o menos; el 12 % o menos, el 11 % o menos; el 10 % o menos; el 9 % o

menos; el 8 % o menos; el 7 % o menos; el 6 % o menos; el 5 % o menos; el 4 % o menos; o el 3,6 % o menos; o es un intervalo del 2 al 3 %; del 2 al 3,6 %; del 2 al 4 %; del 2 al 8 %; del 3 al 15 %; del 3 al 10 %; del 3 al 8 %; del 3 al 6 %; del 3,6 al 7 %; del 5 al 8 %; del 7 al 10 %; o del 10 al 15 %.

5 En otras realizaciones, los ácidos grasos saturados en un aceite incluyen la combinación de los ácidos grasos palmítico y esteárico. En una realización, el porcentaje de ácidos grasos saturados varía de aproximadamente el 10 % o menos; aproximadamente el 9 % o menos; aproximadamente el 8 % o menos; aproximadamente el 7 % o menos; aproximadamente el 6 % o menos; aproximadamente el 5 % o menos; aproximadamente el 4,5 % o menos; aproximadamente el 4 % o menos; aproximadamente el 3,5 % o menos; aproximadamente el 3 % o menos; aproximadamente el 3,0 % o menos; aproximadamente el 2,5 % o menos; o aproximadamente el 2 % o menos; o es un intervalo del 0,5 al 2 %; del 0,5 al 3 %; del 0,5 al 4,5 %; del 0,5 al 6 %; del 0,5 al 7 %; del 0,5 al 8 %; del 0,5 al 9 %; del 1 al 4 %; del 1 al 5 %; del 1 al 6 %; del 1 al 7 %; del 1 al 8 %; del 1 al 9 %; del 1,5 al 5 %; del 1,5 al 6 %; del 1,5 al 7 %; del 1,5 al 8 %; del 1,5 al 9 %; del 2 al 5 %; del 2 al 6 %; del 2 al 7 %; del 2 al 8 %; del 2 al 9 %; del 3 al 5 %; del 3 al 6 %; del 3 al 7 %; del 3 al 8 %; del 3 al 9 %; del 4 al 7 %; del 4 al 8 %; del 4 al 9 %; del 5 al 7 %; del 5 al 8 %; y del 5 al 9 %. En estas realizaciones, los intervalos de porcentajes adecuados para contenido de ácidos grasos saturados también incluye intervalos en los que el límite inferior se selecciona de los siguientes porcentajes: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6 o 6,5 por ciento; y el límite superior se selecciona de los siguientes porcentajes: 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, o 0,5 por ciento.

20 En otras realizaciones, el porcentaje de ácido graso palmítico en una composición de aceite varía del 6 % o menos; del 5 % o menos; del 4,5 % o menos; del 4 % o menos; del 3,5 % o menos; del 3 % o menos; del 3,0 % o menos; del 2,5 % o menos; o del 2 % o menos; o es un intervalo del 0,5 al 2 %; del 0,5 al 3 %; del 0,5 al 4,5 %; del 0,5 al 6 %; del 1 al 3 %; del 1 al 4 %; del 1 al 5 %; del 1 al 6 %; del 1,5 al 2 %; del 1,5 al 3 %; del 1,5 al 4 %; del 1,5 al 4,5 %; del 1,5 al 5 %; del 1,5 al 5,5 %; del 1,5 al 6 %; del 1,5 al 6,5 %; del 1,5 al 7 %; del 2 al 3 %; del 2 al 3,5 %; del 2 al 4 %; del 2 al 4,5 %; del 2 al 5 %; del 2 al 6 %; del 2 al 7 %; del 2 al 8 %; del 3 al 5 %; del 3 al 6 %; del 3 al 7 %; del 3 al 8 %; del 3 al 9 %. En estas realizaciones, los intervalos de porcentajes adecuados para el contenido de ácido linoleico en aceites también incluye intervalos en los que el límite inferior se selecciona de los siguientes porcentajes: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7 o 7,5 por ciento; y el límite superior se selecciona de los siguientes porcentajes: 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3 o 2 por ciento.

30 En otras realizaciones, el porcentaje de ácido graso esteárico en una composición de aceite varía del 3 % o menos; el 3,0 % o menos; el 2,5 % o menos; o el 2 % o menos; o es un intervalo del 0,5 al 1 %; del 0,5 al 1,5 %; del 0,5 al 2 %; del 0,5 al 2,5 %; del 0,5 al 3 %; del 0,5 al 4 %; del 1 al 2 %; del 1 al 3 %; del 1 al 4 %; del 1,5 al 2 %; del 1,5 al 3 %; o del 1,5 al 4 %. En estas realizaciones, los intervalos de porcentajes adecuados para el contenido de ácido linoleico en aceites también incluyen intervalos en los que el límite inferior se selecciona de los siguientes porcentajes: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 o 3,5 por ciento; y el límite superior se selecciona de los siguientes porcentajes: 3,5, 3, 2,5, 2 o 1,5 por ciento.

35 Un aceite es particularmente adecuado para su uso como un aceite para freír o cocinar. Debido a su contenido de ácidos grasos poliinsaturados reducido, el aceite no requiere el procesamiento extensivo de aceites típicos debido a que están presentes menos compuestos aromáticos y colorantes cuestionables. Además, el contenido de ácidos grasos saturados bajo del presente aceite mejora las propiedades de flujo en frío del aceite, y evita la necesidad de calentar el aceite almacenado para evitar que se cristalice o solidifique. El flujo en frío mejorado también potencia el drenaje del aceite de material de alimentos fritos una vez que se ha retirado el aceite para freír, dando como resultado de este modo un producto de grasas reducidas. Véase Bouchon y col., J. Food Science 66: 918-923 (2001). Los bajos niveles de ácido linoléico en el presente aceite son particularmente ventajosos en la fritura para reducir sabores indeseables.

45 El presente aceite también está bien adaptado para su uso como un aceite en ensalada (un aceite que mantiene la claridad a temperaturas de frigorífico de 4,44-10 grados centígrados). Su claridad mejorada a temperaturas de frigorífico, debido a su contenido de ácidos grasos saturados bajo y ácido linoleico moderado, reduce o elimina la necesidad de preparar para el invierno el aceite antes de su uso como un aceite de ensalada.

50 Además, el contenido de ácido linoleico moderado y ácido linoléico bajo del presente aceite lo hace adecuado para la producción de grasa comestible de cadena corta, margarina y otras grasas vegetales semisólidas usadas en productos alimentarios. La producción de estas grasas típicamente implica la hidrogenación de aceites insaturados tales como aceite de soja, aceite de maíz o aceite de colza. La mayor estabilidad oxidativa y de sabor del presente aceite significan que no es necesario hidrogenarlo en la medida en que el aceite vegetal típico es para usos tales como margarina y grasa comestible de cadena corta, reduciendo de este modo los costes de procesamiento y la producción de isómeros en *trans* poco sanos.

55 Un aceite también es adecuado para su uso como una materia prima para producir biocombustible, particularmente por que el biocombustible preparado a partir de dicho aceite tiene un flujo en frío mejorado, mejor calidad de ignición (número de cetano), estabilidad oxidativa mejorada, y emisiones de óxido nítrico reducidas. El biocombustible es un combustible de gasóleo alternativo típicamente comprendido de ésteres de metilo de ácidos grasos C₁₆-C₂₂ saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. El número de cetano es una medida de la calidad de ignición, cuanto menor sea el tiempo de retardo de la ignición del combustible en el motor, mayor será el número de cetano. La

60

especificación de patrones de ASTM para el biocombustible (D 6751-02) requiere un número de cetano mínimo de 47.

El uso de biocombustible en motores de gasóleo convencionales da como resultado reducciones sustanciales de contaminantes tales como sulfatos, monóxido de carbono y partículas en comparación con el combustible de gasóleo del petróleo, y su uso en autobuses escolares puede reducir en gran medida la exposición de los niños a gases de gasóleo tóxicos. Una limitación para el uso de biocombustible convencional al 100 % como combustible es el alto punto de turbidez del biocombustible de soja convencional (2 grados C) en comparación con el combustible número 2 (-16 grados C). Dunn y col., Recent. Res. Devel. in Oil Chem., 1: 31-56 (1997). El biocombustible realizado a partir del aceite tiene un punto de turbidez mejorado (reducido) y punto de obstrucción del filtro en frío, y también puede usarse en mezclas para mejorar las propiedades de temperatura en frío del biocombustible realizado a partir de fuentes económicas pero altamente saturadas de grasa tales como grasas animales (sebo, manteca, grasa de pollo) y aceite de palma. El biocombustible también puede mezclarse con gasóleo de petróleo a cualquier nivel.

El biocombustible se obtiene típicamente extrayendo, filtrando y refinando aceite de soja para retirar grasas libres y fosfolípidos, y después transesterificando el aceite con metanol para formar metil ésteres de los ácidos grasos. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.891.203. Los metil ésteres de soja resultantes se denominan habitualmente "biocombustible". El aceite también puede usarse como un combustible de gasóleo sin la formación de ésteres metílicos, tal como, por ejemplo, mezclando acetales con el aceite. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 6.013.114. Debido a su flujo en frío mejorado y propiedades de estabilidad oxidativa, el aceite también es útil como un lubricante, y como un aditivo de combustible de gasóleo. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.888.947, 5.454.842 y 4.557.734.

Las semillas de soja y aceites también son adecuados para su uso en una diversidad de alimentos de soja preparados a partir de semillas de soja completas, tales como leche de soja, manteca de nuez de soja, natto y tempeh, y alimentos de soja preparados a partir de semillas de soja procesadas y aceite de soja, incluyendo harina de soja, concentrado de proteína de soja, aislados de proteína de soja, concentrado de proteína de soja texturizado, proteína de soja hidrolizada, recubrimiento batido, aceite cocinado, aceite de ensalada, grasa comestible de cadena corta y lecitina. Las semillas de soja completas también son comestibles, y típicamente se venden a los consumidores crudas, tostadas o como edamame. La leche de soja, que se produce típicamente empapando y moliendo semillas de soja completas, puede consumirse tal cual, secada por pulverización o procesada para formar yogur de soja, queso de soja, tofu o yuba. La presente soja o aceite puede usarse provechosamente en estos y otros alimentos de soja debido a su estabilidad oxidativa mejorada, la reducción de precursores de sabor indeseable y su nivel de ácidos grasos saturados bajo.

G. Modulación de la supresión

Otra realización se refiere a un procedimiento para modular los niveles de supresión génica. La modulación de la supresión génica puede dar como resultado más o menos supresión génica. La supresión de un producto génico puede ser el resultado de la inserción de una construcción en un genoma vegetal. De forma similar, la modulación de la supresión génica puede ser el resultado de la inserción de una construcción en un genoma vegetal. Otros ejemplos de procedimientos para modular la supresión génica incluyen, sin limitación, técnicas antisentido, cosupresión, interferencia de ARN (iARNbc), animales transgénicos, híbridos y ribozimas usando una construcción como se ha descrito anteriormente.

La supresión de un gen puede modularse alterando la longitud del ADN transcribible usado para supresión, cuya secuencia deriva del gen al que se dirige la supresión. Pueden usarse muchos procedimientos para suprimir un gen usando mecanismos de silenciamiento génico postranscripcional. Sin limitarse a la teoría, se cree que estos procedimientos tienen en común la expresión de una molécula de ARN que hibrida con otra molécula de ARN. Sorprendentemente, puede tener ventajas usar una molécula de ARN de longitudes particulares para modular o moderar la supresión de los niveles de expresión de estado estacionario de un gen endógeno diana.

La supresión génica de *FAD2-1* conduce a niveles elevados de ácido oleico y reducción de los niveles de ácido linoleico. Cuando *FAD2-1* está fuertemente suprimido, los niveles de ácido oleico pueden ser mayores del 65 %, lo que provoca una reducción de los niveles de ácido palmítico y ácido linolénico. Por ejemplo, cuando se suprime *FAD2-1*, los niveles de ácido oleico pueden alcanzar el 85 % y los niveles de ácido palmítico y esteárico combinados se reducen a aproximadamente el 10 %. De forma similar, la regulación negativa de FATB da como resultado niveles reducidos de ácidos grasos saturados, principalmente palmitato. Cuando se suprimen *FAD2* y *FATB* de modo que los niveles de oleico son de aproximadamente el 85 %, los niveles saturados son de aproximadamente el 10 %. Cuando se suprimen *FAD2* y *FATB* de modo que los niveles oleicos sean mayores del 85 %, los niveles saturados pueden caer por debajo del 10 %.

A la luz de la presente invención, los niveles de saturados pueden reducirse a menos del 10 % sin potenciar los ácidos oleicos por encima del 85 %. En una realización, la supresión de *FAD2* está modulada por la reducción del intrón de *FAD2-1* introducido en la planta. Menos supresión de *FAD2* da como resultado niveles moderados de ácido oleico, aproximadamente el 40-85 % de ácido oleico. LA supresión de *FAD2* se reduce a medida que se reduce la longitud del fragmento del intrón de *FAD2-1* introducido. Por ejemplo, un intrón de *FAD2-1* reducido en longitud en al

menos 100 nucleótidos contiguos puede reducir la supresión de FAD2 y el aumento correspondiente de ácido oleico y reducción de niveles de ácido linoleico.

La relación entre la reducción de la supresión de gen endógeno y la reducción de la longitud del ADN homólogo pueden determinarse de forma empírica introduciendo diferentes longitudes de ADN. Por ejemplo, la cantidad de reducción en la supresión obtenible reduciendo la longitud de ADN introducido homólogo pueden determinarse suprimiendo partes crecientes del ADN homólogo que se introduce y ensayando con respecto a la expresión del gen diana.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para moderar la supresión de FAD2 teniendo aún una fuerte reducción de los niveles de saturado sobre una planta. En dichas plantas, los niveles de ácido oleico pueden variar del 40 al 85 %. De forma similar, se produce una supresión menor que la completa de FATB cuando se introducen las regiones no traducidas 3' y 5' combinadas en comparación con cuando se introduce el gen FATB de longitud completa en una célula huésped. De manera similar, se reducen los niveles de supresión de FATB cuando la parte 5' de la fase abierta de lectura, que principalmente codifica el péptido del tránsito de cloroplastos se introduce en una célula huésped. En células con FAD2 y FATB suprimidos usando procedimientos como se ha descrito anteriormente los niveles de ácido oleico del 40-85 % mientras que los niveles desaturados pueden estar entre el 1 y el 9 por ciento.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para modular la supresión génica para reducir la supresión respecto a la supresión de un elemento génico completo, en el que un elemento génico completo puede ser un gen completo, un exón completo, un intrón completo, una secuencia señal completa o una UTR completa, construyendo después una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un fragmento de la secuencia endógena del elemento génico; iniciando la expresión de la molécula de ácido nucleico recombinante en una célula huésped; y suprimiendo el gen endógeno con la molécula de ácido nucleico recombinante. El gen que se suprime puede ser cualquier gen, incluyendo *FAD2* y *FATB*. Se describe además en el presente documento un procedimiento para modular la supresión de FAD2 o FATB que comprende: expresar una secuencia del elemento génico *FAD2* o *FATB* parcial en una célula huésped, en el que un elemento génico *FAD2* o *FATB* es de un gen *FAD2* o *FATB* endógeno en la célula huésped y una secuencia de elemento génico *FAD2* o *FATB* puede ser un gen *FAD2* o *FATB*, un exón de *FAD2* o *FATB*, un intrón de *FAD2* o *FATB*, una región codificante de péptido de tránsito de *FAD2* o *FATB* o una UTR de *FAD2* o *FATB*; y la secuencia del elemento génico *FAD2* o *FATB* parcial es menor que la secuencia del elemento génico de *FAD2* o *FATB* completo; y suprimir un *FAD2* o *FATB* endógeno con la secuencia del elemento génico *FAD2* o *FATB* parcial, en el que los niveles de supresión del gen endógeno de *FAD2* o *FATB* en la célula huésped son menores que los niveles de supresión del gen endógeno *FAD2* o *FATB* en una célula huésped con un fondo genético similar y una segunda secuencia de ácido nucleico de *FAD2* o *FATB* que comprende la secuencia del elemento génico de *FAD2* o *FATB* completa del elemento génico *FAD2* o *FATB*.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para alterar la composición de aceite de una célula vegetal transformando una célula vegetal con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ADN que suprime la expresión endógena de *FAD2*, *FATB* o *FAD2* y *FATB* en el que la secuencia de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico de *FAD2*, *FATB* o *FAD2* y *FATB* que es más corta que la secuencia completa de un elemento génico completo seleccionado de un gen, un exón, un intrón, una región codificante de péptido de tránsito, una UTR 3', una UTR 5', y una fase abierta de lectura; y cultivar la célula vegetal en condiciones en las que se inicie la transcripción de dicha secuencia de ADN, de modo que la composición de aceite esté alterada respecto a una célula vegetal con un fondo genético similar pero que carece de la molécula de ácido nucleico recombinante. Un elemento génico de *FAD2* o *FATB* puede acortarse en longitud en 50, 75, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 800, 1000, 2000, 3000 o 4000 nucleótidos. Una longitud de un elemento génico de *FAD2* o *FATB* puede ser de 50, 75, 100, 150, 175, 200, 220, 250, 300, 320, 350, 400, 420, 450, 500, 550, 600, 800 o 1000 nucleótidos.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para potenciar el contenido de ácido oleico y reducir el contenido de ácidos grasos saturados en una semilla vegetal: i) acortando la longitud de una secuencia de ADN de *FAD2* exógena en una célula huésped hasta que la cantidad de supresión de la expresión de *FAD2* de una planta transformada se reduce al menos parcialmente respecto a la supresión de la expresión de *FAD2* en una célula huésped con un fondo genético similar y una secuencia de ADN del gen *FAD2* exógeno completo; y ii) cultivar una planta con una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ADN de *FAD2* acortada, en la que la secuencia de ADN de *FAD2* acortada suprime al menos parcialmente la expresión endógena de *FAD2*, y iii) cultivar una planta que produce semillas con un contenido reducido de ácidos grasos saturados respecto a la semilla de una planta que tiene un fondo genético similar pero que carece de la secuencia de ADN de *FAD2* acortada. La cantidad que la secuencia de ADN de *FAD2* exógena se acorta para reducir al menos parcialmente la supresión de la *FAD2* endógena puede determinarse de forma empírica introduciendo diferentes longitudes de ADN. Por ejemplo, la cantidad de reducción en supresión que puede obtenerse reduciendo la longitud del ADN introducido homólogo puede determinarse suprimiendo partes crecientes del ADN homólogo que se introduce y ensayando con respecto a la expresión del gen diana. La cantidad de supresión de la expresión de *FAD2* puede obtenerse como una media de tres o más, seis o más, diez o más, quince o más, o veinte o más semillas de una planta.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para producir una planta transformada que tiene

semillas con un contenido reducido de ácidos grasos saturados transformando una célula vegetal con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ADN que suprime la expresión endógena de FAD2 y FATB, en el que la secuencia de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico de FAD2 que es más corta que la secuencia completa de un elemento genético completo seleccionado de un gen, un exón, un intrón, una región codificante de péptido de tránsito, y una UTR; y cultivar la planta transformada, en el que la planta transformada produce semillas con un contenido reducido de ácidos grasos saturados respecto a semillas de una planta que tiene un fondo genético similar pero que carece de dicha molécula de ácido nucleico recombinante.

Se describe además un procedimiento para modular la composición de ácidos grasos de aceite de una semilla de un cultivo de semillas oleaginosas de clima templado aislando un elemento genético de al menos 40 nucleótidos de longitud que es capaz de suprimir la expresión de un gen endógeno en la ruta de síntesis de ácidos grasos; generar más de un fragmento acortado del elemento genético; introducir cada uno de los más de un fragmentos acortados en una célula vegetal del cultivo de semilla oleaginosa templado para producir plantas transgénicas; y seleccionar una planta transgénica que comprende un fragmento acortado de longitud y secuencia determinadas que efectúa un cambio deseable en la composición de ácidos grasos de aceite de semilla. En una realización preferida, el procedimiento anterior también incluye construir una construcción de ADN recombinante que tiene al menos dos fragmentos acortados de dos genes endógenos diferentes que efectúa cambios deseables diferentes en la composición de ácidos grasos de aceite de semillas; introducir la construcción de ADN recombinante en una célula vegetal del cultivo de semillas oleaginosas de clima templado para producir plantas transgénicas; y seleccionar una planta transgénica que comprende los al menos dos fragmentos acortados y una composición de ácidos grasos de aceite de una semilla que tiene más de un cambio deseable efectuado por los al menos dos fragmentos acortados.

En otra realización, la presente invención se refiere a una semilla de soja que muestra una composición de aceite que tiene un contenido muy reducido de ácidos grasos saturados y un contenido moderadamente potenciado de ácido oleico que tiene una secuencia de ADN que suprime la expresión endógena de FAD2 en una célula huésped, en el que la secuencia de ADN tiene una secuencia de ácido nucleico de FAD2 que es más corta que la secuencia completa de un elemento genético completo de un intrón.

Ejemplos

Ejemplo 1 Aislamiento de secuencias de FATB-2

Se obtiene tejido de hojas de soja variedad Asgrow A3244, se muele en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °C hasta su uso. Se añaden seis ml de tampón de extracción SDS (650 ml de ddH₂O estéril, 100 ml de Tris-Cl 1 M pH 8, 100 ml de EDTA 0,25 M, 50 ml de SDS 20 %, 100 ml de NaCl 5 M, 4 µl de betamercaptoetanol) a 2 ml de tejido de hoja congelado/molido, y la mezcla se incuba a 65 °C durante 45 minutos. La muestra se agita cada 15 minutos. Se añaden 2 ml de acetato potásico 5 M helado a la muestra, la muestra se agita, y después se incuba en hielo durante 20 minutos. Se añaden 3 ml de CHCl₃ a la muestra y la muestra se agita durante 10 minutos.

La muestra se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 minutos y se recoge el sobrenadante. Se añade 2 ml de isopropanol al sobrenadante y se mezclan. La muestra se centrifuga después a 10.000 rpm durante 20 minutos y se drena el sobrenadante. El sedimento se resuspende en 200 µl de RNasa y se incuba a 65 °C durante 20 minutos. Se añaden 300 µl de acetato de amonio/isopropanol (1:7) y se mezcla. La muestra se centrifuga después a 10.000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se descarta. El sedimento se aclara con 500 µl de etanol al 80 % y se permite que se seque al aire. El sedimento de ADN genómico se resuspende después en 200 µl de T10E1 (Tris 10 mM:EDTA 1 mM).

Se usa una secuencia de contig de ADNc de FATB-2 de soja (SEC ID N°: 42) para diseñar 13 oligonucleótidos que abarcan el gen: F1 (SEC ID N°: 48), F2 (SEC ID N°: 49), F3 (SEC ID N°: 50), F4 (SEC ID N°: 51), F5 (SEC ID N°: 52), F6 (SEC ID N°: 53), F7 (SEC ID N°: 54), R1 (SEC ID N°: 55), R2 (SEC ID N°: 56), R3 (SEC ID N°: 57), R4 (SEC ID N°: 58), R5 (SEC ID N°: 59) y R6 (SEC ID N°: 60). Los oligonucleótidos se usan en pares para amplificación por PCR del ADN genómico de soja aislado: par 1 (F1 + R1), par 2 (F2 + R1), par 3 (F3 + R2), par 4 (F4 + R3), par 5 (F5 + R4), par 6 (F6 + R5) y par 7 (F7 + R6). La amplificación por PCR para el par 5 se lleva a cabo de la siguiente manera: un ciclo, 95 °C durante 10 minutos; 30 ciclos, 95 °C durante 15 segundos, 43 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 45 segundos; 1 ciclo, 72 °C durante 7 minutos. Para todos los otros pares de oligo, se llevan a cabo amplificaciones por PCR de la siguiente manera: 1 ciclo, 95 °C durante 10 minutos; 30 ciclos, 95 °C durante 15 segundos, 48 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 45 segundos; 1 ciclo, 72 °C durante 7 minutos. Se obtienen fragmentos positivos de los pares de cebadores 1, 2, 4, 5, 6 y 7. Cada fragmento se clona en el vector pCR2.1 (Invitrogen). Los fragmentos 2, 4, 5 y 6 se confirman y secuencian. Estas cuatro secuencias se alinean para formar una secuencia genómica para el gen FATB-2 (SEC ID N°: 43).

Se identifican cuatro intrones en el gen FATB-2 de soja por comparación de la secuencia genómica con la secuencia de ADNc: el intrón I (SEC ID N°: 44) abarca de la base 119 a la base 1333 de la secuencia genómica (SEC ID N°: 43) y es de 1215 pb de longitud; el intrón II (SEC ID N°: 45) abarca de la base 2231 a la base 2568 de la secuencia genómica (SEC ID N°: 43) y es de 338 pb de longitud; el intrón III (SEC ID N°: 46) abarca de la base 2702 a la base 3342 de la secuencia genómica (SEC ID N°: 43) y es de 641 pb de longitud; y el intrón IV (SEC ID N°: 47) abarca de la base 3457 a la base 3823 de la secuencia genómica (SEC ID N°: 43) y es de 367 pb de longitud.

Ejemplo 2 Construcciones de supresión*2A. Construcciones de FAD2-1*

El intrón de *FAD2-1A* N° 1 (SEC ID N°: 1) se clona en el casete de expresión, pCGN3892, en orientaciones con sentido y antisentido. El vector pCGN3892 contiene el promotor 7S de soja y una *rbcS* 3' de guisante. Ambas fusiones génicas se ligan después por separado en pCGN9372, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV. Las construcciones de expresión resultante (pCGN5469 con sentido y pCGN5471 antisentido) se usan para transformación de soja.

El intrón de *FAD2-1B* (SEC ID N°: 2) se fusiona con el extremo 3' del intrón de *FAD2-1A* N° 1 en el plásmido pCGN5468 (contiene el promotor 7S de soja fusionado con el intrón de *FAD2-1A* (con sentido) y una *rbcS* 3' de guisante) o pCGN5470 (que contiene el promotor 7S de soja fusionado con el intrón de *FAD2-1A* (antisentido) y una *rbcS* 3' de guisante) en orientación con sentido y antisentido, respectivamente. Las fusiones de combinación de intrones resultantes se ligan después por separado en pCGN9372, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV. Las construcciones de expresión resultantes (pCGN5485, intrón de *FAD2-1A* y *FAD2-1B* con sentido y pCGN5486, intrón de *FAD2-1A* y *FAD2-1B* antisentido) se usan para transformación de soja.

2B. Construcciones de FAD3-1

Los intrones de *FAD3-1A* N° 1, N° 2, N° 4 y N° 5 (SEC ID N°: 7, 8, 10 y 11, respectivamente), intrones de *FAD3-1B* N° 3C (SEC ID N°: 23) y N° 4 (SEC ID N°: 24), se ligan todos por separado en pCGN3892, en orientación con sentido o antisentido. pCGN3892 contiene el promotor de 7S de soja y una *rbcS* 3' de guisante. Estas fusiones se ligan en pCGN9372, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV para transformación en soja. Las construcciones de expresión resultante (pCGN5455, intrón de *FAD3-1A* N° 4 con sentido; pCGN5459, intrón de *FAD3-1A* N° 4 antisentido; pCGN5456, intrón de *FAD3* N° 5 con sentido; pCGN5460, intrón de *FAD3-1A* N° 5 antisentido; pCGN5466, intrón de *FAD3-1A* N° 2 antisentido; pCGN5473, intrón de *FAD3-1A* N° 1 antisentido) se usan para transformación de soja.

2C. Construcción de FatB

La secuencia del intrón de *FATB-1* II de soja (SEC ID N°: 30) se amplifica mediante PCR usando un clon genómico parcial de *FATB-1* como molde. La amplificación por PCR se lleva a cabo de la siguiente manera: 1 ciclo, 95 °C durante 10 minutos; 25 ciclos, 95 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos; 1 ciclo, 72 °C durante 7 minutos. La amplificación por PCR da como resultado un producto que es de 854 pb de longitud, que incluye sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. El producto de PCR se clona directamente en el casete de expresión pCGN3892 en orientación con sentido. Por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR, para formar pMON70674. El vector pCGN3892 contiene el promotor de 7S de soja y una *rbcS* 3' de guisante. pMON70674 se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen de EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV. La construcción de expresión génica resultante, pMON70678, se usa para transformación de soja usando procedimientos de *Agrobacterium*.

Se crean otras dos construcciones de expresión que contienen la secuencia del intrón de *FATB-1* II de soja (SEC ID N°: 30). pMON70674 se corta con *Not*I y se liga en pMON70675 que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y el gen *KAS IV* regulado por el promotor de napina, dando como resultado pMON70680. El vector de expresión pMON70680 se corta después con *Sna*BI y se liga con una fusión génica del gen de delta-9 desaturasa de yoyoba (SEC ID N°: 41) en orientación con sentido regulado por el promotor de 7S. Las construcciones de expresión pMON70680 y pMON70681 se usan para transformación de soja usando procedimientos de *Agrobacterium*.

2D Construcciones de combinación

Se realizan construcciones de expresión que contienen diversas permutaciones de un primer conjunto de secuencias de ADN. El primer conjunto de secuencias de ADN es cualquiera de los descritos, o ilustrados en las FIGURAS 5 y 6, o cualquier otro conjunto de secuencias de ADN que contenga diversas combinaciones de regiones codificantes o no codificantes con sentido y antisentido *FAD2*, *FAD3* y *FATB* de modo que sean capaces de formar construcciones de ARNbc, construcciones de cosupresión con sentido, construcciones antisentido, o diversas combinaciones de las anteriores.

Las FIGURAS 5(a)-(c) representan varios primeros conjuntos de secuencias de ADN que son capaces de expresar construcciones antisentido o de cosupresión con sentido de acuerdo con la presente invención, cuyas secuencias no codificantes se describen en las Tablas 1 y 2 posteriores. Las secuencias no codificantes pueden ser secuencias individuales, combinaciones de secuencias (por ejemplo, la UTR 5' ligada a la UTR 3') o cualquier combinación de las anteriores. Para expresar una construcción de cosupresión con sentido, todas las secuencias no codificantes son secuencias con sentido y para expresar una construcción antisentido, todas las secuencias no codificantes son secuencias antisentido. La FIGURA 5(d) representa un primer conjunto de secuencias de ADN que es capaz de expresar construcciones con sentido y antisentido de acuerdo con la presente invención.

Las FIGURAS 6(a)-(c) representan varios primeros conjuntos de secuencias de ADN que son capaces de expresar construcciones de ARNbc de acuerdo con la presente invención, cuyas secuencias no codificantes se describen en las Tablas 1 y 2 posteriores. El primer conjunto de secuencias de ADN representada en la FIGURA 6 comprende pares de secuencias con sentido y antisentido relacionadas, dispuestas de modo que, por ejemplo, el ARN expresado por la primera secuencia con sentido sea capaz de formar un ARN bicatenario con el ARN antisentido expresado por la primera secuencia antisentido. Por ejemplo, en referencia a la FIGURA 6(a) y la combinación ilustrativa N° 1 (de la Tabla 1), el primer conjunto de secuencias de ADN comprende una secuencia de *FAD2-1* con sentido, una secuencia de *FAD3-1* con sentido, una secuencia de *FAD2-1* antisentido y una secuencia de *FAD3-1* antisentido. Ambas secuencias antisentido corresponden a las secuencia con sentido de modo que los productos de expresión del primer conjunto de secuencias de ADN sean capaces de formar un ARN bicatenario entre sí. Las secuencias con sentido pueden separarse de las secuencia antisentido por una secuencia espaciadora, preferentemente una que promueve la formación de una molécula de ARNbc. Los ejemplos de dichas secuencias espaciadoras incluyen las expuestas en Wesley y col., mencionado anteriormente, y Hamilton y col., Plant J., 15: 737-746 (1988). El promotor es cualquier promotor funcional en una planta, o cualquier promotor vegetal. Se describen ejemplos no limitantes de promotores adecuados en la Parte D de la Descripción Detallada.

El primer conjunto de secuencias de ADN se inserta en una construcción de expresión en la orientación con sentido o antisentido usando una diversidad de técnicas de manipulación de ADN. Si están presentes sitios de restricción convenientes en las secuencias de ADN, estos se insertan en la construcción de expresión digiriendo con las endonucleasas de restricción y ligamiento en la construcción que se ha digerido en uno o más de los sitios de clonación disponibles. Si no están disponibles sitios de restricción convenientes en las secuencias de ADN, el ADN de la construcción o las secuencias de ADN se modifican de diversas maneras para facilitar la clonación de las secuencias de ADN en la construcción. Los ejemplos de procedimientos para modificar el ADN incluyen por PCR, enlazador sintético o ligamiento de adaptador, mutagénesis dirigida *in vitro*, rellenando o recortando de los extremos 5' o 3' salientes, y similares. Estos y otros procedimientos para manipular el ADN se conocen bien por los expertos habituales en la materia.

pMON97552 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja unido de forma funcional con un intrón de *FAD2-1A* 1 de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce por 140 nucleótidos contiguos del extremo 3', uniéndose de forma funcional con 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a*, seguido de una región codificante de CTP de *FATB-1a*, uniéndose de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón de *FAD3-1A* 4 que se une de forma funcional con una región codificante de CTP de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón de *FAD2-1A* 1 de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce por 140 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante, todos los cuales están flanqueados por un RB y un LB. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93758 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 160 nucleótidos contiguos del extremo 5' y que se liga con una UTR 3' de *FATB-1a* seguido de una UTR 5' de *FATB-1a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de una UTR 3' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 160 nucleótidos contiguos del extremo 5' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON97553 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 200 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a* seguido de una región codificante de CTP de *FATB-1a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una región codificante de CTP de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 200 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93770 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 240 nucleótidos contiguos del extremo 3' y que se liga con una UTR 3' de *FATB-1a* y seguido de una UTR 5' de *FATB-1a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de una

UTR 3' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 240 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93759 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 240 nucleótidos contiguos del extremo 5' y ligado con una UTR 3' de *FATB-1a* y seguido de una UTR 5' de *FATB-1a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de una UTR 3' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 240 nucleótidos contiguos del extremo 5' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON97554 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 260 nucleótidos contiguos del extremo 3' y ligado con 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a*, seguido de una región codificante de CTP de *FATB-1a*, que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una región codificante de CTP de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 260 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93771 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 300 nucleótidos contiguos del extremo 3' y ligado con una UTR 3' de *FATB-1a* y seguido de una UTR 5' de *FATB-1a*, que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de una UTR 3' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 300 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON97555 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 300 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a* seguido de una región codificante de CTP de *FATB-1a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una región codificante de CTP de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 3200 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93760 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 5' y ligado con una UTR 3' de *FATB-1a* y seguido de una UTR 5' de *FATB-1a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de una UTR 3' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 5' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93772 contiene un promotor de $7S\alpha'$ de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 360 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con una UTR 3' de *FATB-1a* y seguido de una UTR 5' de *FATB-1a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A*

que se une de forma funcional con una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de una UTR 3' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 360 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante flanqueado todo por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON97556 contiene un promotor de 7S α ' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 380 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con 42 nucleótidos contiguos d una UTR 5' de *FATB-1a*, seguido de una región codificante de CTP de *FATB-1a*, que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A*, que se une de forma funcional con una región codificante de CTP de *FATB-1a* en la orientación antisentido seguido de 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación antisentido, que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 380 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93764 contiene un promotor de 7S α ' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 400 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con una región codificante de CTP de *FATB-1a* seguido de una región codificante de CTP de *FATB-2a* que se une de forma funcional con 70 nucleótidos del intrón 4 de *FAD3-1A* que se une de forma funcional con una región codificante de CTP de *FATB-2a* en la orientación antisentido seguido de una región codificante de CTP de *FATB-1a* en la orientación antisentido, seguido de un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 400 nucleótidos contiguos del extremo 3' y en la orientación antisentido, unido de forma funcional con una región codificante de CTP de *FATB-2a* en la orientación antisentido seguido de 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-2a* en la orientación antisentido unido de forma funcional con un segmento de poliadenilación 3' de *H6* con un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Tabla 1

Combinaciones Ilustrativas	Secuencias No Codificantes o Codificantes (con sentido o antisentido)			
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta
1	<i>FAD2-1A</i> <i>B</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>		
2	<i>FAD3-1A</i> <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>		
3	<i>FAD2-1A</i> <i>B</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente	
4	<i>FAD2-1A</i> <i>B</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FATB-1</i>	
5	<i>FAD2-1A</i> <i>B</i>	<i>FATB-1</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	
6	<i>FAD3-1A</i> <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	<i>FATB-1</i>	
7	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FATB-1</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	
8	<i>FATS-1</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	

(continuación)

Combinaciones Ilustrativas	Secuencias No Codificantes o Codificantes (con sentido o antisentido)
----------------------------	---

ES 2 532 351 T3

	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta
9	FATB-1	FAD2-1A o B	FAD3-1A o B o C	
10	FAD2-1A o B	FAD3-1A o B o C	secuencia FAD3-1A o B o C diferente	FATB-1
11	FAD3-1A o B o C	FAD2-1A o B	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente	FATB-1
12	FAD3-1A o B o C	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente	FAD2-1A o B	FATB-1
13	FAD2-1A o B	FAD3-1A o B o C	FATB-1	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente
14	FAD3-1A o B o C	FAD2-1A o B	FATB-1	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente
15	FAD3-1A o B o C	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente	FATB-1	FAD2-1A o B
16	FAD2-1A o B	FATB-1	FAD3-1A o B o C	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente
17	FAD3-1A o B o C	FATB-1	FAD2-1A o B	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente
18	FAD3-1A o B o C	FATB-1	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente	FAD2-1A o B
19	FATB-1	FAD2-1A o B	FAD3-1A o B o C	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente
20	FATB-1	FAD3-1A o B o C	FAD2-1A o B	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente
21	FATB-1	FAD3-1A o B o C	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente	FAD2-1A o B
22	FAD2-1A o B	FAD3-1A o B o C	FATB-2	
23	FAD2-1A o B	FATB-2	FAD3-1A o B o C	
24	FAD3-1A o B o C	FAD2-1A o B	FATB-2	
25	FAD3-1A o B o C	FATB-2	FAD2-1A o B	
26	FATB-2	FAD3-1A o B o C	FAD2-1A o B	
27	FATB-2	FAD2-1A o B	FAD3-1A o B o C	
28	FAD2-1A o B	FAD3-1A o B o C	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente	FATB-2
29	FAD3-1A o B o C	FAD2-1A o B	secuencia de FAD3-1A o B o C diferente	FATB-2

(continuación)

Combinaciones Ilustrativas	Secuencias No Codificantes o Codificantes (con sentido o antisentido)			
30	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	<i>FATB-2</i>
31	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FATB-2</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente
32	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	<i>FATB-2</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente
33	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente	<i>FATB-2</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>
34	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	<i>FATB-2</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente
35	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FATB-2</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente
36	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FATB-2</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>
37	<i>FATB-2</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente
38	<i>FATB-2</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente
39	<i>FATB-2</i>	<i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i>	secuencia de <i>FAD3-1A</i> o <i>B</i> o <i>C</i> diferente	<i>FAD2-1A</i> o <i>B</i>

Tabla 2

	Correlación de SEC ID N° con Secuencias en la Tabla 1						
	<i>FAD2-1A</i>	<i>FAD2-1B</i>	<i>FAD3-1A</i>	<i>FAD3-1B</i>	<i>FAD3-1C</i>	<i>FATB-1</i>	<i>FATB-2</i>
UTR 3'	SEC N°: 5	n/d	SEC N°: 16	SEC N°: 26	SEC N°: 61	SEC N°: 36	n/d
UTR 5'	SEC N°: 6	n/d	SEC N°: 17	SEC N°: 27	SEC N°: 62	SEC N°: 37	n/d
5'+UTR 3' (o 3'+UTR 5')	SEC unidas N°: 5 y 6	n/d	SEC unidas N°: 16 y 17	SEC unidas N°: 26 y 27	n/d	SEC unidas N°: 36 y 37	n/d
Intrón N° 1	SEC N°: 1	SEC N°: 2	SEC N°: 7	SEC N°: 19	n/d	SEC N°: 29	SEC N°: 44
Intrón N° 2	n/d	n/d	SEC N°: 8	SEC N°: 20	n/d	SEC N°: 30	SEC N°: 45
Intrón N° 3	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	SEC N°: 31	SEC N°: 46
Intrón N° 3A	n/d	n/d	SEC N°: 9	SEC N°: 21	n/d	n/d	n/d
Intrón N° 3B	n/d	n/d	SEC N°: 12	SEC N°: 22	n/d	n/d	n/d
Intrón N° 3C	n/d	n/d	SEC N°: 13	SEC N°: 23	n/d	n/d	n/d

(continuación)

	Correlación de SEC ID N° con Secuencias en la Tabla 1						
	<i>FAD2-1A</i>	<i>FAD2-1B</i>	<i>FAD3-1A</i>	<i>FAD3-1B</i>	<i>FAD3-1C</i>	<i>FATB-1</i>	<i>FATB-2</i>
Intrón N° 4	n/d	n/d	SEC N°: 10	SEC N°: 24	SEC N°: 14	SEC N°: 32	SEC N°: 47
Intrón N° 5	n/d	n/d	SEC N°: 11	SEC N°: 25	n/d	SEC N°: 33	n/d
Intrón N° 6	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	SEC N°: 34	n/d
Intrón N° 7	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	SEC N°: 35	n/d

Ejemplo 3 Construcciones de combinación

En las Figuras 7-15, los promotores se indican por flechas, las secuencias codificantes (tanto codificantes como no codificantes) se indican por pentágonos que apuntan en la dirección de la transcripción, las secuencias con sentido se marcan en texto normal, y las secuencias antisentido se marcan en texto invertido. Las abreviaturas usadas en estas Figuras incluyen: 7Sa = promotor 7S α ; 7Sa' = promotor 7S α '; Br napina = promotor de napina de *Brassica*; FMV = un promotor de FMV; ARC = promotor de arcelina; RBC E9 3' = señal de terminación de Rubisco E9; Nos 3' = señal de terminación *nos*; TML 3' = señal de terminación de *tml*; napina 3' = señal de terminación de napina; 3' (en la misma caja que FAD o FAT) = UTR 3'; 5' (en la misma caja que FAD o FAT) = UTR 5'; Cr = *Cuphea pulcherrima*; Gm = *Glycine max*; Rc = *Ricinus communis*; FAB2 = un alelo de FAB2 de un gen de delta 9 esteroil-desaturasa; e Intr o Int = intrón.

3A. Construcción de ARNbc

Las FIGURAS 7-9 representan moléculas de ácido nucleico de la presente invención en las que los primeros conjuntos de secuencias de ADN son capaces de expresar construcciones de ARNbc. El primer conjunto de secuencias de ADN representado en las FIGURAS 7-9 comprende pares de secuencias con sentido y antisentido relacionadas, dispuestas de tal modo que, por ejemplo, el ARN expresado por la primera secuencia con sentido sea capaz de formar un ARN bicatenario con el ARN antisentido expresado por la primera secuencia antisentido. Las secuencias con sentido pueden estar adyacentes a las secuencias antisentido, o separadas de las secuencia antisentido por una secuencia espaciadora, como se muestra en la FIGURA 9.

El segundo conjunto de secuencias de ADN comprende secuencias codificantes, cada una de las cuales es una secuencia de ADN que codifica una secuencia que cuando se expresa es capaz de aumentar uno o ambos de la proteína y el transcrito codificados por un gen seleccionado del grupo que consiste en *KAS I*, *KAS IV*, delta-9 desaturasa y EPSPS CP4. Cada secuencia codificante está asociada con un promotor, que puede ser cualquier promotor funcional en una planta, o cualquier promotor vegetal, y puede ser un promotor de FMV, un promotor de napina, un promotor 7S (7S α o 7S α '), un promotor de arcelina, un promotor de delta-9 desaturasa o un promotor de *FAD2-1A*.

En referencia ahora a la FIGURA 7, se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyan sitios de restricción que se han modificado de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios de *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se cortan vectores que contienen un gen de *KAS IV* de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulados por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de germinación 3' de napina de *Brassica*, y un gen de delta-9 desaturasa de *R. communis* (*FAB2*) gene (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se ligan en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON68539, se representa en la FIGURA 7 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), el intrón 4 de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 10) y el intrón II de *FATB-1* (SEC ID N°: 30) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, se separan por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja que puede con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una

secuencia de terminación 3' de *tml* por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON68540, se representa en la FIGURA 7 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), el intrón 4 de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 10) y el intrón II de *FATB-1* (SEC ID N°: 30) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml* por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* se corta con enzimas de restricción apropiadas, y se ligan en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON68544, se representa en la FIGURA 7 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), el intrón 4 de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 10), intrón II de *FATB-1* (SEC ID N°: 30) y el intrón 4 de *FAD3-1B* (SEC ID N°: 24) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción que se han modificado de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml* por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON68546, se representa en la FIGURA 7 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 8, se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción que se han modificado de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON68536, se representa en la FIGURA 8 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplificaron secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Se corta un vector que contiene un gen de delta-9 desaturasa de *R. communis* (*FAB2*) (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se liga justo cadena arriba de la secuencia de terminación 3' de *tml*. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON68537, se representa en la FIGURA 8 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina

de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON68538, se representa en la FIGURA 8 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

- 5 Haciendo referencia ahora a la FIGURA 9, se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FAT3-1B* (SEC ID N°: 26) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON80622, se representa en la FIGURA 9, y se usa para transformación usando procedimientos como se describe en el presente documento.
- 10
- 15 Se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) y UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, separados por un intrón 5 de *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste (SEC ID N°: 11), en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON80623, se representa en la FIGURA 9, y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.
- 20
- 25 Se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 5'-UTR 3' de *FAT3-1B* (SEC ID N°: 27 y 26, ligadas entre sí) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, O5, se representa en la FIGURA 9, y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.
- 30
- 35 Se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí) y UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido y antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen de KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, O6, se representa en la FIGURA 9 y se usa para transformación usando procedimientos como se describe en el presente documento.
- 40
- 45

3B. Construcciones de cosupresión con sentido

Las FIGURAS 10-13 y 19-20 representan moléculas de ácido nucleico de la presente invención en las que dos primeros conjuntos de secuencias de ADN son capaces de expresar construcciones de cosupresión con sentido. El segundo conjunto de secuencias de ADN comprende secuencias codificantes, cada una de las cuales es una secuencia de ADN que codifica una secuencia que cuando se expresa es capaz de aumentar uno o ambos de la proteína y el transcrito codificados por un gen seleccionado del grupo que consiste en *KAS I*, *KAS IV*, delta-9 desaturasa y EPSPS CP4. Cada secuencia codificante se asocia con un promotor, que es cualquier promotor funcional en una planta, o cualquier promotor vegetal, y puede ser un promotor de FMV, un promotor de mapona, un promotor de 7S (bien 7S α o 7S α '), un promotor de arcelina, un promotor de delta-9 desaturasa, o un promotor de *FAD2-1A*.

50

55

En referencia ahora a la FIGURA 10, se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), intrón 4 de *FAD3-1C* (SEC ID N°: 14), intrón II de *FATB-1* (SEC ID N°: 30), intrón 4 de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 10) e intrón 4 de *FAD3-1B* (SEC ID N°: 24) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan

60

directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' y una secuencia de terminación 3' de Rubisco de E9 de guisante, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON68522, se representa en la FIGURA 10 y se usa para transformación usando procedimientos como se describe en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), intrón 4 de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 10), intrón 4 de *FAD3-1B* (SEC ID N°: 24) e intrón II de *FATB-1* (SEC ID N°: 30) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se cortan vectores que contienen un gen de KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica*, y un gen de delta-9 desaturasa (*FAB2*) de *R. communis* (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se ligan en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON80614, se representa en la FIGURA 10 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican el intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de la expresión génica resultante, pMON68531, se representa en la FIGURA 10 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se cortan vectores que contienen un gen de KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica*, y un gen de delta-9 desaturasa (*FAB2*) de *R. communis* (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se ligan en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON68534, se representa en la FIGURA 10 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen de delta-9 desaturasa (*FAB2*) de *R. communis* (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON68535, se representa en la FIGURA 10 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 11, se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON80605, se representa en la FIGURA 11 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen de KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por el promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON80606, se representa en la FIGURA 11 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen de delta-9 desaturasa (*FAB2*) de *R. communis* (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON80607, se representa en la FIGURA 11 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se cortan vectores que contienen un gen de KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica*, y un gen de delta-9 desaturasa (*FAB2*) de *R. communis* (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se ligan en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON68534, se representa en la FIGURA 11 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 12, se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) y UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) de mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON80629, se representa en la FIGURA 12 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias del intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), intrón 4 de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 10), intrón II de *FATB-1* (SEC ID N°: 30) e intrón 4 de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 10) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *Not*I y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON81902, se representa en la FIGURA 12 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FAD3-1* (SEC ID N°: 17 y 16, ligadas entre sí, o 27 y 26, ligadas entre sí), y UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. El producto de PCR de *FAD2-1* se clona directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. De forma similar, el producto de PCR de *FAD3-1* se clona directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de

sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El producto de PCR de *FATB-1* se clona directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor de arcelina y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducido por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Estos vectores se cortan después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, O1, representa en la FIGURA 12 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FAD3-1* (SEC ID N°: 17 y 16, ligadas entre sí, o 27 y 26, ligadas entre sí), y UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. El producto de PCR de *FAD2-1* se clona directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. De forma similar, el producto de PCR de *FAD3-1* se clona directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El producto de PCR de *FATB-1* se clona directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor de arcelina y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducido por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Estos vectores se cortan después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen de KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, O2, se representa en la FIGURA 12 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 13, se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 5'-UTR 3' de *FAD3-1B* (SEC ID N°: 27 y 26, ligadas entre sí) mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Los vectores se cortan después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, O7, se representa en la FIGURA 13 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifica el intrón 1 de *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1 o 2), mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 5'-UTR 3' de *FAD3-1B* (SEC ID N°: 27 y 26, ligadas entre sí) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos* por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Los vectores se cortan después con *Not*I y se ligan en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, O9, se representa en la FIGURA 12 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Haciendo referencia ahora a la FIGURA 19, se amplifican secuencias no codificantes de *FATB-2* (SEC ID N°: 44-47), secuencias no codificantes de *FAD2-1* (SEC ID N°: 1 y 5-6), y secuencias no codificantes de *FATB-1* (SEC ID N°: 29-37) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientaciones con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *Xho*I introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Los vectores se cortan después con *Not*I y se ligan en pMON080612, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 19-A y se usa para transformación usando procedimientos

descritos en el presente documento.

Una secuencia de ADN que contiene una delta-9 desaturasa se regula por un promotor 7S alfa y se corta una secuencia de terminación 3' de *TML* usando las enzimas de restricción apropiadas y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión resultante se representa en la FIGURA 19-B y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de arcelina de judía y una secuencia de terminación 3' de napina con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en la construcción de la expresión anterior. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 19-C y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 20, se amplifican secuencias no codificantes de *FATB-2* (SEC ID N°: 44-47), secuencias no codificantes de *FAD2-1* (SEC ID N°: 1 y 5-6), secuencias no codificantes de *FATB-1* (SEC ID N°: 29-37), secuencias no codificantes de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 7-13 y 16-17) y secuencias no codificantes de *FAD3-1B* (SEC ID N°: 19-27) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. Los vectores se cortan después con *NotI* y se ligan en pMON080612, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 20-A y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Una secuencia de ADN que contiene una delta-9 desaturasa se regula por un promotor 7S alfa y se corta una secuencia de terminación 3' de *TML* usando las enzimas de restricción apropiadas y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión resultante se representa en la FIGURA 20-B y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de arcelina de judía *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en la construcción de la expresión anterior. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 20-C y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

pMON93501 contiene un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja 1 (SEC ID N°: 1) que se une de forma funcional con un promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *H6*, un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) que se une de forma funcional con un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica*, el gen de delta 9 desaturasa de *Ricinus communis* (Publicación de Solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/00229918 A1) que se une de forma funcional con un promotor 7SA de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV (un promotor constitutivo derivado de un virus del mosaico de la escrofularia) y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por elementos del extremo de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN en el extremo derecho (RB) y ADN del extremo izquierdo (LB). La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

3C. Construcciones antisentido

La FIGURA 14 representa molécula de ácido nucleico en la presente invención en las que los primeros conjuntos de secuencias de ADN son capaces de expresar construcciones antisentido, y las FIGURAS 15 a 18 representan moléculas de ácido nucleico de la presente invención en las que los primeros conjuntos de secuencias de ADN son capaces de expresar combinaciones de construcciones con sentido y antisentido. El segundo conjunto de secuencias de ADN comprende secuencias codificantes, cada una de las cuales es una secuencia de ADN que codifica una secuencia que cuando se expresa es capaz de aumentar uno o ambos de la proteína y el transcrito codificados por un gen seleccionado del grupo que consiste en KAS I, KAS IV, delta-9 desaturasa y EPSPS CP4. Cada secuencia codificante se asocia con un promotor, que es cualquier promotor funcional en una planta, o cualquier promotor vegetal, y puede ser un promotor de FMV, un promotor de napina, un promotor 7S (7S α o 7S α '), un promotor de arcelina, un promotor de delta-9 desaturasa o un promotor de *FAD2-1A*.

En referencia ahora a la FIGURA 14, se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) y UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON80615, se representa en la FIGURA 14 y se usa para transformación usando procedimientos como se describe en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) y UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON80616, se representa en la FIGURA 14 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) y UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen de delta-9 desaturasa de *R. communis* (*FAB2*) (SEC ID N°: 40) regulado por un promotor de *FAD2* de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos*, con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, pMON80617, se representa en la FIGURA 14 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 3' de *FAD2-1* (SEC ID N°: 5), UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 36) y UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, pMON80630, se representa en la FIGURA 14 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí), UTR 3' de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 16) y UTR 5'-UTR 3' de *FAT3-1B* (SEC ID N°: 27 y 26, ligadas entre sí) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, O8, se representa en la FIGURA 14 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 15, se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1A* (SEC ID N°: 17 y 16, ligadas entre sí) y UTR 5'-UTR 3' de *FAT1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido y antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, con un promotor 7S α ' de soja adicional localizado entre las secuencia con sentido y antisentido, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante, O3, se representa en la FIGURA 15 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Se amplifican secuencias de UTR 5'-UTR 3' de *FAD2-1* (SEC ID N°: 6 y 5, ligadas entre sí), UTR 5'-UTR 3' de *FATB-1A* (SEC ID N°: 27 y 26, ligadas entre sí) y UTR 5'-UTR 3' de *FAT1* (SEC ID N°: 37 y 36, ligadas entre sí) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido y antisentido, en un vector que contiene el promotor 7S α ' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*, con un promotor 7S α ' de soja adicional localizado entre las secuencia con sentido y antisentido, por medio de sitios *XhoI* introducidos por ingeniería genética en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector se corta después

con *NotI* y se liga en pMON41164, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica* con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en pMON41164. La construcción de expresión génica resultante, 04, se representa en la FIGURA 15 y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 16, se amplifican secuencias no codificantes de *FATB-2* (SEC ID N°: 44-47), secuencias no codificantes de *FATB-1* (SEC ID N°: 29-37) y secuencias no codificantes de *FAD2-1* (SEC ID N°: 1 y 5-6) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido y antisentido en un vector que contiene el promotor 7S α' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*. El vector se corta después con una endonucleasa de restricción apropiada y se liga en pMON080612, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 16-A y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Una secuencia de ADN que contiene una delta-9 desaturasa se regula por un promotor 7S alfa y se corta una secuencia de terminación 3' de *TML* usando las enzimas de restricción apropiadas y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión resultante se representa en la FIGURA 16-B y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de arcelina de judía y una secuencia de terminación 3' de napina con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 16-C y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 17, se amplifican secuencias no codificantes de *FATB-2* (SEC ID N°: 44-47), secuencias no codificantes de *FATB-1* (SEC ID N°: 29-37) y secuencias no codificantes de *FAD2-1* (SEC ID N°: 1 y 5-6), y secuencias no codificantes de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 7-13 y 16-17) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido y antisentido en un vector que contiene el promotor 7S α' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*. El vector se corta después con una endonucleasa de restricción apropiada y se liga en pMON080612, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 17-A y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Una secuencia de ADN que contiene una delta-9 desaturasa se regula por un promotor 7S alfa y se corta una secuencia de terminación 3' de *TML* usando las enzimas de restricción apropiadas y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión resultante se representa en la FIGURA 17-B y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de arcelina de judía y una secuencia de terminación 3' de napina con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 17-C y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

En referencia ahora a la FIGURA 18, se amplifican secuencias no codificantes de *FATB-2* (SEC ID N°: 44-47), secuencias no codificantes de *FATB-1* (SEC ID N°: 29-37) y secuencias no codificantes de *FAD2-1* (SEC ID N°: 1 y 5-6), y secuencias no codificantes de *FAD3-1A* (SEC ID N°: 7-13 y 16-17) y secuencias no codificantes de *FAD3-1B* (SEC ID N°: 19-27) de soja mediante PCR para dar como resultado productos de PCR que incluyen sitios de restricción modificados de nuevo por ingeniería genética en ambos extremos. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido y antisentido en un vector que contiene el promotor 7S α' de soja y una secuencia de terminación 3' de *tml*. El vector se corta después con una endonucleasa de restricción apropiada y se liga en pMON080612, un vector que contiene el gen EPSPS CP4 regulado por el promotor de FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 18-A y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Una secuencia de ADN que contiene una delta-9 desaturasa se regula por un promotor 7S alfa y se corta una secuencia de terminación 3' de *TML* usando las enzimas de restricción apropiadas y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión resultante se representa en la FIGURA 18-B y se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Se corta un vector que contiene un gen KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) regulado por un promotor de arcelina de judía y una secuencia de terminación 3' de napina con enzimas de restricción apropiadas, y se liga en la construcción de expresión anterior. La construcción de expresión génica resultante se representa en la FIGURA 18-

C y se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas son realizaciones preferidas que consiguen los objetos, características y ventajas de la presente invención. No se pretende que la presente invención se limite a las realizaciones ilustradas. La disposición de las secuencias en el primer y segundo conjuntos de secuencias de ADN dentro de la molécula de ácido nucleico no se limita a las disposiciones ilustradas y descritas, y puede alterarse de cualquier manera adecuada para conseguir los objetos, características y ventajas de la presente invención como se describen en el presente documento, ilustrado en las reivindicaciones adjuntas, y abarcado dentro de las reivindicaciones.

3D. Ensamblaje *in vivo*.

10 Un aspecto de la presente invención incluye una construcción de ADN que se ensambla en una unidad de transcripción recombinante en un cromosoma vegetal en la planta capaz de formar ARN bicatenario. El ensamblaje de dichas construcciones y los procedimientos para ensamblar *in vivo* una unidad de transcripción recombinante para supresión génica se describen en la Solicitud Internacional N° PCT/US2005/00681

15 pMON93505 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* y tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos del extremo de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN del extremo derecho (RB) y ADN del extremo izquierdo (LB). El primer segmento de ADN-T contiene un promotor 7S α ' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que está reducido en 100 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' y se liga con la UTR 3' de *FATB-1 α* seguido de una UTR 5' de *PATB-1 α* , un gen de KAS IV de *C. pulcherrima* (SEC ID N°: 39) que se une de forma funcional con un promotor de napina de *Brassica* y una secuencia de terminación 3' de napina de *Brassica*, un gen de delta 9 desaturasa de *Ricinus communis* (Publicación de Solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/00229918 A1) que se une de forma funcional con un promotor 7SA de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos* y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB).
20
25 En la misma construcción, en el segundo segmento de ADN-T, flanqueado por otro RB y LB, hay una secuencia de terminación 3' de *H6* que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la UTR 3' de *FATB-1 α* seguido de una UTR 5' de *FATB-1 α* . La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

30 Cuando se insertan los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7S α ' de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1 α* de soja con orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN unidas de forma funcional con orientación con sentido y antisentido son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.
35

pMON93506 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* que tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El primer ADN-T contiene un promotor 7S α ' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la UTR 3' de *FATB-1 α* seguido de una UTR 5' de *PATB-1 α* , un gen de delta 9 desaturasa de *Ricinus communis* (Publicación de Solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/00229918 A1) que se une de forma funcional con un promotor 7SA de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos* y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por LB y RB. El mismo vector, en el segundo segmento de ADN-T hay una secuencia de terminación 3' de *H6* unida de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la UTR 3' de *FATB-1 α* seguido de una UTR 5' de *FATB-1 α* , flanqueado por otro RB y LB. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.
40
45

50 Cuando se insertan los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7S α ' de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1 α* de soja con orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN unidas de forma funcional con orientación con sentido y antisentido son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.

55 pMON95829 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* que tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El primer ADN-T contiene un promotor 7S α ' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la UTR 3' de *FATB-1 α* seguido de una UTR 5' de *PATB-1 α* , un gen de delta 9 desaturasa de *Ricinus*

communis (Publicación de Solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/00229918 A1) que se une de forma funcional con un promotor 7SA de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos* y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por LB y RB. El mismo vector, en el segundo segmento de ADN-T hay una secuencia de terminación 3' de *H6* unida de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1α*, seguido de la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos ("CTP") de *FATB-1*, y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El mismo vector, en el segundo segmento de ADN-T flanqueado por otro RB Y LB, hay una secuencia de terminación 3' de *H6* que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con cualquiera de los nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1α*, seguido de la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos ("CTP") de *FATB-1α*. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se han descrito anteriormente.

Cuando se insertan los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1α* de soja con orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN unidas de forma funcional con orientación con sentido y antisentido son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.

pMON97595 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* que tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El primer segmento de ADN-T contiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la UTR 3' de *FATB-1α* seguido de una UTR 5' de *PATB-1α*, un gen de delta 9 desaturasa de *Ricinus communis* (Publicación de Solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/00229918 A1) que se une de forma funcional con un promotor 7SA de soja y una secuencia de terminación 3' de *nos* y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por LB y RB. El mismo vector, en el segundo segmento de ADN-T hay una secuencia de terminación 3' de *H6* unida de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1α*, seguido de la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos ("CTP") de *FATB-1*, y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El mismo vector, en el segundo segmento de ADN-T flanqueado por otro RB Y LB, hay una secuencia de terminación 3' de *H6* que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 100 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con cualquiera de los nucleótidos contiguos de una UTR 5' de *FATB-1α*, seguido de la región codificante de CTP de *FATB-1α*. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Cuando se insertan los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1α* de soja con orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN unidas de forma funcional con orientación con sentido y antisentido son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.

pMON97581 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* que tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El primer segmento de ADN-T contiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos ("CTP") de *FATB-1*, y un gen EPSPS CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante, todo flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). E la misma construcción, en el segundo segmento de ADN-T, flanqueado por otro RB Y LB, hay una secuencia de terminación 3' de *H6* unida de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos del extremo 3' y se liga la región codificante de CTP de *FATB-1α*. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

Cuando se insertan los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7Sα'

de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1α* de soja con orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN unidas de forma funcional con orientación con sentido y antisentido son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.

5 pMON97596 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* que tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El primer segmento de ADN-T contiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con los 180 pb 5' de la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos ("CTP") de *FATB-1*, y un gen *EPSPS* CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante, todo flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). En la misma construcción, en el segundo segmento de ADN-T, flanqueado por otro RB Y LB, hay una secuencia de terminación 3' de *H6* unida de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con los 180 pb 5' de la región codificante de CTP de *FATB-1α*. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

20 Cuando los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior se insertan en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1α* de soja en orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN en orientación con sentido y antisentido unidas de forma funcional son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.

25 pMON97597 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* que tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El primer segmento de ADN-T contiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con los 120 pb 5' de la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos ("CTP") de *FATB-1*, y un gen *EPSPS* CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante, todo flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). En la misma construcción, en el segundo segmento de ADN-T, flanqueado por otro RB Y LB, hay una secuencia de terminación 3' de *H6* unida de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 320 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con los 120 pb 5' de la región codificante de CTP de *FATB-1α*. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

35 Cuando los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior se insertan en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1α* de soja en orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN en orientación con sentido y antisentido unidas de forma funcional son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.

45 pMON97598 es una construcción usada para ensamblaje *in vivo* que tiene dos segmentos de ADN-T, cada uno flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). El primer segmento de ADN-T contiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 340 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos ("CTP") de *FATB-1*, y un gen *EPSPS* CP4 que se une de forma funcional con un promotor de EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante, todo flanqueado por elementos de los extremos de ADN-T de *Agrobacterium*, es decir ADN de extremo derecho (RB) y ADN de extremo izquierdo (LB). En la misma construcción, en el segundo segmento de ADN-T, flanqueado por otro RB Y LB, hay una secuencia de terminación 3' de *H6* unida de forma funcional con un intrón 1 de *FAD2-1A* de soja (SEC ID N°: 1), que se reduce en 340 nucleótidos contiguos del extremo 3' y se liga con la región codificante de CTP de *FATB-1α*. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos como se describen en el presente documento.

55 Cuando los dos segmentos de ADN-T de la construcción anterior se insertan en un único locus del cromosoma de un organismo huésped en una orientación RB a RB, la unidad de transcripción ensamblada tiene un promotor 7Sα' de soja que se une de forma funcional con el intrón 1 de *FAD2-1A* y fragmentos de ADN de *FATB-1α* de soja en orientación con sentido y antisentido. Cuando se transcriben, las secuencias de ARN en orientación con sentido y antisentido unidas de forma funcional son capaces de formar ARN bicatenario eficaz para la supresión de *FAD2-1A* y *FATB*.

Ejemplo 4 Transformación y análisis de plantas

Las construcciones de los Ejemplos 2 y 3 se introducen de forma estable en soja (por ejemplo, variedad Asgrow A4922 o variedad Asgrow A3244 o variedad Asgrow A3525) por los procedimientos descritos anteriormente, incluyendo los procedimientos de McCabe y col., Bio/Technology, 6: 923-926 (1988), o transformación mediada por *Agrobacterium*. Se identifican plantas de soja transformadas mediante selección en medios que contienen glifosato. Se analizan composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con las construcciones usando cromatografía de gases. Además, cualquiera de las construcciones puede contener otras secuencias de interés, así como diferentes combinaciones de promotores.

Para algunas aplicaciones, se detectan composiciones de ácidos grasos modificadas en semillas en desarrollo, mientras que en otros casos, tal como para análisis del perfil de aceite, la detección de las modificaciones de ácidos grasos se producirá más tarde en la ruta de FAS, o para la detección de modificaciones menores de la composición de ácidos grasos, se prefiere el análisis de ácidos grasos o aceite de semillas maduras. Además, puede ser deseable el análisis del contenido de aceite y/o ácidos grasos de semillas individuales, especialmente en la detección de la modificación de aceite en las poblaciones de semillas R₁ que se segregan. Como se usa en el presente documento, la generación R₀ indica la planta que surge de protocolos de transformación/regeneración descritos en el presente documento, la generación de R₁ indica semillas que han crecido en la planta R₀ transgénica autopolinizada. Las plantas R₁ crecen a partir de las semillas R₁.

Se determinan las composiciones de ácidos grasos para las semillas de líneas de soja transformadas con las construcciones del Ejemplo 3. De una a diez semillas de cada una de las semillas de soja transgénicas y de control se muelen individualmente usando un homogeneizador tisular (Pro Scientific) para extracción de aceite. Se extrae aceite de semillas de soja molidas durante una noche en 1,5 ml de heptano que contiene triheptadecanoína (0,50 mg/ml). Se derivatizan alícuotas de 200 µl del aceite extraído para metil ésteres con la adición de 500 µl de metóxido sódico en metanol absoluto. Se permite que la reacción de derivatización progrese durante 20 minutos a 50 °C. La reacción se detiene mediante la adición simultánea de 500 µl de cloruro sódico 10 % (p/v) y 400 µl de heptano. Los metil ésteres de ácidos grasos resultantes extraídos en hexano se resuelven por cromatografía de gases (CG) en un GC Hewlett-Packard modelo 6890 (Palo Alto, CA). La CG se equipó con una columna Supelcowax 250 (30 m, 0,25 mm id, 0,25 micrómetros de grosor de película) (Supelco, Bellefonte, PA). La temperatura de columna es de 175 °C en la inyección y la temperatura programa de 175 °C a 245 °C a 175 °C a 40 °C/minuto. Las temperaturas de inyector y detector son de 250 °C y 270 °C, respectivamente.

Ejemplo 5 Combustible sintetizado con propiedades de biocombustible mejoradas

Se prepara una composición de ácidos grasos de combustible sintetizado que tiene las siguientes mezclas de metilésteres de ácidos grasos: ácido oleico 73,3 %, ácido linoleico 21,4 %, ácido palmítico 2,2 %, ácido linolénico 2,1 % y ácido esteárico 1,0 % (todos en peso). Se obtienen metil ésteres de ácidos grasos purificados de Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN, Estados Unidos. El número de cetano y retardo de la ignición de esta composición se determinan por el Southwest Research Institute usando un Ignition Quality Tester ("IQT") 613 (Southwest Research Institute, San Antonio, Texas, Estados Unidos).

Un IQT consiste en una cámara de combustión de volumen constante que se calienta por electricidad, un sistema de inyección de combustible, y un ordenador que se usa para controlar el experimento, registrar los datos y proporcionar interpretación de los datos. El sistema de inyección de combustible incluye una boquilla inyectora de combustible que forma una entrada a la cámara de combustión. Un sensor de elevación de aguja en la boquilla inyectora de combustible detecta el flujo del combustible a la cámara de combustión. Un transductor de presión unido a la cámara de combustión mide la presión del cilindro, la presión dentro de la cámara de combustión. El concepto básico de un IQT es la medición del tiempo desde el comienzo de la inyección de combustible a la cámara de combustión hasta el comienzo de la combustión. Las condiciones termodinámicas en la cámara de combustión se controlan con precisión para proporcionar una medida uniforme del tiempo de retardo de ignición.

Para un ensayo de número de cetano y retardo de ignición, el combustible de ensayo se filtra a través de un filtro de 5 micrómetros. El depósito de combustible, la línea de inyección y la boquilla se purgan con nitrógeno presurizado. El depósito de combustible se limpia después con un paño sin pelusas. Una parte del combustible de ensayo se usa para lavar el depósito de combustible, la línea de inyección y la boquilla. El depósito se llena con el combustible de ensayo y se extrae todo el aire del sistema. El depósito se presuriza a 0,34 MPa. El procedimiento consiste básicamente en inyectar a alta presión una cantidad medida con precisión del combustible de ensayo en la cámara de combustión que se carga de aire a la presión y temperatura deseadas. La medición consiste en determinar el tiempo desde el inicio de la inyección hasta la aparición de combustión, denominado con frecuencia tiempo de retardo de ignición. Esta determinación se basa en las presiones medidas de elevación de aguja y la cámara de combustión. El procedimiento de clasificación de cetano normal requiere establecer la temperatura de la piel a 567,5 °C y la presión área a 2.1 MPa.

Se procesa un combustible con un retardo de inyección conocido en la bomba de combustión de IQT al comienzo del día para asegurar que la unidad funcione dentro de parámetros normales. Después se procesa el producto sintético de ensayo. El combustible conocido se procesa de nuevo para verificar que el sistema no ha cambiado.

Una vez que se vuelve a conectar el depósito de combustible a la bomba de inyección de combustible, se inicia el procedimiento de ensayo en el controlador de PC. El ordenador controla todo el procedimiento, incluyendo la carga de aire, la inyección de combustible y los eventos de escape. Se llevan a cabo 32 eventos de combustión repetidos.

5 El retardo de ignición es el tiempo desde el inicio de la inyección hasta el comienzo de la ignición. Se determina a partir de los datos de presión de cilindro y elevación de la aguja. La elevación de la aguja de inyección señala el comienzo de la inyección. La presión del cilindro baja ligeramente debido al efecto de enfriamiento de la vaporización del combustible. El comienzo de la combustión se define como el tiempo de recuperación de la presión del cilindro que aumenta debido a la combustión hasta la presión que hay justo antes de la inyección de combustible.

10 Se usan después los tiempos de retardo de la ignición medidos para determinar el número de cetano basándose en una curva de calibración que se incorpora al software de adquisición y reducción de datos. La curva de calibración, consiste en el número de cetano en función del tiempo de retardo de la ignición, se genera usando mezclas de los combustibles de referencia primarios y combustibles de comprobación de NEG. En el caso de combustibles de ensayo que son líquidos a condiciones ambientales, la curva de calibración se comprueba diariamente usando al menos un combustible de comprobación del número de cetano conocido (Ryan, "Correlation of Physical and Chemical Ignition Delay to Cetane Number", SAE Paper 852103 (1985); Ryan, "Diesel Fuel Ignition Quality as Determined in a Constant Volume Combustion Bomb", SAE Paper 870586 (1986); Ryan, "Development of a Portable Fuel Cetane Quality Monitor", Belvoir Fuels and Lubricants Research Facility Report N° 277, May (1992); Ryan, "Engine and Constant Volume Bomb Studies of Diesel Ignition and Combustion", SAE Paper 881616 (1988); y Allard y col., "Diesel Fuel Ignition Quality as Determined in the Ignition Quality Tester ("IQT")", SAE Paper 961182 (1996)).

15 Como se muestra en la Tabla 3, la composición de aceite sintetizado muestra números de cetano y retardo de ignición que son adecuados para su uso por ejemplo, sin limitación, como un aceite de biocombustible.

20

TABLA 3

Nombre del Combustible	Número de Ensayo	Número de Cetano	Desviación Típica del N° de Cetano	Retardo de la Ignición (ms)	Desviación Típica del Retardo de la Ignición
Comprobación Alta ¹	1777	49,55	0,534	4,009	0,044
	1778	49,33	0,611	4,028	0,051
Comprobación Alta	Media	49,4		4,02	
Aceite Sintetizado	1779	55,02	1,897	3,622	0,116
Aceite Sintetizado	1780	55,65	1,807	3,583	0,109
Aceite Sintetizado	1781	55,63	1,649	3,583	0,098
	Media	55,4		3,60	
Comprobación Alta	1786	49,2	0,727	4,04	0,061

¹ El combustible llamado "Comprobación Alta" es un combustible de calibración. Debería un número de cetano de $49,3 \pm 0,5$. La unidad se comprueba con la calibración antes y después de procesar el combustible de ensayo sintético.

25 La densidad (ASTM D-4052), punto de turbidez (ASTM D-2500), punto de vertido (ASTM D-97) y punto de taponamiento de filtro en frío (IP 309/ASTM D-6371) se determinan para el aceite sintetizado usando protocolos de ASTM D. Los protocolos de ASTM D se obtienen de ASTM, 100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA, Estados Unidos. Los resultados de estos ensayos se exponen en la Tabla 4. Como se muestra en la Tabla 4, la composición de aceite sintetizado muestra números que son adecuados para su uso como, por ejemplo, sin limitación, un aceite de biocombustible.

30

TABLA 4

ENSAYO	PROCEDIMIENTO	RESULTADOS
Densidad	ASTM D-4052	0,8791 g/ml
Punto de Turbidez	ASTM D-2500	-18 grados C
Punto de Vertido	ASTM D-97	-21 grados C

(continuación)

ENSAYO	PROCEDIMIENTO	RESULTADOS
Punto de Taponamiento de Filtro en Frío	IP 309 (igual que ASTM D-6371)	-21 grados C

5 Los niveles de emisiones de óxido nítrico se estiman evaluando los niveles de instauración de un combustible basado en productos biológicos, midiendo la densidad del combustible y calculando indirectamente los niveles de emisión estimados, o midiendo directamente. También hay protocolos convencionales disponibles para medir directamente niveles de emisiones de óxido nítrico. Se estima que el aceite sintetizado tiene niveles de emisiones de óxido nítrico menores que los metil ésteres de ácidos grasos realizados a partir de aceite de soja convencional basándose en una evaluación del nivel general de insaturación en el aceite sintetizado. Los aceites que contienen números mayores de dobles enlaces, es decir, que tienen un mayor grado de insaturación, tienden a producir 10 emisiones de óxido nítrico mayor. El aceite tiene un total de 123 dobles enlaces, en comparación con el total del aceite se soja convencional de 153 dobles enlaces, como se demuestra en la Tabla 5.

TABLA 5

ACEITE SINTÉTICO		
ácido oleico 73 % (18:1)	x 1 doble enlace =	73
ácido linoleico 22 % (18:2)	x 2 dobles enlaces =	44
ácido linolénico 2 % (18:3)	x 3 dobles enlaces =	6
	dobles enlaces TOTALES	123
ACEITE DE SOJA CONVENCIONAL		
ácido oleico 23 % (18:1)	x 1 doble enlace =	23
ácido linoleico 53 % (18:2)	x 2 dobles enlaces =	106
ácido linolénico 8 % (18:3)	x 3 dobles enlaces =	24
	dobles enlaces TOTALES	153

15 Como se ha indicado por el Laboratorio de Energía Renovable Nacional, N° de Contrato ACG-8-17106-02 Informe Final, The Effect Of Biodiesel Composition On Engine Emissions From A DDC Series 60 Diesel Engine, (junio de 2000), las emisiones de ácido nítrico de composiciones de biocombustible se predicen por la fórmula $y = 46,959x - 36,388$ en la que y es las emisiones de óxido en gramos/horas de potencia al freno; y x es la densidad del biocombustible. La fórmula se basa en un análisis de regresión de los datos de emisión de ácido nítrico en un ensayo que implica 16 biocombustibles. El ensayo utiliza un motor de la Detroit Diesel Corporation modelo de serie de producción 60, de calibración 1991.

20 La densidad del aceite sintetizado se determina por el Southwest Research Institute usando el procedimiento ASTM D4052. El resultado mostrado en la Tabla 4 se usa en la ecuación anterior para predecir un valor de emisión de óxido nítrico de 4,89 g/bhp-h. Este resultado se compara con un producto de soja de control. El informe del Laboratorio de Energía Renovable Nacional proporciona la densidad y las emisiones de óxido nítrico de un biocombustible basado en soja de control (IGT de metil éster de soja). La densidad del biocombustible de control es 25 de 0,8877 g/ml, proporcionando una emisión de óxido nítrico calculada de 5,30 g/bhp-h. El valor de emisión calculado es similar al valor experimental para emisión de óxido nítrico de 5,32 g/bhp-h. La composición de aceite sintetizada muestra números mejorados en comparación con el control y es adecuado para su uso, por ejemplo sin limitación, como un aceite de biocombustible.

Ejemplo 6 Composición de ácidos grasos óptima para niveles de lípidos en suero sanos

30 Se determinan las propiedades reductoras de colesterol de composiciones vegetales para identificar composiciones de ácidos grasos que tienen un efecto más favorable en los niveles de lípidos en suero que el aceite de soja convencional (es decir, menor colesterol LDL y mayor colesterol HDL). Se usan ecuaciones publicadas basándose en 27 ensayos clínicos (Mensink, R. P. y Katan, M. B. Arteriosclerosis and Thrombosis, 12: 911-919 (1992)) para comparar los efectos en los niveles de lípidos en suero en seres humanos de nuevas composiciones de semillas oleaginosas con los del aceite de soja normal.

La Tabla 6 a continuación presente los resultados del cambio en los niveles de lípidos en suero en los que el 30 % de la energía dietética de carbohidratos se sustituye por lípidos. Los resultados muestran que el aceite de soja ya tiene efectos favorables en los lípidos en suero cuando reemplaza carbohidratos en la dieta. Las mejoras en esta composición son posibles reduciendo niveles de ácidos grasos saturados y obteniendo un nivel de ácido linoleico entre el 10 y el 30 % de los ácidos grasos totales, preferentemente aproximadamente el 15-25 % de los ácidos grasos totales. Cuando la proporción de ácidos linoleico es menor del 10 % de los ácidos grasos totales, la nueva composición eleva el colesterol (LDL) en comparación con el aceite de soja de control, incluso aunque el contenido de grasas saturadas se reduce al 5 % de los ácidos grasos totales. Cuando se aumenta la proporción de ácido linoleico, se reduce la capacidad de la composición para elevar los niveles de HDL en suero. Por lo tanto, se determina que la composición de ácido linoleico preferida es de aproximadamente el 15-25 % de los ácidos grasos totales.

Tabla 6

	Ácidos grasos						Lípidos en Suero
	C16:0	C18: 0	C18:1	C18:2	C18: 3	Otros (C20:1)	
Control de soja (%)	11,000	4,000	23,400	53,200	7,800	0,600	
Proporción de grasa E al 30 % (%)	3,300	1,200	7,020	15,960	2,340	0,180	
Cálculo de LDL (mg/dl)	4,224	1,536	1,685	8,778	1,287	0,043	-6,033
Cálculo de HDL (mg/dl)	1,551	0,564	2,387	4,469	0,655	0,061	9,687
18:2 al 3 %, <6 % sat (%)	3,000	2,000	85,000	3,000	3,000	4,000	
Proporción de grasa E al 30 % (%)	0,900	0,600	25,500	0,900	0,900	1,200	
Cálculo de LDL (mg/dl)	1,152	0,768	6,120	0,495	0,495	0,288	-5,478
frente a control (mg/dl)							0,555
Cálculo de HDL (mg/dl)	0,423	0,282	8,670	0,252	0,252	0,408	10,287
frente a control (mg/dl)							0,600
18:2 10 %, <6% sat (%)	3,000	2,000	72,000	10,000	3,000	10,000	
Proporción de grasa E al 30 % (%)	0,900	0,600	21,600	3,000	0,900	3,000	
Cálculo de LDL (mg/dl)	1,152	0,768	5,184	1,650	0,495	0,720	-6,129
frente a control (mg/dl)							-0,096
Cálculo de HDL (mg/dl)	0,423	0,282	7,344	0,840	0,252	1,020	10,161
frente a control (mg/dl)							0,474
18:2 20%, <6% sat (%)	3,000	2,000	65,000	20,000	3,000	7,000	
Proporción de grasa E al 30 % (%)	0,900	0,600	19,500	6,000	0,900	2,100	
Cálculo de LDL (mg/dl)	1,152	0,768	4,680	3,300	0,495	0,504	-7,059
frente a control (mg/dl)							-1,026
Cálculo de HDL (mg/dl)	0,423	0,282	6,630	1,680	0,252	0,714	9,981
frente a control (mg/dl)							0,294
18:2 21 %, <3.2% sat (%)	2,000	1,000	72,000	21,000	1,000	3,000	
Proporción de grasa E al 30 % (%)	0,600	0,300	21,600	6,300	0,300	0,900	
Cálculo de LDL (mg/dl)	0,768	0,384	5,184	3,465	0,165	0,216	-7,878
frente a control (mg/dl)							-1,845

(continuación)

	Ácidos grasos						Lípidos en Suero
	C16:0	C18: 0	C18:1	C18:2	C18: 3	Otros (C20:1)	
Cálculo de HDL (mg/dl)	0,282	0,141	7,344	1,764	0,084	0,306	9,921
frente a control (mg/dl)							0,234
18:2 30%, <6% sat (%)	3,000	2,000	57,000	30,000	3,000	5,000	
Proporción de grasa E al 30 % (%)							
Cálculo de LDL (mg/dl)	1,152	0,768	4,104	4,950	0,495	0,360	-7,989
frente a control (mg/dl)							-1,956
Cálculo de HDL (mg/dl)	0,423	0,282	5,814	2,520	0,252	0,510	9,801
frente a control (mg/dl)							0,114

Ejemplo 7

Las catorce etapas siguientes ilustran la construcción del vector pMON68537 diseñado para transformación de plantas para suprimir los genes *FAD2*, *FAD3* y *FATB* y sobreexpresar delta-9 desaturasa en soja. En particular, la construcción comprende un promotor 7S alfa unido de forma funcional con un intrón y UTR 3' en orientación con sentido de soja, es decir un intrón N° 1 de *FAD2-1A*, una UTR 3' de *FAD3-1A*, una UTR 3' de *FATB-1*, un intrón con capacidad de corte y ajuste que forma un bucle en horquilla y una serie complementaria de intrón y UTR 3' en orientación antisentido de soja, es decir, una UTR 3' de *FATB-1*, una UTR 3' de *FAD3-1A* y un intrón N° 1 de *FAD2-1A* y el promotor de *FAD2* de soja que conduce la delta-9 desaturasa.

- 5 **Etapa 1** - El intrón N° 5 de *FAD3-1A* de soja que actúa como la parte de intrón con capacidad de corte y ajuste de la construcción de iARNbc, se amplifica por PCR usando ADN genómico de soja como molde, con los siguientes cebadores:

cebador 5' = 19037 = ACTAGTATATTGAGCTCATATTCCACTGCAGTGGATATT

**GTTTAAACATAGCTAGCATATTACGCGTATATTATAACAAGCTTATATTCCCGGG
ATATTGTCGACATATTAGCGGTACATTTTATTGCTTATTCAC**

- 15 cebador 3' = 19045 = ACTAGTATATTGAGCTCATATTCTGCAGGATATTCTCGAG

**ATATTCACGGTAGTAATCTCCAAGAACTGGTTTTGCTGCTTGTGTCTGCAGTGA
ATC.**

- 20 Estos cebadores añaden sitios de clonación a los extremos 5' y 3'. Al extremo 5': SpeI, SacI, BstXI, Pml, NheI, MluI, HindIII, XmaI, SmaI, Sall. Al extremo 3': SpeI, SacI, Sse8387I, XhoI. El producto de PCR de intrón N° 5 de *FAD3-1A* de soja se clona en pCR2.1, dando como resultado KAWHIT03.0065. KAWHIT03.0065 se digiere después con SpeI y los extremos se llenan con la Pfu polimerasa y pMON68526 (vector resistente a cloranfenicol vacío (n lo sucesivo en el presente documento CM)) se digiere con HindIII y los extremos se llenan con la Pfu polimerasa. KAWHIT03.0065 y pMON68526 se ligan después para crear pMON68541 (intrón N° 5 de *FAD3-1A* de soja con múltiples sitios de clonación en vector resistente a Amp).

- 25 **Etapa 2** - La UTR 3' de *FATB-1* de soja se amplifica con los siguientes cebadores: 18662= TTTTAATTACAATGAGAATGAGATTTACTGC (añadiendo Bsp120I al extremo 5') y 18661=GGGCCCGATTTGAAATGGTTAACG. El producto de PCR se liga después en pCR2.1 para realizar KAWHIT03.0036.

- 30 **Etapa 3** - se digiere después KAWHIT03.0036 con Bsp120I y EcoRI y después se clona en KAWHIT03.0032 (vector resistente a CM vacío con un sitio de clonación múltiple) para realizar KAWHIT03.0037 (UTR 3' de *FATB-1* en vector resistente a CM vacío).

Etapa 4 - La UTR 3' de *FAD3-1A* de soja se amplifica con los siguientes cebadores: 18639= GGGCCCGTTTCAAACCTTTTTGG (añadiendo Bsp120I al extremo 5') y 18549= TGAAACTGACAATTCAA. El producto de PCR se liga después en pCR2.1 para realizar KAWHIT03.0034.

Etapa 5 - KAWHIT03.0034 se digiere con Bsp120I y EcoRI y después se liga en KAWHIT03.0032 (vector resistente a CM vacío con un sitio de clonación múltiple) para realizar KAWHIT03.0035 (UTR 3' de *FAD3-1A* en vector resistente a CM vacío).

5 Etapa 6 - El intrón N° 1 de *FAD 2-1A* de soja se amplifica por PCR usando ADN genómico de soja como molde, con los siguientes cebadores: cebador 5' = 18663 = GGGCCCGGTAAATTAAATTGTGC (Añadiendo sitio Bsp120I al extremo 5'); y cebador 3' = 18664 = CTGTGTCAAAGTATAACAAGTTCAG. El producto de PCR resultante se clona en pCR 2.1 creando KAWHIT03.0038.

10 Etapa 7 - Se clona el producto de PCR del intrón N° 1 *FAD 2-1A* de soja de KAWHIT03.0038 en KAWHIT03.0032 (vector resistente a CM vacío con un sitio de clonación múltiple) usando los sitios de restricción Bsp120I y EcoRI. El plásmido resultante es KAWHIT03.0039 (intrón N° 1 *FAD 2-1A* de soja en vector resistente a CM vacío).

Etapa 8 - Se digiere KAWHIT03.0039 con *Ascl* y *HindIII* y se digiere pMON68541 (vector básico resistente a *iARNbc* AMP de intrón N° 5 *FAD3-1A*) con *MluI* y *HindIII*. El intrón N° 1 *FAD 2-1A* de soja después se clona de forma direccional en pMON68541 para generar KAWHIT03.0071 (intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja con intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja).

15 Etapa 9 - Se digiere KAWHIT03.0035 (UTR 3' de *FAD3-1A* en vector resistente a CM) con *Ascl* y *HindIII* y se digiere KAWHIT03.0071 (intrón *FAD2-1A* y vector básico resistente a *iARNbc* AMP del intrón N° 5 *FAD3-1A*) con *MluI* y *HindIII*. La UTR 3' de *FAD 3-1A* de soja después se clona de forma direccional en KAWHIT03.0071 para generar KAWHIT03.0072 (intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja y UTR 3' de *FAD3-1A* con intrón N° 5 *FAD3-1A*).

20 Etapa 10 - Se digiere KAWHIT03.0037 (UTR 3' de *FATB-1* en vector resistente a CM) con *Ascl* y *HindIII* y se digiere KAWHIT03.0072 con *MluI* y *HindIII*. La UTR 3' de *FATB-1* después se clona de forma direccional en KAWHIT03.0072 para crear KAWHIT03.0073 (intrón *FAD2-1A* de soja, UTR 3' de *FAD3-1A*, UTR 3' de *FATB-1* con intrón N° 5 *FAD3-1A*).

25 Etapa 11 - Se digiere KAWHIT03.0073 con *BstXI* y *Sall* y el fragmento que contiene el intrón *FAD2-1A*, la UTR 3' de *FAD3-1A* y la UTR 3' de *FATB-1* se purifica en gel. En un tubo diferente se digiere KAWHIT03.0073 con *XhoI* y *Sse8387I*. El fragmento de intrón/UTR 3' después se clona de nuevo en KAWHIT03.0073 en la orientación opuesta al otro sitio del intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja para crear KAWHIT03.0074 (intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste, UTR 3' de *FATB-1* de soja antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido).

30 Etapa 12 - Para ligar la construcción *iARNbc* al promotor 7S alfa' y al TML 3', se digieren KAWHIT03.0074 y pMON68527 (casete 7Sa'/TML3') con *SacI* y se ligan juntos para crear pMON68563 (promotor 7S alfa' - intrón N° 1 *FAD2-1A* con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con capacidad de corte y ajuste antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido - TML3').

35 Etapa 13 - Para introducir la construcción *iARNbc* ensamblada en pMON70682, se digieren pMON68563 y pMON70682 con *NotI* y se ligan juntos para formar pMON68536 que comprende un promotor 7S alfa' unido de forma funcional a la construcción que forma ARN bicatenario de intrón N° 1 *FAD2-1A* con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste, UTR 3' de *FATB-1* de soja antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido y terminador TML3').

45 Etapa 14 - Después se digiere pMON68536 con *Ascl* y *RsrII* y se digiere pMON68529 (que contiene el marcador de selección CP4 fusionado al promotor FMV y la RBCS 3' y el promotor *FAD2* de soja que dirige la delta 9 desaturasa) con *SanDI* y *Ascl*. La parte *iARNbc* de pMON68536 se clona de forma direccional en pMON68529 para crear pMON68537 (promotor 7S alfa' unido de forma funcional a la construcción que forma ARN bicatenario de intrón N° 1 *FAD2-1A* con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste, UTR 3' de *FATB-1* de soja antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido y terminador TML3' y promotor *FAD2* que dirige la delta 9 desaturasa).

Ejemplo 8

50 Las siguientes quince etapas ilustran la construcción del vector pMON68539 (Figura 22) diseñado para la transformación de plantas para suprimir los genes *FAD2*, *FAD3*, y *FATB* y sobreexpresar la delta-9 desaturasa y la enzima KASIV en soja. En particular, la construcción comprende un promotor 7S alfa unido de forma funcional a intrón orientado con sentido de soja y UTR 3', es decir, un intrón N° 1 *FAD2-1A*, una UTR 3' de *FAD3-1A*, una UTR 3' de *FATB-1*, un intrón con capacidad de corte y ajuste que forma bucles de horquilla, y una serie complementaria de intrón orientado antisentido de soja y UTR 3', es decir, una UTR 3' de *FATB-1*, una UTR 3' de *FAD3-1A* y un intrón N° 1 *FAD2-1A*, dirigiendo el promotor *FAD2* de soja la delta-9 desaturasa, y dirigiendo el promotor Napin a KASIV.

Etapa 1 - El intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja, que sirve como parte de intrón con capacidad de corte y ajuste de la construcción iARNbc, se amplifica por PCR usando ADN genómico de sonda como molde, con los siguientes cebadores:

Cebador 5' = 19037 =

5 ACTAGTATATTGAGCTCATATTCCACTGCAGTGGATATTG

**TTTAAACATAGCTAGCATATTACGCGTATATTATACAAGCTTATATTCCCGGGATATTGTCGACATATT
AGCGGTACATTTTATTGCTTATTAC**

Cebador 3' = 19045 =

ACTAGTATATTGAGCTCATATTCCTGCAGGATATTCTCGAG

10 **ATATTCACGGTAGTAATCTCCAAGAACTGGTTTTGCTGCTTGTGTCTGCAGTGAATC.**

Estos cebadores añaden sitios de clonación a los extremos 5' y 3'. Al extremo 5': SpeI, SacI, BstXI, PmeI, NheI, MluI, Hind III, XmaI, SmaI, Sall. Al extremo 3': SpeI, SacI, Sse8387I, XhoI. El producto de PCR del intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja se clona en pCR2.1, produciendo KAWHIT03.0065. KAWHIT03.0065 después se digiere con SpeI y los extremos se llenan con polimerasa Pfu y se digiere pMON68526 (vector resistente a CM vacío) con HindIII y los extremos se rellenan con polimerasa Pfu. Se ligan KAWHIT03.0065 y pMON68526 para crear pMON68541 (intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja con sitios de clonación múltiple en vector resistente a Amp).

15

Etapa 2 - La UTR 3' de *FATB-1* de soja se amplifica con los siguientes cebadores: 18662= TTTTAATTACAATGA-GAATGAGATTTACTGC (que añade Bsp120I al extremo 5') y 18661= GGGCCCGATTGAAATGGTTAACG. El producto de PCR después se liga en pCR2.1 para crear KAWHIT03.0036.

20 **Etapa 3** - Después se digiere KAWHIT03.0036 con Bsp120I y EcoRI y después se clona en KAWHIT03.0032 (vector resistente a CM vacío con un sitio de clonación múltiple) para crear KAWHIT03.0037 (UTR 3' de *FATB-1* en vector resistente a CM vacío).

Etapa 4 - La UTR 3' de *FAD3-1A* de soja se amplifica con los siguientes cebadores: 18639= GGGCCCGTT-TCAAACCTTTTTGG (que añade Bsp120I al extremo 5') y 18549= TGAAACTGACAATTCAA. El producto de PCR después se liga en pCR2.1 para crear KAWHIT03.0034.

25

Etapa 5 - Se digiere KAWHIT03.0034 con Bsp120I y EcoRI y después se liga en KAWHIT03.0032 (vector resistente a CM vacío con un sitio de clonación múltiple) para crear KAWHIT03.0035 (UTR 3' de *FAD3-1A* en vector resistente a CM vacío).

30 **Etapa 6** - Se amplifica por PCR el intrón N° 1 *FAD 2-1A* de soja usando ADN genómico de soja como molde, con los siguientes cebadores: 5' primer = 18663 = GGGCCCGGTAAATTAATTGTGC (que añade sitio Bsp120I al terminador 5'); y cebador 3' = 18664 = CTGTGTCAAAGTATAACAAGTTCAG. El producto de PCR resultante se clona en pCR 2.1 creando KAWHIT03.0038.

Etapa 7 - Se clona el producto de PCR de intrón N° 1 *FAD 2-1A* de soja de KAWHIT03.0038 en KAWHIT03.0032 (vector resistente a CM vacío con un sitio de clonación múltiple) usando los sitios de restricción Bsp120I y EcoRI. El plásmido resultante es KAWHIT03.0039 (intrón N° 1 *FAD 2-1A* de soja en vector resistente a CM vacío).

35

Etapa 8 - Se digiere KAWHIT03.0039 con AclI y HindIII y se digiere pMON68541 (vector básico resistente a iARNbc AMP de intrón N° 5 *FAD3-1A*) con MluI y HindIII. El intrón N° 1 *FAD 2-1A* de soja después se clona de forma direccional en pMON68541 (intrón N° 5 *FAD3-1A* en vector resistente a AMP con sitios de clonación múltiple) para generar KAWHIT03.0071 (intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja con intrón N° 5 *FAD3-1A*).

40 **Etapa 9** - Se digiere KAWHIT03.0035 (UTR 3' de *FAD3-1A* en vector resistente a CM) con AclI y HindIII y se digiere KAWHIT03.0071 (vector básico resistente a iARNbc AMP de intrón *FAD2-1A* e intrón N° 5 *FAD3-1A*) con MluI y HindIII. La UTR 3' de *FAD 3-1A* de soja después se clona de forma direccional en KAWHIT03.0071 para generar KAWHIT03.0072 (intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja y UTR 3' de *FAD3-1A* con intrón N° 5 *FAD3-1A*).

Etapa 10 - Se digiere KAWHIT03.0037 (UTR 3' de *FATB-1* en vector resistente a CM) con AclI y HindIII y se digiere KAWHIT03.0072 con MluI y HindIII. La UTR 3' de *FATB-1* después se clona de forma direccional en KAWHIT03.0072 para crear KAWHIT03.0073 (intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja, UTR 3' de *FAD3-1A*, UTR 3' de *FATB-1* con intrón N° 5 *FAD3-1A*).

45

Etapa 11 - Se digiere KAWHIT03.0073 con BstXI y Sall y el fragmento que contiene intrón *FAD2-1A*, UTR 3' de *FAD3-1A* y UTR 3' de *FATB-1* se purifica en gel. En un tubo diferente se digiere KAWHIT03.0073 con XhoI y Sse8387I. El fragmento de intrón/UTR 3' después se clona de nuevo en KAWHIT03.0073 en la orientación opuesta en el otro sitio de intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja para crear KAWHIT03.0074 (intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, intrón N° 5 *FAD3-1A* de

50

soja con capacidad de corte y ajuste, UTR 3' de *FATB-1* de soja antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido).

5 Etapa 12 - Para unir la construcción iARNbc al promotor 7S alfa' y el TML 3', se digieren KAWHIT03.0074 y pMON68527 (casete 7Sa'/TML3') con SacI y se ligan juntos para crear pMON68563 (promotor 7S alfa' - intrón N° 1 *FAD2-1A* con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con capacidad de corte y ajuste antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido - TML3').

10 Etapa 13 - Para introducir la construcción iARNbc ensamblada en pMON70682, se digieren pMON68563 y pMON70682 con NotI y se ligan juntos para formar pMON68536 que comprende un promotor 7S alfa' unido de forma funcional a la construcción que forma ARN bicatenario de intrón N° 1 *FAD2-1A* con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido y el terminador TML3').

15 Etapa 14 - pMON68536 se digiere después con Ascl y RsrII y se digiere pMON68529 (que contiene el marcador de selección CP4 fusionado con el promotor FMV y la RBCS 3' y el promotor *FAD2* de soja que dirige la delta 9 desaturasa) con SanDI y Ascl. La parte iARNbc de pMON68536 se después clona de forma direccional en pMON68529 para crear pMON68537 (promotor 7S alfa' unido de forma funcional a la construcción que forma el ARN bicatenario de intrón N° 1 *FAD2-1A* con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste, UTR 3' de *FATB-1* de soja antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido y el terminador TML3' y promotor *FAD2* de soja que dirige la delta 9 desaturasa).

20 Etapa 15 - pMON68537 se digiere después con SanDI y Ascl y se digiere pMON70683 (Napin que dirige KasIV) con Ascl y RsrII. El fragmento Napin/KasIV se clona de forma direccional en pMON68537 para crear pMON68539 (promotor 7S alfa' unido de forma funcional a la construcción que forma ARN bicatenario de intrón N° 1 *FAD2-1A* con sentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja con sentido, UTR 3' de *FATB-1* de soja con sentido, intrón N° 5 *FAD3-1A* de soja con capacidad de corte y ajuste, UTR 3' de *FATB-1* de soja antisentido, UTR 3' de *FAD3-1A* de soja antisentido, intrón N° 1 *FAD2-1A* de soja antisentido y el terminador TML3', dirigiendo al promotor *FAD2* de soja la delta 9 desaturasa y dirigiendo el promotor Napin a KasIV).

Ejemplo 9

30 Este ejemplo ilustra la transformación de plantas para producir plantas de soja con genes suprimidos.

Se usa un vector de transformación pMON68537 como el preparado en el Ejemplo 7 para introducir una construcción que forma ARN bicatenario de intrón/UTR 3' en soja para suprimir los genes de $\Delta 12$ desaturasa, $\Delta 15$ desaturasa, y *FATB*. El vector pMON68537 también contiene los genes de delta-9 desaturasa (*FAB2*) y CP4. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

35 Se analizan composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con las construcciones de expresión de iARNbc intrón/UTR 3' usando cromatografía de gases. Las composiciones de aceites de semillas combinadas R₁ y semillas individuales R₁ demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de la semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de las semillas de soja no transformada (véase la Tabla 7). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico; la supresión de *FAD3* proporciona plantas con cantidad disminuida de compuestos de éster de ácido linolénico; y la supresión de *FATB* proporciona plantas con cantidad reducida de compuestos de éster graso saturado, por ejemplo, palmitatos y estearatos. Pueden hacerse selecciones de dichas líneas dependiendo de la composición relativa deseada de ácidos grasos. Las composiciones de ácidos grasos se analizan a partir de semillas de líneas de soja transformadas con construcciones usando cromatografía de gases.

Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra la transformación de plantas para producir plantas de soja con genes suprimidos.

50 Se usa un vector de transformación pMON68539 como el preparado en el Ejemplo 3 para introducir una construcción que forma ARN bicatenario de intrón/UTR 3' en soja para suprimir los genes de $\Delta 12$ desaturasa, $\Delta 15$ desaturasa, y *FATB*. El vector pMON68539 también contiene los genes *KasIV* y CP4. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

5 Se analizan composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con las construcciones de expresión de iARNbc intrón/UTR 3' usando cromatografía de gases. Las composiciones de aceites de semillas combinadas R₁ y semillas individuales R₁ demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de la semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de las semillas de soja no transformada (véase la Tabla 8). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico; la supresión de *FAD3* proporciona plantas con cantidad disminuida de compuestos de éster de ácido linolénico; y la supresión de *FATB* proporciona plantas con cantidad reducida de compuestos de éster graso saturado, por ejemplo, palmitatos y estearatos. Las selecciones pueden hacerse a partir de dichas líneas dependiendo de la composición relativa deseada de ácidos grasos. Las composiciones de ácidos grasos se analizan a partir de semillas de líneas de soja transformadas con construcciones usando cromatografía de gases.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON68537

Construcción	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36305	74,92	4,42	6,35	2,93	10,24
PMON68537	GM_A36305	74,8	4,33	6,57	2,93	10,23
PMON68537	GM_A36305	74,43	3,95	5,98	2,82	11,81
PMON68537	GM_A36305	73,32	3,99	6,79	3,24	11,48
PMON68537	GM_A36305	72,87	4,33	7,06	3,08	11,7
PMON68537	GM_A36305	16,63	9,53	13,5	4,06	55,31
PMON68537	GM_A36305	16,52	9,61	13,92	4,24	54,79
PMON68537	GM_A36305	15,67	9,66	13,64	4,19	55,89
PMON68537	GM_A36306	77,45	3,93	6,76	2,47	8,4
PMON68537	GM_A36306	74,51	4,38	6,58	2,47	10,94
PMON68537	GM_A36306	73,21	4,64	7,04	3,08	11,04
PMON68537	GM_A36306	72,78	4,4	6,97	2,55	12,21
PMON68537	GM_A36306	71,67	4,76	6,94	3,25	12,2
PMON68537	GM_A36306	71,01	4,86	7,64	3,05	12,41
PMON68537	GM_A36306	69,72	4,76	7,66	2,95	13,75
PMON68537	GM_A36306	17,41	8,88	13,35	3,85	55,63
PMON68537	GM_A36307	77,22	3,71	6,8	2,77	8,5
PMON68537	GM_A36307	76,79	3,65	6,76	2,85	8,75
PMON68537	GM_A36307	71,44	4,54	7,2	3,58	12,17
PMON68537	GM_A36307	18,83	8,62	13,94	4,02	53,61
PMON68537	GM_A36307	18,81	8,38	13,27	3,7	54,97
PMON68537	GM_A36307	15,68	9,97	14,06	4,55	54,79
PMON68537	GM_A36307	15,28	10,64	14,68	4,43	53,97
PMON68537	GM_A36307	14,08	9,36	14,39	4,31	56,89
PMON68537	GM_A36309	78,67	3,53	6,09	2,5	8,18
PMON68537	GM_A36309	75,43	3,96	6,7	2,53	10,3
PMON68537	GM_A36309	71,41	4,19	6,92	2,74	13,67
PMON68537	GM_A36309	70,51	4,14	6,85	3,16	14,33

ES 2 532 351 T3

(continuación)

Construcción	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36309	67,51	5,01	7,45	3,15	15,69
PMON68537	GM_A36309	66,99	4,92	7,15	3,9	15,79
PMON68537	GM_A36309	20,09	8,46	12,41	5	52,97
PMON68537	GM_A36309	15,15	9,73	14,61	3,85	55,79
PMON68537	GM_A36310	74,28	4,77	7,31	1,85	10,9
PMON68537	GM_A36310	74,03	5,43	8,23	1,63	9,66
PMON68537	GM_A36310	73,07	5,09	7,37	1,76	11,75
PMON68537	GM_A36310	71,83	5,04	7,78	1,86	12,54
PMON68537	GM_A36310	68,01	6,26	9,8	1,97	13,13
PMON68537	GM_A36310	67,22	6,28	8,71	3,28	13,45
PMON68537	GM_A36310	65,37	6,87	10,01	1,94	14,9
PMON68537	GM_A36310	15,76	10,09	13,4	4,28	55,52
PMON68537	GM_A36311	77,87	3,56	5,9	2,46	9,05
PMON68537	GM_A36311	75,8	3,87	5,91	2,93	10,22
PMON68537	GM_A36311	75,61	3,71	6,21	2,56	10,75
PMON68537	GM_A36311	73,68	4,06	6	3,09	11,98
PMON68537	GM_A36311	72,66	4,11	6,41	3,14	12,48
PMON68537	GM_A36311	70,89	4,39	6,52	3,11	13,93
PMON68537	GM_A36311	70,82	3,97	6,52	3,18	14,29
PMON68537	GM_A36311	16,67	9,39	13,65	4,44	54,77
PMON68537	GM_A36312	78,32	4,3	6,36	1,79	8,16
PMON68537	GM_A36312	77,55	4,46	6,51	2,13	8,23
PMON68537	GM_A36312	77,43	4,17	6,31	1,81	9,24
PMON68537	GM_A36312	76,98	4,29	6,25	2,27	9,05
PMON68537	GM_A36312	76,43	4,55	6,82	2,16	8,96
PMON68537	GM_A36312	76,38	4,5	6,46	2,04	9,54
PMON68537	GM_A36312	75,25	4,27	6,41	1,97	11,06
PMON68537	GM_A36312	18,24	9,43	13,6	3,07	54,75
PMON68537	GM_A36313	80,18	4,07	6,17	2,59	5,85
PMON68537	GM_A36313	79,96	4,16	6,03	2,59	6,11
PMON68537	GM_A36313	78,88	3,9	5,6	2,8	7,65
PMON68537	GM_A36313	78,76	3,92	5,44	2,91	7,82
PMON68537	GM_A36313	77,64	4,22	5,88	2,9	8,25
PMON68537	GM_A36313	76,15	4,14	6,06	3,13	9,42

ES 2 532 351 T3

(continuación)

Construcción	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36313	19,05	8,87	13,45	3,71	54,03
PMON68537	GM_A36313	18,47	8,46	13,13	3,63	55,41
PMON68537	GM_A36314	80,27	3,17	5,77	3,4	6,03
PMON68537	GM_A36314	79,66	3,24	5,72	3,19	6,91
PMON68537	GM_A36314	79,5	3,45	5,83	3,23	6,74
PMON68537	GM_A36314	77,42	3,52	5,76	3,57	8,42
PMON68537	GM_A36314	77,33	3,71	6,36	3,34	8,01
PMON68537	GM_A36314	76,83	3,71	6,38	3,24	8,59
PMON68537	GM_A36314	16,6	9,3	12,63	4,43	55,99
PMON68537	GM_A36314	15,26	8,59	13,71	4,54	56,84
PMON68537	GM_A36315	20,21	8,25	13,61	3,59	53,37
PMON68537	GM_A36315	17,47	9,22	13,46	3,35	55,57
PMON68537	GM_A36315	16,75	9,3	13,61	3,66	55,75
PMON68537	GM_A36315	16,54	9,18	13,54	3,88	55,9
PMON68537	GM_A36315	16,06	10,07	13,44	4,01	55,42
PMON68537	GM_A36315	16,05	9,58	12,82	4,25	56,29
PMON68537	GM_A36315	15,95	10,42	13,12	3,63	55,91
PMON68537	GM_A36315	15,5	10,22	13,25	3,78	56,3
PMON68537	GM_A36316	79,61	3,56	5,79	2,94	6,87
PMON68537	GM_A36316	75,11	4,01	6,45	3,44	9,76
PMON68537	GM_A36316	75,07	4,25	6,74	3,09	9,64
PMON68537	GM_A36316	73,92	3,97	6,53	3,56	10,75
PMON68537	GM_A36316	17,26	9,59	13,1	4,26	54,78
PMON68537	GM_A36316	17,15	9,03	12,81	4,04	55,97
PMON68537	GM_A36316	16,62	9,2	13,15	3,99	56,03
PMON68537	GM_A36316	16,6	9,44	13,19	3,95	55,84
PMON68537	GM_A36317	18,96	7,55	13,2	3,75	55,51
PMON68537	GM_A36317	16,19	9,43	13,33	3,96	56,04
PMON68537	GM_A36317	16,05	9,1	14,02	3,94	55,91
PMON68537	GM_A36317	15,33	9,4	13,91	4,22	56,11
PMON68537	GM_A36317	15,28	9,2	13,87	4,27	56,36
PMON68537	GM_A36317	14,58	10,15	13,74	4,38	56,15
PMON68537	GM_A36317	13,95	9,47	13,98	4,76	56,79
PMON68537	GM_A36317	13,91	9,88	14,26	4,62	56,25

ES 2 532 351 T3

(continuación)

Construcción	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36318	78,82	3,64	5,7	2,77	7,87
PMON68537	GM_A36318	77,94	3,73	5,9	2,94	8,29
PMON68537	GM_A36318	75,18	4,11	6,08	3,48	9,95
PMON68537	GM_A36318	75,1	3,93	6,02	3,04	10,75
PMON68537	GM_A36318	75,01	4,22	6,57	3,29	9,72
PMON68537	GM_A36318	74,17	4,2	6,51	3,27	10,68
PMON68537	GM_A36318	73,47	4,27	6,7	3,22	11,16
PMON68537	GM_A36318	30,57	10,54	14,83	5,55	36,92
PMON68537	GM_A36319	80	3,65	5,83	2,31	7,02
PMON68537	GM_A36319	79,89	3,65	5,64	2,35	7,26
PMON68537	GM_A36319	79,4	3,59	5,73	1,76	8,46
PMON68537	GM_A36319	78	3,87	6,11	2,35	8,5
PMON68537	GM_A36319	76,08	4,22	6,5	2,35	9,74
PMON68537	GM_A36319	75,56	3,89	6,41	1,78	11,3
PMON68537	GM_A36319	75,26	4,27	6,47	2,37	10,5
PMON68537	GM_A36319	75,16	4,1	6,48	2,49	10,66
PMON68537	GM_A36320	81,27	3,19	5,84	2,4	6,09
PMON68537	GM_A36320	80,21	3,27	5,18	2,44	7,76
PMON68537	GM_A36320	79,64	3,38	5,5	2,67	7,63
PMON68537	GM_A36320	79,46	3,38	5,82	2,67	7,42
PMON68537	GM_A36320	78,5	3,59	6,24	2,49	8
PMON68537	GM_A36320	73,83	3,79	6,72	2,78	11,74
PMON68537	GM_A36320	73,1	3,95	6,9	2,39	12,48
PMON68537	GM_A36320	22,99	8,03	12,19	4,81	50,89
PMON68537	GM_A36324	75,93	3,77	6,58	2,76	9,76
PMON68537	GM_A36324	75,1	4,05	7,01	2,83	9,8
PMON68537	GM_A36324	17,83	8,79	12,78	4,11	55,49
PMON68537	GM_A36324	16,46	8,88	12,84	4,48	56,29
PMON68537	GM_A36324	16,35	9,25	13,51	4,17	55,66
PMON68537	GM_A36324	15,25	8,99	13,73	4,28	56,69
PMON68537	GM_A36324	14,16	10,17	13,95	4,11	56,58
PMON68537	GM_A36324	13,59	9,87	14,61	4,5	56,33
PMON68537	GM_A36357	80,19	3,03	5,59	3,2	6,62
PMON68537	GM_A36357	79,78	3,19	5,51	3,24	6,89

ES 2 532 351 T3

(continuación)

Construcción	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36357	78,5	3,55	5,75	3,17	7,71
PMON68537	GM_A36357	77,48	3,68	5,71	3,55	8,23
PMON68537	GM_A36357	77,28	3,79	5,66	3,48	8,46
PMON68537	GM_A36357	77,1	3,51	5,43	3,65	8,99
PMON68537	GM_A36357	71,9	4,24	6,47	3,67	12,39
PMON68537	GM_A36357	17,66	9,32	13,26	4,21	54,51
PMON68537	GM_A36359	77,91	3,35	5,67	3,24	8,53
PMON68537	GM_A36359	77,85	3,29	5,42	3,29	8,87
PMON68537	GM_A36359	76,71	3,65	6,07	3,35	8,95
PMON68537	GM_A36359	71,73	4,01	6,79	3,49	12,68
PMON68537	GM_A36359	69,32	4,51	6,99	3,66	14,13
PMON68537	GM_A36359	68,63	4,44	6,91	3,76	14,89
PMON68537	GM_A36359	18,87	8,03	13,38	3,86	54,81
PMON68537	GM_A36359	16,81	9,83	13,08	4,68	54,55
PMON68537	GM_A36360	79,34	3,29	5,99	3,15	6,88
PMON68537	GM_A36360	75,42	3,47	6,47	3,08	10,26
PMON68537	GM_A36360	75,3	3,86	6,69	3,2	9,64
PMON68537	GM_A36360	74,51	3,8	6,39	3,32	10,67
PMON68537	GM_A36360	21,49	6,95	13,07	3,92	53,46
PMON68537	GM_A36360	20,05	7,4	13,09	3,83	54,57
PMON68537	GM_A36360	16,08	9,14	13,02	4,64	56,03
PMON68537	GM_A36360	15,86	9,07	13,44	4,49	56,04
PMON68537	GM_A36361	82,13	2,83	5,67	3,13	4,81
PMON68537	GM_A36361	80,99	3,2	5,79	3,01	5,64
PMON68537	GM_A36361	74,39	3,85	6,33	3,5	10,59
PMON68537	GM_A36361	18,01	8,46	13,18	3,92	55,41
PMON68537	GM_A36361	17,99	8,11	13,05	4,09	55,7
PMON68537	GM_A36361	17,35	8,31	13,4	4	55,88
PMON68537	GM_A36361	16,81	10,2	12,9	4,32	54,87
PMON68537	GM_A36361	16,55	8,5	13,21	4,22	56,45
PMON68537	GM_A36362	78,05	3,89	6,29	2,81	7,76
PMON68537	GM_A36362	76,89	3,69	6,32	3,12	8,76
PMON68537	GM_A36362	76,1	4	6,57	3,02	9,24
PMON68537	GM_A36362	76,01	4,08	6,24	3,03	9,48

ES 2 532 351 T3

(continuación)

Construcción	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36362	75,86	3,76	5,68	3,56	9,95
PMON68537	GM_A36362	75,79	4,07	6,43	3,15	9,34
PMON68537	GM_A36362	74,89	4,14	6,63	3,11	10,07
PMON68537	GM_A36362	17,22	8,8	13,75	3,77	55,54
PMON68537	GM_A36363	79,15	3,57	6,2	3,03	6,84
PMON68537	GM_A36363	75,69	3,83	7,07	2,73	9,53
PMON68537	GM_A36363	73,97	4,22	6,82	3,39	10,33
PMON68537	GM_A36363	72,53	4,31	6,64	3,7	11,59
PMON68537	GM_A36363	68,42	4,5	7,05	3,95	14,79
PMON68537	GM_A36363	18,39	8,7	13,61	4,1	54,28
PMON68537	GM_A36363	17,54	8,87	14,08	4,07	54,56
PMON68537	GM_A36363	15,87	9,66	14,56	4,2	54,69
PMON68537	GM_A36365	78,79	3,11	5,87	1,27	9,9
PMON68537	GM_A36365	76,76	3,86	5,79	1,66	10,91
PMON68537	GM_A36365	75,41	3,49	6,06	1,83	12,15
PMON68537	GM_A36365	73,57	3,65	6,11	1,5	14,19
PMON68537	GM_A36365	71,55	3,56	6,62	1,24	16,08
PMON68537	GM_A36365	70,41	4	6,07	2,15	16,33
PMON68537	GM_A36365	66,66	3,9	6,84	1,5	20,21
PMON68537	GM_A36365	63,96	4,22	7,08	2,27	21,52
PMON68537	GM_A36366	75,44	4,33	6,49	3,21	9,32
PMON68537	GM_A36366	74,75	4,21	6,87	2,71	10,33
PMON68537	GM_A36366	74,69	4,65	6,91	3,06	9,65
PMON68537	GM_A36366	73,23	4,89	7,23	2,99	10,52
PMON68537	GM_A36366	72,53	4,76	7,42	3,26	10,85
PMON68537	GM_A36366	67,15	5,05	7,47	3,33	15,87
PMON68537	GM_A36366	65,81	5,6	7,9	3,37	16,09
PMON68537	GM_A36366	62,31	6,19	8,71	3,22	18,55
PMON68537	GM_A36367	80,56	3,3	6,07	2,58	6,34
PMON68537	GM_A36367	77,78	3,58	6,47	2,66	8,45
PMON68537	GM_A36367	77,78	3,46	6,25	2,84	8,51
PMON68537	GM_A36367	77,39	3,81	6,71	2,86	8,11
PMON68537	GM_A36367	77,32	3,74	6,17	3,12	8,47
PMON68537	GM_A36367	75,93	3,97	6,23	3,43	9,29

ES 2 532 351 T3

(continuación)

Construcción	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36367	72,82	4,09	6,85	3,25	11,88
PMON68537	GM_A36367	19,31	7,58	13,7	3,59	55
PMON68537	GM_A36410	21,67	7,62	13,38	3,43	53,1
PMON68537	GM_A36410	20,9	8,33	12,93	3,64	53,33
PMON68537	GM_A36410	20,21	8,04	13,28	3,86	53,66
PMON68537	GM_A36410	20,02	8,71	12,79	3,71	53,87
PMON68537	GM_A36410	18,96	8,95	13,3	3,77	54,15
PMON68537	GM_A36410	18,18	8,98	13,56	3,74	54,66
PMON68537	GM_A36410	17,61	9,29	12,93	4,12	55,13
PMON68537	GM_A36410	16,78	9,8	13,78	3,92	54,83
PMON68537	GM_A36411	75,06	4,33	6,49	2,93	10,08
PMON68537	GM_A36411	74,32	4,46	6,76	2,96	10,38
PMON68537	GM_A36411	73,41	4,76	6,91	3,11	10,78
PMON68537	GM_A36411	73,24	4,87	7,28	2,89	10,67
PMON68537	GM_A36411	22,38	8,17	13,47	3,6	51,51
PMON68537	GM_A36411	18,26	9,07	14,14	3,81	54,02
PMON68537	GM_A36411	17,52	10,1	13,1	4,03	54,36
PMON68537	GM_A36411	17,02	9,71	13,45	4,02	54,89
A3244	A3244	18,29	7,79	13,69	4,15	55,08
A3244	A3244	17,54	8,19	13,32	4,32	55,57
A3244	A3244	17,13	8,13	13,21	4,46	56,04
A3244	A3244	15,47	9,56	13,04	4,43	56,46
A3244	A3244	15,17	8,95	13,79	4,3	56,78
A3244	A3244	15,05	9,03	14,16	4,01	56,8
A3244	A3244	13,51	10,07	12,95	5,07	57,3
A3244	A3244	13,49	9,91	13,31	4,56	57,67

Tabla 8. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON68539

Construcción	Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON68539	GM_A36448	4,51	2,65	79,64	8,66	3,55
PMON68539	GM_A36448	4,62	2,64	78,35	9,99	3,77
PMON68539	GM_A36448	5,89	2,65	76,86	9,79	3,84
PMON68539	GM_A36448	4,92	2,62	72,61	14,61	4,01
PMON68539	GM_A36448	5,48	2,86	71,07	15,63	4,16

ES 2 532 351 T3

(continuación)

Construcción	Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON68539	GM_A36448	13,5	4,2	16,28	56,86	8,29
PMON68539	GM_A36448	14,49	4,67	14,88	56,56	9,07
PMON68539	GM_A36449	5,16	2,42	81,91	6,54	3,12
PMON68539	GM_A36449	4,26	2,41	79,99	8,4	3,94
PMON68539	GM_A36449	4,26	2,72	79,07	9,32	3,38
PMON68539	GM_A36449	5,01	2,54	75,71	11,94	3,9
PMON68539	GM_A36449	4,34	2,76	75,07	12,75	4,16
PMON68539	GM_A36449	11,57	3,52	44,08	35,22	4,98
PMON68539	GM_A36449	13,42	3,84	21,35	52,38	8,17
PMON68539	GM_A36449	13,25	3,99	15,3	57,6	9,04
PMON68539	GM_A36450	3,28	2,6	82,21	7,26	3,95
PMON68539	GM_A36450	4,16	2,51	80,93	7,72	3,76
PMON68539	GM_A36450	4,3	3,42	78,78	8,43	4,22
PMON68539	GM_A36450	4,84	3,16	77,07	9,6	4,22
PMON68539	GM_A36450	5,11	3,1	75,21	10,98	4,49
PMON68539	GM_A36450	13,74	4,26	17,31	54,32	10,11
PMON68539	GM_A36450	13,82	4,34	17,13	54,96	9,47
PMON68539	GM_A36450	13,56	3,83	17,06	56,7	8,6
PMON68539	GM_A36705	9,73	1,83	75,04	8,23	4,27
PMON68539	GM_A36705	10,85	1,74	72,89	9,29	4,53
PMON68539	GM_A36705	10,05	1,78	72,68	9,83	4,48
PMON68539	GM_A36705	10,02	1,77	72,57	10,04	4,36
PMON68539	GM_A36705	10,75	1,75	72,37	9,68	4,77
PMON68539	GM_A36705	10,58	1,78	70,35	11,64	4,43
PMON68539	GM_A36705	7,69	5,63	16,21	60,39	8,85
PMON68539	GM_A36705	8,02	5,69	15,58	60,65	8,86
	A3244	13,03	4,31	21,23	52,61	7,77
	A3244	12,69	3,98	20,71	55,12	6,53
	A3244	15,2	5,02	19,83	49,96	8,83
	A3244	12,63	4,84	19,55	53,18	8,66
	A3244	13,27	4,48	18,28	54,4	8,5
	A3244	13,22	4,91	17,38	54,73	8,63
	A3244	13,44	4,81	15,46	56,49	8,91

Ejemplo 11

Se usa la construcción pMON95829 como descrita en el Ejemplo 3D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1*, en soja para suprimir el gen *Fad2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato. Posteriormente, los genomas de plantas transformadas se criban para la inserción en tándem concurrente del primer ADN-T y el segundo ADN-T, es decir, en el ensamblaje de "extremo derecho a extremo derecho". El cribado se hace con procedimientos de mapeado por hibridación de Southern. Las plantas transformadas de soja que contienen la configuración preferida en su genoma se transfieren a un invernadero para la producción de semillas.

Por ejemplo, se recoge tejido foliar de las plantas R₀ transformadas con la construcción pMON95829 y se realiza análisis de Southern. Las sondas y digestiones con enzimas de restricción se eligen para identificar eventos que contengan un ensamblaje de extremo derecho a extremo derecho ("RB-RB") de ambos ADN-T. Típicamente, aproximadamente el 25 % de todos los transformantes tienen los ADN-T ensamblados RB-RB apropiadamente.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON95829 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON95829, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 9). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON95829

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON95829	GM_A94247	2,1	2,8	83,0	6,0	5,5
PMON95829	GM_A94296	2,6	2,9	80,6	7,1	5,8
PMON95829	GM_A93590	2,5	2,8	80,4	7,4	5,8
PMON95829	GM_A93437	2,6	2,8	79,8	7,9	6,0
PMON95829	GM_A93517	2,9	2,8	79,5	7,7	6,0
PMON95829	GM_A93647	2,3	3,0	78,6	9,0	6,5
PMON95829	GM_A93670	3,1	2,9	77,3	10,1	6,2
PMON95829	GM_A92396	2,9	2,6	76,0	11,1	7,0
PMON95829	GM_A92455	3,6	3,1	74,9	12,0	5,5
PMON95829	GM_A93678	2,8	3,4	74,0	11,9	7,4
PMON95829	GM_A93640	2,5	2,7	71,6	14,6	7,6
PMON95829	GM_A94937	4,5	3,3	67,2	17,7	7,1
PMON95829	GM_A92481	4,9	2,8	58,1	25,3	8,1
PMON95829	GM_A94306	3,1	3,2	55,9	29,0	7,9
PMON95829	GM_A94211	3,0	2,7	47,0	38,3	8,7

25

Ejemplo 12

Se usa la construcción pMON93505 como descrita en el Ejemplo 3D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *Fad2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados

Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato. Posteriormente, los genomas de plantas transformadas se criban para la inserción en tándem concurrente del primer ADN-T y el segundo ADN-T, es decir, en el ensamblaje de "extremo derecho a extremo derecho". El cribado se hace con procedimientos de mapeado por hibridación de Southern. Las plantas transformadas de soja que contienen la configuración preferida en su genoma se transfieren a un invernadero para la producción de semillas.

Por ejemplo, se recoge tejido foliar de las plantas R₀ transformadas con la construcción pMON93505 y se realiza análisis de Southern. Las sondas y digestiones con enzimas de restricción se eligen para identificar eventos que contengan un ensamblaje de extremo derecho a extremo derecho ("RB-RB") de ambos ADN-T. Típicamente, aproximadamente el 25 % de todos los transformantes tienen los ADN-T ensamblados RB-RB apropiadamente.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93505 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93505, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 10). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93505

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93505	GM_A87814	1,3	1,0	84,9	5,5	6,3
PMON93505	GM_A86449	1,5	0,9	84,9	4,9	6,8
PMON93505	GM_A86032	1,5	1,1	83,5	6,3	7,0
PMON93505	GM_A86159	1,5	0,9	82,8	6,7	7,5
PMON93505	GM_A86178	1,7	1,0	82,5	6,7	7,3
PMON93505	GM_A86075	1,4	0,9	81,4	6,6	8,5
PMON93505	GM_A86303	1,0	0,6	81,4	7,4	8,8
PMON93505	GM_A86454	1,4	0,9	79,9	7,4	8,8
PMON93505	GM_A86799	1,4	1,1	79,4	9,6	7,7
PMON93505	GM_A85997	2,2	2,5	79,3	7,7	7,4
PMON93505	GM_A86058	1,8	1,0	76,8	11,3	8,3
PMON93505	GM_A86274	1,2	0,7	74,6	10,2	11,9
PMON93505	GM_A86325	1,1	0,7	72,8	15,4	9,2
PMON93505	GM_A85969	2,0	0,7	70,7	13,6	12,1
PMON93505	GM_A86033	1,7	0,9	69,1	18,2	9,5
PMON93505	GM_A86372	1,7	1,0	65,7	12,6	17,6
PMON93505	GM_A86403	1,5	0,9	64,6	16,8	15,4
PMON93505	GM_A87803	1,1	0,6	57,7	26,0	13,8
PMON93505	GM_A86036	3,1	1,5	54,8	30,4	9,7
PMON93505	GM_A86269	4,9	1,8	51,4	31,9	9,5

Ejemplo 13

Se usa la construcción pMON93506 como descrita en el Ejemplo 3D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato. Posteriormente, los genomas de plantas transformadas se criban para la inserción en tándem concurrente del primer ADN-T y el segundo ADN-T, es decir, en el ensamblaje "extremo derecho a extremo derecho". El cribado se hace con procedimientos de mapeado por hibridación de Southern. Las plantas transformadas de soja que contienen la configuración preferida en su genoma se transfieren a un invernadero para la producción de semillas.

Por ejemplo, se recoge tejido foliar de las plantas R₀ transformadas con la construcción pMON93506 y se realiza análisis de Southern. Las sondas y digestiones con enzimas de restricción se eligen para identificar eventos que contengan un ensamblaje extremo derecho a extremo derecho ("RB-RB") de ambos ADN-T. Típicamente, aproximadamente el 25 % de todos los transformantes tienen los ADN-T ensamblados RB-RB apropiadamente.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93506 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93506, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 11). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93506

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93506	GM_A87174	2,2	0,8	88,1	2,3	5,1
PMON93506	GM_A86998	2,1	0,6	87,1	3,4	5,5
PMON93506	GM_A87075	2,7	1,2	85,9	4,8	4,2
PMON93506	GM_A87255	2,9	0,8	84,8	5,5	5,4
PMON93506	GM_A91253	2,7	0,9	84,5	5,9	5,1
PMON93506	GM_A86561	2,8	0,7	83,8	5,9	6,0
PMON93506	GM_A86875	3,1	1,0	83,6	6,2	5,5
PMON93506	GM_A89967	1,8	1,3	83,2	4,1	7,9
PMON93506	GM_A86927	2,1	0,8	82,6	4,8	8,5
PMON93506	GM_A87883	2,7	0,7	82,4	6,5	7,2
PMON93506	GM_A87133	3,0	3,1	81,5	5,2	6,3
PMON93506	GM_A88072	2,8	0,7	80,6	8,2	7,1
PMON93506	GM_A87069	3,8	0,7	80,4	8,2	6,4
PMON93506	GM_A86835	2,7	3,0	80,3	6,4	6,4
PMON93506	GM_A87929	2,7	1,0	76,3	7,8	11,5
PMON93506	GM_A87298	3,0	1,2	72,9	13,0	9,1
PMON93506	GM_A91226	3,4	1,0	69,3	18,0	7,7
PMON93506	GM_A88076	3,7	3,9	68,0	15,4	8,1

(continuación)

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93506	GM_A86530	2,9	1,0	59,3	25,0	11,5
PMON93506	GM_A87292	4,6	4,3	54,2	27,6	8,3
PMON93506	GM_A87076	5,5	0,9	46,7	38,0	8,4

Ejemplo 14

5 Se usa la construcción pMON93501 como descrita en el Ejemplo 3B para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

10 Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93501 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93501, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 12). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 12. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93501

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93501	GM_A85435	4,4	1,1	85,8	2,5	5,1
PMON93501	GM_A85439	4,6	0,9	84,8	3,7	5,1
PMON93501	GM_A85276	4,8	1,4	84,3	3,0	4,9
PMON93501	GM_A85697	4,8	1,3	83,6	3,8	5,6
PMON93501	GM_A85777	6,6	1,8	80,0	4,5	6,4
PMON93501	GM_A84790	7,2	5,7	78,3	2,9	4,7
PMON93501	GM_A85910	4,2	1,1	77,8	6,9	9,3
PMON93501	GM_A86186	5,3	1,1	77,4	7,4	7,7
PMON93501	GM_A85065	7,3	2,2	76,8	5,7	6,9
PMON93501	GM_A85744	4,1	0,9	76,0	7,4	10,6
PMON93501	GM_A85261	4,7	1,0	75,8	4,9	11,9
PMON93501	GM_A85479	3,7	1,1	75,8	8,6	9,8
PMON93501	GM_A85819	4,5	1,7	74,9	6,9	11,1
PMON93501	GM_A85945	4,6	1,2	74,6	8,7	10,0
PMON93501	GM_A85301	6,9	1,2	73,1	9,5	8,4
PMON93501	GM_A85929	6,1	1,4	72,4	10,8	8,7
PMON93501	GM_A85908	6,9	1,3	70,0	8,0	13,6

(continuación)

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93501	GM_A85393	4,8	1,3	67,0	13,3	12,2
PMON93501	GM_A85756	4,8	1,8	57,3	17,6	17,8
PMON93501	GM_A85415	5,0	1,3	52,9	26,0	12,1
PMON93501	GM_A85950	5,5	1,8	47,5	38,6	6,1
PMON93501	GM_A84705	5,7	2,3	46,0	37,7	7,4
PMON93501	GM_A85787	4,5	1,6	43,4	37,0	13,1

Ejemplo 15

5 Se usa la construcción pMON97552 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

10 Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON97552 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON97552, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 13). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 13. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON97552

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97552	GM_A98359	2,1	2,7	84,4	4,7	5,3
PMON97552	GM_A98361	2,3	2,7	84,0	5,3	4,8
PMON97552	GM_A98358	2,3	2,7	81,6	6,8	6,2

Ejemplo 16

20 Se usa la construcción pMON93758 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

25 Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93758 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93758, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 14). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 14. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93758

Construcción	Evento N°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93758	GM_A89686	2,7	2,9	82,7	5,3	5,5
PMON93758	GM_A89678	2,9	2,9	81,8	5,5	6,0
PMON93758	GM_A89670	2,8	3,0	81,7	5,6	6,1
PMON93758	GM_A89688	2,7	3,2	81,6	5,8	5,9
PMON93758	GM_A89683	2,9	2,9	81,5	5,8	6,1
PMON93758	GM_A89699	2,7	3,1	81,4	5,8	6,1
PMON93758	GM_A89675	2,9	3,0	81,4	5,6	6,2
PMON93758	GM_A89690	3,0	2,8	81,3	5,7	6,3
PMON93758	GM_A89680	3,0	2,8	81,3	5,9	6,0
PMON93758	GM_A89674	2,9	2,9	80,4	6,3	6,7
PMON9375.	GM_A89677	3,0	2,8	79,7	7,0	6,8
PMON93758	GM_A89676	3,0	2,9	78,7	7,6	7,4
PMON93758	GM_A89694	3,2	2,8	76,7	8,8	8,0
PMON93758	GM_A89696	3,0	2,6	74,7	10,4	8,9

Ejemplo 17

Se usa la construcción pMON97553 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON97553 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON97553, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 15). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 15. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON97553

Construcción	Evento n°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97553	GM_A98670	2,1	2,6	86,7	2,9	4,3
PMON97553	GM_A98595	2,3	2,7	86,3	3,5	4,7
PMON97553	GM_A98649	2,2	2,9	86,3	3,6	4,7
PMON97553	GM_A98669	2,1	3,0	85,5	3,3	4,6
PMON97553	GM_A98656	2,4	2,8	85,5	4,2	4,6
PMON97553	GM_A98643	2,3	2,8	85,0	3,8	4,9

(continuación)

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97553	GM_A98647	2,2	2,8	84,2	5,1	5,6
PMON97553	GM_A98582	2,6	2,8	84,0	4,1	5,6
PMON97553	GM_A98674	2,1	2,3	83,9	5,8	5,3
PMON97553	GM_A98663	2,2	2,8	83,3	5,5	5,1
PMON97553	GM_A98587	2,8	2,8	83,0	5,5	5,3
PMON97553	GM_A98592	2,9	2,9	82,9	4,6	5,8
PMON97553	GM_A98677	2,2	3,0	82,4	5,9	5,4
PMON97553	GM_A98594	2,2	2,9	82,3	6,5	5,4
PMON97553	GM_A98659	2,5	3,0	82,2	5,4	6,1
PMON97553	GM_A98622	2,8	3,0	81,6	6,0	6,1
PMON97553	GM_A98589	2,9	3,0	81,3	6,2	6,1
PMON97553	GM_A98679	2,2	3,1	81,2	6,7	5,7
PMON97553	GM_A98642	2,3	3,1	80,0	7,4	6,1
PMON97553	GM_A98639	2,7	3,0	78,4	8,0	6,8
PMON97553	GM_A98563	3,3	2,9	78,1	9,9	5,6
PMON97553	GM_A98618	2,9	2,8	78,0	8,8	6,9
PMON97553	GM_A98567	2,7	3,2	77,5	9,1	6,3
PMON97553	GM_A98625	2,3	2,9	77,4	9,5	6,9
PMON97553	GM_A98660	3,3	2,9	77,1	10,7	5,6
PMON97553	GM_A98615	2,7	3,2	76,4	9,9	7,1
PMON97553	GM_A98561	3,3	3,1	75,3	10,9	6,7
PMON97553	GM_A98603	2,9	3,6	73,5	11,0	7,8
PMON97553	GM_A98648	2,7	3,3	70,2	14,4	8,3
PMON97553	GM_A98565	3,2	2,8	67,9	17,9	7,2
PMON97553	GM_A98681	3,1	3,0	65,9	19,3	7,7

Ejemplo 18

5 Se usa la construcción pMON93770 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

10 Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93770 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R_1 de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93770, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R_1 de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen

semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 16). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 16. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93770

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93770	GM_A97973	2,8	2,7	80,0	7,3	6,2
PMON93770	GM_A97996	2,5	3,5	76,6	9,5	6,8
PMON93770	GM_A97977	2,7	3,1	75,8	9,8	7,5
PMON93770	GM_A97981	3,1	3,0	71,8	13,2	8,0
PMON93770	GM_A97971	3,4	3,1	70,3	14,8	7,5
PMON93770	GM_A97985	2,9	2,7	67,9	15,9	9,6
PMON93770	GM_A97991	3,2	2,9	66,4	19,0	7,6

Ejemplo 19

Se usa la construcción pMON93759 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos Nº 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93759 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93759, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 17). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 17. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93759

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93759	GM_A88219	3,0	2,7	77,0	9,1	7,4
PMON93759	GM_A88212	3,1	2,7	76,6	9,1	7,6
PMON93759	GM_A88205	3,1	2,8	73,9	11,5	7,8
PMON93759	GM_A88209	2,9	2,7	73,9	11,6	8,2
PMON93759	GM_A88222	3,1	2,6	73,7	11,9	8,0
PMON93759	GM_A88223	2,7	2,6	73,5	12,4	8,3
PMON93759	GM_A88215	2,9	2,9	73,3	12,1	7,9
PMON93759	GM_A88202	3,4	2,8	72,9	12,6	7,7
PMON93759	GM_A88220	3,0	3,0	72,1	13,3	7,7
PMON93759	GM_A88213	2,9	3,0	71,8	13,1	8,3

PMON93759	GM_A88210	3,3	2,8	71,6	13,5	8,3
-----------	-----------	-----	-----	------	------	-----

(continuación)

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93759	GM_A88217	2,5	2,7	71,5	14,9	7,8
PMON93759	GM_A88206	2,9	2,9	71,3	13,3	8,8
PMON93759	GM_A88211	3,1	3,0	71,3	13,8	7,9
PMON93759	GM_A88204	3,1	2,8	70,5	14,3	8,8
PMON93759	GM_A88201	3,2	2,7	69,4	15,5	8,4
PMON93759	GM_A88200	3,3	3,0	67,3	17,1	8,5
PMON93759	GM_A88214	3,3	2,9	60,6	23,7	8,7
PMON93759	GM_A88203	3,5	3,1	60,6	23,3	8,9
PMON93759	GM_A88226	3,0	2,8	60,5	23,7	9,5
PMON93759	GM_A88198	4,7	3,1	42,7	39,6	9,1

Ejemplo 20

Se usa la construcción pMON97554 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON97554 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON97554, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 18). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 18. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON97554

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97554	GM_A98420	2,3	2,6	80,4	8,0	5,7
PMON97554	GM_A98445	2,1	3,0	77,4	10,1	6,3
PMON97554	GM_A98423	2,7	2,9	77,0	10,3	6,1
PMON97554	GM_A98440	2,7	2,8	76,0	10,8	6,6
PMON97554	GM_A98438	2,8	3,0	70,6	15,2	7,3
PMON97554	GM_A98435	3,6	3,0	69,6	16,5	6,3

Ejemplo 21

Se usa la construcción pMON93771 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en

soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

5 Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93771 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93771, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen 10 semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 19). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 19. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93771

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93771	GM_A97841	2,5	2,3	70,8	17,0	6,6
PMON93771	GM_A97839	3,8	3,0	65,8	18,3	8,1
PMON93771	GM_A97836	4,1	2,9	65,5	19,3	7,1
PMON93771	GM_A97844	2,6	2,7	65,2	20,9	8,0
PMON93771	GM_A97835	4,4	2,9	62,9	21,0	7,8
PMON93771	GM_A97852	3,3	3,1	62,9	21,0	8,9
PMON93771	GM_A97857	3,4	2,7	61,7	22,6	8,7
PMON93771	GM_A97846	4,2	2,7	52,0	30,8	9,6

15

Ejemplo 22

Se usa la construcción pMON97555 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON97555 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON97555, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen 25 semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 20). Por ejemplo, la supresión de *FAD2* 30 proporciona plantas con cantidad aumentada de compuestos de éster de ácido oleico.

Tabla 20. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON97555

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97555	GM_A98913	2,7	2,9	71,0	14,5	7,8
PMON97555	GM_A98912	2,1	2,2	70,5	18,0	6,4
PMON97555	GM_A98905	2,7	3,1	65,9	19,0	8,2
PMON97555	GM_A98909	2,4	2,8	63,5	21,5	9,1

PMON97555	GM_A98936	4,9	2,4	61,9	24,9	5,3
-----------	-----------	-----	-----	------	------	-----

(continuación)

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97555	GM_A98893	2,5	2,8	61,5	23,7	8,6
PMON97555	GM_A98924	3,0	3,0	61,4	23,5	8,1
PMON97555	GM_A98904	3,1	2,9	60,6	24,0	8,3
PMON97555	GM_A98938	2,3	2,9	58,3	28,1	7,6
PMON97555	GM_A98900	3,2	2,8	56,7	28,4	8,0
PMON97555	GM_A98906	2,7	2,9	56,7	27,8	8,8
PMON97555	GM_A98917	2,7	3,1	53,0	32,1	8,4
PMON97555	GM_A98939	3,0	3,1	52,9	31,4	8,9
PMON97555	GM_A98935	4,5	3,2	48,2	35,4	7,8
PMON97555	GM_A98919	3,1	3,4	44,2	40,3	8,0

Ejemplo 23

Se usa la construcción pMON93760 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93760 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93760, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 21). Por ejemplo, el intrón *FAD2-1*, reducido en longitud en 320 nucleótidos contiguos desde el extremo 5' de la (SEC ID N°: 1) y capaz de formar ARNbc, suprime al menos parcialmente *FAD2*.

Tabla 21. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93760

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93760	GM_A88236	10,0	3,6	58,3	23,4	4,4
PMON93760	GM_A88240	2,9	2,6	56,0	28,4	9,5
PMON93760	GM_A88245	3,3	3,2	54,8	28,7	9,6
PMON93760	GM_A88231	3,2	2,7	48,8	35,0	9,6
PMON93760	GM_A88234	3,8	2,7	47,7	36,1	9,1
PMON93760	GM_A88252	3,1	2,5	45,3	40,9	7,5
PMON93760	GM_A88244	3,4	3,0	41,6	42,2	9,2
PMON93760	GM_A88256	2,7	2,7	41,3	44,6	8,5

PMON93760	GM_A88243	2,8	2,7	36,6	50,4	7,1
-----------	-----------	-----	-----	------	------	-----

(continuación)

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93760	GM_A88254	3,7	2,6	27,5	58,1	7,6
PMON93760	GM_A88253	3,7	2,8	25,4	60,6	6,9
PMON93760	GM_A88239	7,2	2,8	25,0	58,6	6,2
PMON93760	GM_A88250	4,7	2,9	24,4	59,2	8,4
PMON93760	GM_A88251	5,5	3,0	22,7	60,0	8,6

Ejemplo 24

5 Se usa la construcción pMON93772 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

10 Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93772 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON93772, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 22). Por ejemplo, el intrón *FAD2-1*, reducido en longitud en 360 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' de la (SEC ID N°: 1) y capaz de formar ARNbc, suprime al menos parcialmente *FAD2* para algunos eventos.

Tabla 22. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93772

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93772	GM_A97768	3,4	2,3	69,6	17,6	6,3
PMON93772	GM_A97781	3,3	2,6	55,1	30,9	7,3
PMON93772	GM_A97763	3,7	2,6	45,2	38,2	9,6
PMON93772	GM_A97796	2,3	2,9	35,1	50,3	8,7
PMON93772	GM_A97798	3,3	2,6	33,5	51,2	8,6
PMON93772	GM_A97782	2,6	2,7	33,4	52,0	8,5
PMON93772	GM_A97819	3,8	3,1	30,1	53,8	8,7
PMON93772	GM_A97777	3,3	2,7	28,1	56,7	8,6
PMON93772	GM_A97767	2,9	2,8	26,3	57,9	9,6
PMON93772	GM_A97792	3,7	2,6	26,2	57,8	9,1
PMON93772	GM_A97808	3,0	3,0	25,7	58,4	9,2
PMON93772	GM_A97790	2,8	2,7	25,1	59,7	9,2
PMON93772	GM_A97805	3,5	2,8	24,6	59,7	8,7

PMON93772	GM_A97817	3,5	2,9	24,0	59,4	9,5
-----------	-----------	-----	-----	------	------	-----

(continuación)

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93772	GM_A97828	3,2	2,9	23,4	60,3	9,8
PMON93772	GM_A97812	2,5	2,9	23,0	61,3	9,8
PMON93772	GM_A97765	2,8	3,0	20,7	63,0	10,1

Ejemplo 25

5 Se usa la construcción pMON97556 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

10 Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON97556 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja transformadas con la construcción pMON97556, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos mono- y poliinsaturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 23). Por ejemplo, el intrón *FAD2-1*, reducido en longitud en 200 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' de la (SEC ID N°: 1) y capaz de formar ARNbc, suprime al menos parcialmente *FAD2*.

Tabla 23. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON97556

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97556	GM_A98772	3,6	2,8	34,3	51,0	7,4
PMON97556	GM_A98744	2,4	2,6	26,6	60,3	7,4
PMON97556	GM_A98787	2,5	2,8	26,4	58,9	8,7
PMON97556	GM_A98745	2,2	2,5	26,3	60,2	8,0
PMON97556	GM_A98758	2,5	2,9	25,6	59,6	8,7
PMON97556	GM_A98789	2,1	2,5	22,3	64,9	7,7
PMON97556	GM_A98790	2,2	3,0	22,1	62,8	9,4
PMON97556	GM_A98783	2,5	2,6	21,5	64,0	8,7
PMON97556	GM_A98761	2,3	2,3	20,9	65,2	8,7

20

Ejemplo 26

25 Se usa la construcción pMON93764 como descrita en el Ejemplo 2D para introducir una construcción que forma ARN bicatenario, de intrón *FAD2-1A*, en soja para suprimir el gen *FAD2*. El vector se introduce de forma estable en soja (variedad Asgrow A4922) mediante la cepa ABI de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, patente de Estados Unidos N° 6.384.301). El marcador de selección CP4 permite que las plantas de soja transformadas se identifiquen por selección en medio que contiene el herbicida glifosato.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con una construcción pMON93764 usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R₁ de plantas de soja

transformadas con la construcción pMON93764, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R₁ de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos saturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada (véase la Tabla 24). Además, el intrón *FAD2-1*, reducido en longitud en 400 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' de la (SEC ID N°: 1) y capaz de formar ARNbc, no reduce sustancialmente la expresión de *FAD2*.

Tabla 24. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON93764

Construcción	Evento n°	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93764	GM_A98489	2,1	2,2	28,1	60,5	6,5
PMON93764	GM_A98452	2,2	2,2	27,4	61,3	6,8
PMON93764	GM_A98451	2,3	2,5	26,2	60,7	7,8
PMON93764	GM_A98467	2,5	2,8	25,4	60,9	8,2
PMON93764	GM_A98455	1,8	2,3	24,4	63,5	7,8
PMON93764	GM_A98499	1,8	2,5	24,1	63,5	7,8
PMON93764	GM_A98453	2,5	2,6	23,7	63,2	7,5
PMON93764	GM_A98492	1,6	2,7	23,7	63,6	7,7
PMON93764	GM_A98456	1,8	2,4	23,4	64,2	8,0
PMON93764	GM_A98471	2,2	2,7	23,4	64,2	7,4
PMON93764	GM_A98500	2,5	2,3	22,9	64,1	7,9
PMON93764	GM_A98482	2,3	2,5	22,9	64,6	7,3
PMON93764	GM_A98485	2,5	2,7	22,8	63,8	8,0
PMON93764	GM_A98463	1,9	2,2	22,6	64,7	8,3
PMON93764	GM_A98469	3,4	2,5	22,1	63,3	8,5
PMON93764	GM_A98474	1,6	2,3	21,5	65,7	8,4
PMON93764	GM_A98483	2,0	2,5	21,4	65,4	8,5
PMON93764	GM_A98476	2,7	2,6	21,2	64,4	8,8
PMON93764	GM_A98498	2,5	2,5	21,1	64,8	8,9
PMON93764	GM_A98496	2,5	2,3	20,6	65,2	8,9
PMON93764	GM_A98468	1,9	2,7	19,3	66,0	9,7

10

Ejemplo 27

TaqMan es un ensayo que cuantifica los ácidos nucleicos mediante una amplificación selectiva y mediciones de fluorescencia a tiempo real (también se llama PCR a tiempo real). Este procedimiento se usa para determinar el grado de supresión de transcrito diana en semillas transgénicas en desarrollo. Para determinar los niveles absolutos de transcrito de ARNm diana en una muestra, se establece una curva patrón para cada experimento TaqMan. Para este propósito, se amplifican diferentes cantidades de secuencia génica diana de soja clonada, diluida en 20 ng de ARN total de colza, en paralelo con las muestras de cantidades diana desconocidas. La precisión del número de copias de transcrito determinado de este modo tiene un margen de error del 25 %.

15

Para material de molde se extrae el ARN total usando una estación de preparación de ácido nucleico ABI 6100, y se usan 20 ng por muestra TaqMan. Las muestras se analizan en un instrumento de detección de secuencia ABI 700

20

usando química de mezcla maestra de RT-PCR de una etapa ABI Prism. Los valores de recuento TaqMan (Ct) desde el final de la reacción de PCR TaqMan se representan frente a la cantidad conocida de secuencia diana sintética para calcular una regresión lineal de modo que la cantidad de ADN diana de *FAD2-1* en una muestra desconocida pueda determinarse a partir de los valores Ct de TaqMan creados al final de cada reacción de PCR TaqMan.

Las plantas se transformaron con pMON68540, pMON68546, o pMON80623, todas las cuales suprimen *FAD2-1A* (véase la Sección 3A y la Figura 7 para descripciones de las construcciones).

El ARN total se obtiene de plantas nulas y transformadas usando una estación de preparación de ácido nucleico ABI 6100. Las plantas transformadas son homocigóticas en tercera generación y tienen niveles de ácido oleico mayores del 50 %. Los cebadores de *FAD2-1A*, los cebadores de *FAD2-1B*, o los cebadores de *FAD2-2A* se añaden en muestras diferentes de TaqMan al ARN total de cada planta a ensayar. Las muestras se analizan en un instrumento de detección de secuencia ABI 700 usando química de mezcla maestra de RT-PCR de una etapa ABI Prism.

Todas las plantas transgénicas suprimen sustancialmente los niveles de transcripción de *FAD2-1A* y *FAD2-1B*. Ninguna de las plantas transgénicas reducía incluso parcialmente los niveles de *FAD2-2A* o *FAD2-2B*.

Las comparaciones de una planta a otra de los niveles de transcrito *FAD2-1A* en plantas nulas determinan la variación natural entre plantas. Se ensaya el ARNm de *FAD2-1A* de semillas en desarrollo usando cebadores de PCR, que producen la secuencia sonda en múltiples plantas. Se cogen semillas al tamaño de 0,2 g de peso en fresco de cuatro diferentes plantas segregantes nulas R_2 , cada planta de una línea diferente. Se ensayan combinaciones de semillas R_2 de la misma clase de tamaño y de cuatro segregantes nulos diferentes. Las reacciones de PCR se hacen por triplicado y los resultados se normalizan en comparación con la cantidad de ARN 18S en cada muestra. La variabilidad biológica de una planta a otra en transcritos *FAD2-1A* es baja. Tres de las cuatro muestras tienen un valor normalizado de recuento TaqMan (Ct) de aproximadamente 65 y una de las muestras tiene un valor normalizado Ct TaqMan de aproximadamente 50.

Ejemplo 28

Un fragmento de 200 nucleótidos contiguos de la secuencia del intrón 1 *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1) se amplifica mediante PCR para producir productos de PCR que incluyen los primeros 200 nucleótidos de la SEC ID N°: 1, empezando en el extremo 5' de la SEC ID N°: 1. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor $7S\alpha'$ de soja y una secuencia de terminación *tml* 3', mediante sitios de restricción diseñados por ingeniería en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector después se corta con una enzima de restricción y se liga en un vector que contiene el gen CP4 de *EPSPS* regulado por el promotor FMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con esta construcción usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R_1 de plantas de soja transformadas con esta construcción, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R_1 de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos saturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no transformada.

Ejemplo 29

Un fragmento de 180 nucleótidos contiguos de la secuencia del intrón 1 *FAD2-1* de soja (SEC ID N°: 1) se amplifica mediante PCR para producir productos de PCR que incluyen los primeros 180 nucleótidos de la SEC ID N°: 1, empezando en el extremo 3' de la SEC ID N°: 1. Los productos de PCR se clonan directamente, en orientación con sentido, en un vector que contiene el promotor $7S\alpha'$ de soja y una secuencia de terminación *tml* 3', mediante sitios de restricción diseñados por ingeniería en los extremos 5' de los cebadores de PCR. El vector después se corta con una enzima de restricción y se liga en un vector que contiene el gen CP4 de *EPSPS* regulado por el promotor FMV y a secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación usando procedimientos descritos en el presente documento.

Se analizan las composiciones de ácidos grasos de semillas de líneas de soja transformadas con esta construcción usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4 para identificar compuestos de metil éster de ácido graso extraídos de semillas. En primer lugar, se recogen seis semillas R_1 de plantas de soja transformadas con esta construcción, y se determina la composición de ácidos grasos de cada semilla individual. Como las plantas R_1 de cada evento son segregantes para los transgenes y, por lo tanto, producen semillas con composición convencional de soja, así como versiones modificadas. Las semillas positivas se combinan y se promedian para cada evento. Los promedios positivos combinados demuestran que las composiciones de ácidos grasos saturados están alteradas en el aceite de semillas de líneas de soja transgénica en comparación con las de semillas de soja no

transformada.

Ejemplo 30

pMON97562 contiene un promotor 7S α ' de soja unido de forma funcional a un intrón 1 *FAD2-1A* de soja (SEC ID N $^{\circ}$: 1), que está reducido en 100 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' y ligado a una UTR 5' de *FAD3-1A*, seguida de una UTR 3' de *FAD3-1A*, ligado a una UTR 5' de *FAD3-1B*, seguida de una UTR 3' de *FAD3-1B*, seguida de una UTR 5' de *FATB-1a*, seguida de una UTR 3' de *FATB-1a*, unido de forma funcional a 70 nucleótidos del intrón 4 *FAD3-1A*, unido de forma funcional a una UTR 3' de *FATB-1a* en la orientación anti-sentido seguida de una UTR 5' de *FATB-1a* en la orientación anti-sentido, ligado a una UTR 3' de *FAD3-1B* en orientación anti-sentido, seguido de una UTR 5' de *FAD3-1B* en orientación anti-sentido, ligado a una UTR 3' de *FAD3-1A* en orientación anti-sentido, seguida de una UTR 5' de *FAD3-1A* en orientación anti-sentido, seguida de un intrón 1 *FAD2-1A* de soja (SEC ID N $^{\circ}$: 1), que está reducido en 100 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' y en la orientación anti-sentido, unido de forma funcional a un segmento de poliadenilación *H6* 3' con un gen CP4 de *EPSPS* unido de forma funcional a un promotor EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación de soja usando procedimientos descritos en el presente documento. Las composiciones de ácidos grasos se determinan a partir de semillas de líneas de soja transformadas con esta construcción usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4. La Tabla 25 da las composiciones de semillas representativas. El nivel de 18:3 está reducido hasta aproximadamente el 1 %.

Tabla 25. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON97562

Construcción	Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97562	GM_A103478	2,82	3,17	82,88	9,18	1,15
PMON97562	GM_A103481	2,99	2,75	82,7	9,39	1,13
PMON97562	GM_A103476	3,13	3,11	81,35	10,25	1,12

Ejemplo 31

pMON97563 contiene un promotor 7S α ' de soja unido de forma funcional a un intrón 1 *FAD2-1A* de soja (SEC ID N $^{\circ}$: 1), que está reducido en 100 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' y ligado a una UTR 5' de *FAD3-1A*, seguida de una UTR 3' de *FAD3-1A*, ligado a una UTR 5' de *FAD3-1B*, seguida de una UTR 3' de *FAD3-1B*, ligado a una UTR 5' de *FAD3-1C*, seguida de una UTR 3' de *FAD3-1C*, seguida de una región codificante de *FATB-1a* CTP, seguida de una región codificante de *FATB-2a* CTP unida de forma funcional a 70 nucleótidos del intrón 4 *FAD3-1A*, unido de forma funcional a una región codificante *FATB-2a* CTP en la orientación anti-sentido seguida de una región codificante de *FATB-1a* CTP en la orientación anti-sentido, ligado a una UTR 3' de *FAD3-1C* en orientación anti-sentido, seguida de una UTR 5' de *FAD3-1C* en orientación anti-sentido, ligado a una UTR 3' de *FAD3-1B* en orientación anti-sentido, seguida de una UTR 5' de *FAD3-1B* en orientación anti-sentido, ligado a una UTR 3' de *FAD3-1A* en orientación anti-sentido, seguida de una UTR 5' de *FAD3-1A* en orientación anti-sentido, seguida de un intrón 1 *FAD2-1A* de soja (SEC ID N $^{\circ}$: 1), que está reducido en 100 nucleótidos contiguos desde el extremo 3' y en la orientación anti-sentido, unido de forma funcional a un segmento de poliadenilación *H6* 3' con un gen CP4 de *EPSPS* unido de forma funcional a un promotor EFMV y una secuencia de terminación 3' de Rubisco E9 de guisante todo flanqueado por RB y LB en la misma molécula de ADN. La construcción de expresión génica resultante se usa para transformación de plantas usando procedimientos descritos en el presente documento. Las composiciones de ácidos grasos de determinan a partir de semillas de líneas de soja transformadas con esta construcción usando cromatografía de gases como se describe en el Ejemplo 4. La Tabla 26 da las composiciones de semillas representativas. El nivel de 18:3 está reducido hasta aproximadamente el 1 %.

Tabla 26. Composición de ácidos grasos de semillas individuales R1 de eventos pMON97563

Construcción	Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97563	GM_A109156	2,21	2,78	85,05	8,48	0,69
PMON97563	GM_A109196	2,07	2,31	84,4	9,42	0,97
PMON97563	GM_A109207	2,24	2,78	83,98	9,36	0,82
PMON97563	GM_A103543	2,21	2,63	83,94	10,28	0,95
PMON97563	GM_A103547	2,06	2,47	83,67	10,47	0,89

PMON97563	GM_A109146	1,71	2,34	81,14	13,71	0,91
-----------	------------	------	------	-------	-------	------

(continuación)

Construcción	Evento nº	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97563	GM_A109155	2,33	2,7	80,76	12,28	1,11
PMON97563	GM_A109164	2,07	2,61	78,8	14,6	1
PMON97563	GM_A109170	2,68	1,95	78,78	14,14	1,55
PMON97563	GM_A109277	2,49	3,19	78,19	14,51	0,93
PMON97563	GM_A109194	2,46	2,81	76,62	16,26	0,92
PMON97563	GM_A109177	2,56	2,49	72,64	20,14	1,44
PMON97563	GM_A109201	2,46	2,9	72,21	20,13	1,11
PMON97563	GM_A103550	2,18	2,67	70,84	22,25	1,17
PMON97563	GM_A109203	2,18	2,81	69,93	22,91	0,98

Todas las composiciones y/o procedimientos descritos y reivindicados en el presente documento pueden hacerse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación.

Lo siguiente representa realizaciones adicionales de la presente invención:

- 5 1. Una semilla de soja que muestra una composición de ácidos grasos en el aceite de la semilla que comprende un contenido de ácido oleico de aproximadamente el 42 % a aproximadamente el 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados de menos del 8 % en peso de los ácidos grasos totales.
- 10 2. La semilla de soja de la realización 1, en la que dicha semilla comprende adicionalmente un genoma con una secuencia de ácido nucleico que suprime la expresión de *FAD2-1* y *FATB* endógenos de soja, en la que dicha secuencia de ácido nucleico comprende un fragmento del intrón *FAD2-1* de soja que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos de longitud y un fragmento de un gen *FATB* de soja que es entre aproximadamente 40 y aproximadamente 450 nucleótidos de longitud; y dicho genoma comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que aumenta la expresión de una de beta-cetoacil-ACP sintasa IV y delta-9 desaturasa o ambas.
- 15 3. La semilla de soja de la realización 2, en la que dicho fragmento de intrón *FAD2-1* de soja y dicho fragmento de *FATB* de soja se transcriben cada uno en orientaciones con sentido y anti-sentido, produciendo un ARN que es al menos en parte bicatenario.
- 20 4. La semilla de soja de la realización 2, en la que dicha secuencia de ácido nucleico que suprime la expresión de *FAD2-1* y *FATB* endógenos de soja se ensambla como una unidad de transcripción funcional después de su inserción en un cromosoma vegetal.
- 25 5. La semilla de soja de la realización 1, en la que dicha semilla comprende adicionalmente un genoma con una secuencia de ácido nucleico que comprende un fragmento de un intrón *FAD2-1* de soja que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos contiguos de longitud y un fragmento de un gen *FATB* de soja que es entre aproximadamente 40 y aproximadamente 450 nucleótidos contiguos de longitud.
- 30 6. La semilla de soja de la realización 5, en la que dicho fragmento de intrón *FAD2-1* de soja y dicho fragmento de *FATB* de soja se transcriben cada uno en orientaciones con sentido y anti-sentido, produciendo un ARN que es al menos en parte bicatenario.
7. La semilla de soja de la realización 5, en la que dicha secuencia de ácido nucleico se ensambla como una unidad de transcripción funcional después de su inserción en un cromosoma vegetal.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC

35 <120> Construcciones de ácido nucleico y procedimientos de producción de composiciones de aceite de semillas

alteradas

<130> 16518.180

5 <140> EP 07750646.7
<141> 12-02-2007

<150> US 11/376.328
<151> 16-03-2006

10 <150> US 60/781.519
<151> 10-03-2006

<150> US 60/772.614
<151> 13-02-2006

15 <150> US 10/669.888
<151> 29-09-2003

20 <150> US 10/668.240
<151> 24-09-2003

<150> US 10/393.347
<151> 21-03-2003

25 <150> PCT/US03/08610
<151> 21-03-2003

<150> US 60/365.794
<151> 21-03-2002

30 <150> US 60/390.185
<151> 21-06-2002

35 <160> 62

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

40 <211> 420
<212> ADN
<213> Glycine max

<220>

45 <223> intrón 1 de FAD2-1A

<400> 1

```

gtaaattaa ttgtgcctgc acctcgggat atttcatgtg gggttcatca tatttgttga      60
ggaaaagaaa ctcccgaaat tgaattatgc atttatatat cctttttcat ttctagattt      120
cctgaaggct taggtgtagg cacctagcta gtagctacaa tadcagcact tctctctatt      180
gataaacaat tggctgtaat gccgcagtag aggacgatca caacatttcg tgctggttac      240
tttttgtttt atggtcatga tttcactctc tctaattctct ccattcattt tgtagttgtc      300
attatcttta gatttttcac tacctggttt aaaattgagg gattgtagtt ctgttggtac      360
atattacaca ttcagcaaaa caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac tttgacacag      420

```

50 <210> 2
<211> 405

ES 2 532 351 T3

<212> ADN
<213> Glycine max

5 <220>
<223> intrón 1 de FAD2-1B

<400> 2

```
gtatgatgct aaattaaatt gtgcctgcac cccaggatat ttcatgtggg attcatcatt    60
tattgaggaa aactctocaa attgaatcgt gcatttatat tttttttcca tttctagatt    120
tcttgaaggc ttatggtata ggcacctaca attatcagca cttctctcta ttgataaaca    180
attggctgta ataccacagt agagaacgat cacaacattt tgtgctggtt acottttgtt    240
ttatggtcac gatttcactc tctctaactc gtcacttccc tccattcatt ttgtacttct    300
catatttttc acttctctggg tgaaaattgt agttctcttg gtacatacta gtattagaca    360
ttcagcaaca acaactgaac tgaacttctt tatactttga cacag                      405
```

10 <210> 3
<211> 1704
<212> ADN
<213> Glycine max

15 <220>
<223> promotor de FAD2-1B

20 <400> 3

ES 2 532 351 T3

actatagggc acgcgtggtc gacggccccg gctggctctc ggtgtgactc agccccaaagt 60
gacgccaacc aaacgcgtcc taactaaggt gtagaagaaa cagatagtat ataagtatac 120
catataagag gagagtgagt ggagaagcac ttctcctttt tttttctctg ttgaaattga 180
aagtgttttc cgggaaataa ataaaataaa ttaaaatctt acacactcta ggtaggtact 240
tctaatttaa tccacacttt gactctatat atgttttaaa aataattata atgcgtactt 300
acttctcat tatactaaat ttaacatcga tgattttatt ttctgtttct cttctttcca 360
cctacataca tcccaaaatt tagggtgcaa ttttaagttt attaacacat gtttttagct 420
gcatgctgcc tttgtgtgtg ctcaccaaat tgcattcttc tctttatag ttgtatttga 480
attttcacac catatgtaa caagattacg tacgtgtcca tgatcaaata caaatgctgt 540
cttatactgg caattgata aacagccgtc cattttttct ttttctctt aactatatat 600
gctctagaat ctctgaagat tctctgcca tgaatttct ttcttgtaa caacgtcgtc 660
gttatggtat tattttattc tatttttatt ttatcatata tatttcttat tttgttcgaa 720

gtatgtcata ttttgatcgt gacaattaga ttgtcatgta ggagtaggaa taccacttta 780
aacattgat tagtctgtag gcaatattgt cttcttttcc ctcctttatt aatatatttt 840
gtcgaagttt taccacaagg ttgattcgtt tttttgtcc ctttctcttg ttctttttac 900
ctcaggtatt ttagtctttc atggattata agatcactga gaagtgtatg catgtaatac 960
taagcaccat agctgttctg cttgaattta tttgtgtgta aattgtaatg tttcagcgtt 1020
ggctttccct gtagctgcta caatggact gtatatctat tttttgcatt gttttcattt 1080
tttcttttac ttaatcttca ttgctttgaa attaataaaa caatataata tagtttgaac 1140
tttgaactat tgcctattca tgtaattaac ttattcactg actcttattg ttttctggt 1200
agaattcatt ttaaattgaa ggataaatta agaggcaata cttgtaaatt gacctgtcat 1260
aattacacag gacctgttt tgtgcctttt tgtctctgtc tttggttttg catgttagcc 1320
tcacacagat atttagtagt tgttctgcat acaagcctca cacgtatact aaaccagtgg 1380
acctcaaagt catggcctta cacctattgc atgcgagtct gtgacacaac cctggtttc 1440
catattgcaa tgtgctacgc cgtcgtcctt gttgtttcc atatgtatat tgataccatc 1500
aaattattat atcatttata tggctctggac cattacgtgt actctttatg acatgtaatt 1560
gagtttttta attaaaaaaa tcaatgaaat ttaactacgt agcatcatat agagataatt 1620
gactagaaat ttgatgactt attctttcct aatcatattt tcttgtattg atagccccgc 1680
tgccctttt aaactcccga gaga 1704

<210> 4
<211> 4497
<212> ADN
<213> Glycine max
<220>

5

ES 2 532 351 T3

<223> clon genómico de FAD2-1A

<400> 4

```
cttgcttggc aacaacgctg tcaagttatt attttgttct ttttttttt atcatatttc      60
ttattttggt ccaagtatgt catattttga tccatcttga caagtagatt gtcatgtagg      120
aataggaata tcactttaaa ttttaaagca ttgattagtc tgtaggcaat attgtcttct      180
tcttcctcct tattaatatt ttttattctg ccttcaatca ccagttatgg gagatggatg      240
taatactaaa taccatagtt gttctgcttg aagtttagtt gtatagttgt tctgcttgaa      300
gttttagttg gtgtaatggt tcagcgttgg cttcccctgt aactgctaca atggctactga      360
atatatattt tttgcattgt tcattttttt cttttactta atcttcattg ctttgaaatt      420
aataaaacaa aaagaaggac cgaatagttt gaagtttgaa ctattgccta ttcatgtaac      480
ttattcacc c aatcttatat agtttttctg gtagagatca ttttaaattg aaggatataa      540
```

5

ES 2 532 351 T3

attaagagga aataacttgta tgtgatgtgt ggcaatttgg aagatcatgc gtagagagtt 600
 taatggcagg ttttgcaaat tgacctgtag tcataattac actgggccct ctgggagttt 660
 tgtgcctttt tgttgcgct gtgtttgggt ctgcatgtta gcctcacaca gatatttagt 720
 agttgttgtt ctgcatataa gcctcacacg tataactaac gagtgaacct caaaatcatg 780
 gccttacacc tattgagtga aattaatgaa cagtgcattg gagtatgtga ctgtgacaca 840
 acccccggtt ttcattatgc aatgtgctac tgtgggtgatt aacottgcta cactgtcgtc 900
 cttgtttgtt tcottatgta tattgatacc ataaattatt actagtatat cattttatat 960
 tgtccatacc attacgtgtt tatagtcctt ttatgacatg taattgaatt ttttaattat 1020
 aaaaaataat aaaacttaat tacgtactat aaagagatgc tcttgactag aattgtgatc 1080
 tcctagtttc ctaaccatat actaatattt gcttgtattg atagcccctc cgttcccaag 1140
 agtataaaac tgcacgcaat aatacaagcc actaggcatg gtaaattaaa ttgtgcctgc 1200
 acctcgggat atttcatgtg gggttcatca tatttgttga ggaaaagaaa ctcccgaat 1260
 tgaattatgc atttatatat cctttttcat ttctagattt cctgaaggct taggtgtagg 1320
 cacctagcta gtagctacaa taccagcact tctctctatt gataaacaat tggctgtaat 1380
 gcgcagtag aggacgatca caacatttct tgcctggttac tttttgtttt atggctcatga 1440
 tttcaactctc tctaactctc ccattcattt tgtagttgtc attatcttta gatttttcac 1500
 tacctggttt aaaattgagg gattgtagtt ctgttggtag atattacaca ttcagcaaaa 1560
 caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac tttgacacag ggtctagcaa aggaaacaac 1620
 aatgggaggt agaggtcgtg tggcaaagtg gaagttcaag ggaagaagcc tctctcaagg 1680
 gttccaaaaca caaagccacc attcactggt ggccaactca agaaagcaat tccaccacac 1740
 tgctttcagc gctccctcct cacttcattc tctatgttg tttatgacct ttcatttgc 1800
 ttcattttct acattgccac cacctacttc cacctccttc ctcaaccctt ttcctcatt 1860
 gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca ctgggtgtgtg ggtgattgct 1920
 cacgagtgtg gtcaccatgc cttcagcaag taccaatggg ttgatgatgt tgtgggtttg 1980
 accttcact caacactttt agtcccttat ttctcatgga aaataagcca tcgcccctat 2040
 cactccaaca caggttcctt tgaccgtgat gaagtgtttg tcccaaaacc aaaatccaaa 2100
 gttgcatggt tttccaagta cttaaacaac cctctaggaa gggctgtttc tcttctcgtc 2160
 aactcacia tagggtggcc tatgtattta gccttcaatg tctctggtag acctatgat 2220
 agttttgcaa gccactacca ccttatgct cccatatatt ctaaccgtga gaggttctg 2280
 atctatgtct ctgatgttgc tttgttttct gtgacttact ctctctaccg tgttgcaacc 2340
 ctgaaagggg tggtttggct gctatgtgtt tatgggggtgc ctttgctcat tgtgaacggg 2400

ES 2 532 351 T3

tttcttgtga ctatcacata ttgacagcac acacactttg ccttgcctca ttacgattca 2460
 tcagaatggg actggctgaa gggagctttg gcaactatgg acagagatta tgggattctg 2520
 aacaaggtgt ttcatcacat aactgatact catgtggctc accatctctt ctctacaatg 2580
 ccacattacc atgcaatgga ggcaaccaat gcaatcaagc caatattggg tgagtactac 2640
 caatttgatg acacaccatt ttacaaggca ctgtggagag aagcgagaga gtgcctctat 2700
 gtggagccag atgaaggaac atccgagaag ggcgtgtatt ggtacaggaa caagtattga 2760
 tggagcaacc aatgggccat agtgggagtt atggaagttt tgtcatgtat tagtacataa 2820
 ttagtagaat gttataaata agtggatttg ccgcgtaatg actttgtgtg tattgtgaaa 2880
 cagcttgttg cgatcatggt tataatgtaa aaataattct ggtattaatt acatgtggaa 2940
 agtgttctgc ttatagcttt ctgcctaaaa tgcacgctgc acgggacaat atcattggta 3000
 attttttaa aatctgaatt gaggctactc ataatactat ccataggaca tcaaagacat 3060
 gttgcattga ctttaagcag aggttcatct agaggattac tgcataaggct tgaactacaa 3120
 gtaatttaag ggacgagagc aactttagct ctaccacgtc gttttacaag gttattaaaa 3180
 tcaaattgat cttattaaaa ctgaaaattt gtaataaaat gctattgaaa aattaaaata 3240
 tagcaaacac ctaaattgga ctgattttta gattcaaatt taataattaa tctaaattaa 3300
 acttaaattt tataatatat gtcttgtaat atatcaagtt tttttttta ttattgagtt 3360
 tggaaacata taataaggaa cattagttaa tattgataat ccactaagat cgacttagta 3420
 ttacagtatt tggatgattt gtagagata ttcaaacttc actcttatca taatagagac 3480
 aaaagttaat actgatggtg gagaaaaaaa aatggtattg ggagcatatg gtaagataag 3540
 acggataaaa atatgctgca gcctggagag ctaatgtatt ttttggtgaa gttttcaagt 3600
 gacaactatt catgatgaga acacaataat attttctact tacctatccc acataaaata 3660
 ctgattttaa taatgatgat aaataatgat taaaatattt gattctttgt taagagaaat 3720
 aaggaaaaca taaatattct catggaaaaa tcagcttgta ggagtagaaa ctttctgatt 3780
 ataattttaa tcaagtttaa ttcatctttt taattttatt attagtacaa aatcattctc 3840
 ttgaatttag agatgtatgt ttagcttaa tagtaatttt ttatttttat aataaaattc 3900
 aagcagtcaa atttcatcca aataatcgtg ttcgtgggtg taagtcagtt attccttctt 3960
 atcttaatat acacgcaaag gaaaaaataa aaataaaatt cgaggaagcg cagcagcagc 4020
 tgataccacg ttggttgacg aaactgataa aaagcgcgtg cattgtgtct ttgtttgatc 4080
 atcttcacaa tcacatctcc agaacacaaa gaagagtgac ccttcttctt gttattccac 4140
 ttgcgttagg tttctacttt cttctctctc tctctctctc tcttcattcc tcatttttcc 4200
 ctcaaacaat caatcaattt tcattcagat tcgtaaattt ctcgattaga tcacgggggtt 4260
 aggtctccca ctttatcttt tcccaagcct ttctctttcc ccctttccct gtctgcccc 4320

ES 2 532 351 T3

	taaaattcag gatcggaaac gaactggggtt cttgaatttc actctagatt ttgacaaatt	4380
	cgaagtgtgc atgcactgat gcgacccact cccccTTTTT tgcattaaac aattatgaat	4440
	tgaggTTTTT cttgcgatca tcattgcttg aattgaatca tattaggTTT agattct	4497
5	<210> 5 <211> 206 <212> ADN <213> Glycine max	
10	<220> <223> UTR 3' de FAD2-1A <400> 5	
	tggagcaacc aatggggccat agtgggagtt atggaagTTT tgtcatgtat tagtacataa	60
	ttagtagaat gttataaata agtggatttg ccgcgtaatg actttgtgtg tattgtgaaa	120
	cagcttgttg cgatcatggt tataatgtaa aaataattct ggtattaatt acatgtggaa	180
	agtgttctgc ttatagcttt ctgcct	206
15	<210> 6 <211> 125 <212> ADN <213> Glycine max	
20	<220> <223> UTR 5' de FAD2-1A <400> 6	
	ccatatacta atatttgctt gtattgatag cccctccgTTT cccaagagta taaaactgca	60
	tcgaataata caagccacta ggcgatgggtc tagcaaagga aacaacaatg ggaggtagag	120
25	gtcgt	125
30	<210> 7 <211> 191 <212> ADN <213> Glycine max	
35	<220> <223> intrón 1 de FAD3-1A <400> 7	
	gtaataaTTT ttgtgttct tactctTTTT tTTTTTTTT tgtttatgat atgaatctca	60
	cacattgttc tgttatgtca tttcttcttc atttggcttt agacaactta aatttgagat	120
	ctttattatg tttttgctta tatggtaaag tgattcttca ttatttcatt cttcattgat	180
	tgaattgaac a	191
40	<210> 8 <211> 346 <212> ADN	

ES 2 532 351 T3

<213> Glycine max
 <220>
 <223> intrón 2 de FAD3-1A
 5 <400> 8

 ttagttcata ctggcttttt tgtttgttca tttgtcattg aaaaaaaaaatc ttttgttgat 60
 tcaattattt ttatagtgtg tttggaagcc cgtttgagaa aataagaaat cgcacatcggga 120
 atgtgaaagt tataactatt tagcttcacg tgctcgttgc agttccttta ttggttaaat 180
 ttttatagcg tgctaggaaa cccattcgag aaaataagaa atcacatctg gaatgtgaaa 240
 gttataactg ttagcttctg agtaaactg gaaaaaccac attttggatt tggaacccaaa 300
 ttttatttga taaatgacaa ccaaattgat tttgatggat ttgca 346

 10 <210> 9
 <211> 142
 <212> ADN
 <213> Glycine max
 15 <220>
 <223> intrón 3 A de FAD3-1A
 <400> 9

 gtatgtgatt aattgcttct cctatagttg ttcttgattc aattacattt tatttatttg 60
 gtaggtccaa gaaaaaaggg aatccttatg ctccctgagg ctgttcttga acatggctct 120
 tttttatgtg tcattatctt ag 142

 20
 <210> 10
 <211> 1228
 <212> ADN
 25 <213> Glycine max
 <220>
 <223> intrón 4 de FAD3-1A
 30 <400> 10

ES 2 532 351 T3

taacaaaaat aaatagaaaa tagtgggtga acacttaaat gcgagatagt aatacctaaa 60
 aaaagaaaaa aatataggta taataaataa tataactttc aaaataaaaa gaaatcatag 120
 agtctagcgt agtgtttgga gtgaaatgat gttcacctac cactactcaa agattttggt 180
 gtgtccctta gttcattctt attattttac atatcttact tgaaaagact ttttaattat 240
 tcattgagat cttaaagtga ctgttaaatt aaaataaaaa acaagtttgt taaaacttca 300
 aataaataag agtgaaggga gtgtcatttg tcttctttct tttattgcgt tattaatcac 360
 gtttctcttc tctttttttt ttttcttctc tgctttccac ccattatcaa gttcatgtga 420
 agcagtgggc gatctatgta aatgagtggt gggcaattgc acccacaaga ttttattttt 480

 tatttgtaca ggaataataa aataaaaactt tgccccata aaaaataaat attttttctt 540
 aaaataatgc aaaataaata taagaaataa aaagagaata aattattatt aattttatta 600
 ttttgtactt tttatttagt ttttttagcg gtttagatttt tttttcatga cattatgtaa 660
 tcttttaaaa gcatgtaata tttttatttt gtgaaaataa atataaatga tcatattagt 720
 ctcagaatgt ataaactaat aataatttta tcaactaaaag aaattctaatt ttagtccata 780
 aataagtaaa acaagtgaca attatatttt atatttactt aatgtgaaat aataactgaa 840
 cattataata aaacttaatg acaggagata ttacatagtg ccataaagat attttaaaaa 900
 ataaaatcat taatacactg tactactata taatattoga tatatatttt taacatgatt 960
 ctcaatagaa aaattgtatt gattatattt tattagacat gaatttacia gccccgtttt 1020
 tcatttatag ctcttacctg tgatctattg ttttgcttcg ctgtttttgt tggccaaggg 1080
 acttagatgt cacaatatta atactagaag taaatattta tgaaaacatg taccttacct 1140
 caacaaagaa agtgtggtaa gtggcaacac acgtgttgca tttttggccc agcaataaca 1200
 cgtgtttttg tgggtgacta aaatggac 1228

<210> 11
 <211> 625
 <212> ADN
 <213> Glycine max

5

<220>
 <223> intrón 5 de FAD3-1A

10

<400> 11

ES 2 532 351 T3

gtacatttta ttgcttattc acctaaaaac aatacaatta gtacatttgt tttatctctt 60
 ggaagttagt cattttcagt tgcatgattc taatgctctc tccattctta aatcatgttt 120
 tcacacccac ttcattttaa ataagaacgt ggggtgttatt ttaatttcta ttcactaaca 180
 tgagaaatta acttatttca agtaataatt ttaaaatatt tttatgctat tattttatta 240
 caaataatta tgtatattaa gtttattgat tttataataa ttatattaaa attatctga 300
 tattaatfff tgattcactg atagtgffff atattgttag tactgtgcat ttattttaaa 360
 attggcataa ataatatatg taaccagctc actatactat actgggagct tgggtggtgaa 420
 aggggttccc aaccctcctt tctaggtgta catgctttga tacttctggt accttcttat 480
 atcaatataa attatatttt gctgataaaa aaacatggtt aaccattaaa ttcttttttt 540
 aaaaaaaaaa ctgtatctaa actttgtatt attaaaaaga agtctgagat taacaataaa 600
 ctaacactca tttggattca ctgca 625

5 <210> 12
 <210> 12
 <211> 98
 <212> ADN

<220>

10 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Glycine max

15 <220>
 <223> intrón 3B de FAD3-1A

<400> 12

ggtgagtgat tttttgactt ggaagacaac aacacattat tattataata tggttcaaaa 60
 caatgacttt ttctttatga tgtgaactcc atttttta 98

20 <210> 13
 <211> 115
 <212> ADN
 <213> Glycine max

25 <220>
 <223> intrón 3C de FAD3-1A

<400> 13

30 ggtaactaaa ttactcctac attgttactt tttctcctt ttttttatta tttcaattct 60
 ccaattgaa atttgaaata gtaccataa ttatgtaatt gtttgatcat gtgca 115

35 <210> 14
 <211> 1037
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<220>

ES 2 532 351 T3

<223> intrón 4 de Fad3-1C

<400> 14

```

gtaacaaaaa taaatagaaa atagtgagtg aacacttaaa tgtagatac taccttcttc      60
ttcttttttt tttttttttt gaggttaatg ctagataata gctagaaaga gaaagaaaga     120
caaatatagg taaaaataaa taatataacc tgggaagaag aaaacataaa aaaagaaata     180
atagagtcta cgtaatggtt ggatttttga gtgaaatggt gttcacctac cattaactcaa     240
agattctggt gtctacgtag tgtttgact ttggagtgaa atggtgttca cctaccatta     300
ctcagattct gttgtgtccc ttagttactg tcttatatct ttaggtata ttctttattt     360
tacatccttt tcacatctta cttgaaaaga ttttaattat tcattgaaat attaacgtga     420
cagttaaatt aaaataataa aaaattcggt aaaacttcaa ataaataaga gtgaaaggat     480
catcattttt cttctttctt ttattgcggt attaactatg cttctcttct ttttttctt     540
cgctttccac ccatatcaaa ttcattgtga gtatgagaaa atcacgattc aatggaaagc     600
tacaggaacy ttttttggtt tgtttttata atcggaatta atttatactc cattttttca     660
caataaatgt tacttagtgc cttaaagata atatttgaaa aattaaataa attattaata     720
cactgtacta ctatataata tttgacatat atttaacatg attttctatt gaaaatttgt     780
athtattatt ttttaataca aaccataag gcattaattt acaagacca tttttcattt     840
atagctttac ctgtgatcat ttatagcttt aagggactta gatgttacia tcttaattac     900
aagtaaatat ttatgaaaaa catgtgtctt acccctaac cttacctca caaagaaagt     960
gtgataagtg gcaacacacg tgttgctttt ttggcccagc aataacacgt gtttttgtgg    1020
tgtacaaaaa tggacag                                     .                               1037

```

5

<210> 15
 <211> 4010
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10

<220>
 <223> clon genómico de FAD3-1A parcial

15

<400> 15

ES 2 532 351 T3

acaaagcctt tagcctatgc tgccaataat ggataccaac aaaagggttc ttcttttgat 60
 tttgatccta gcgctcctcc accgtttaag attgcagaaa tcagagcttc aatacaaaaa 120
 cattgctggg tcaagaatcc atggagatcc ctcagttatg ttctcagggg tgtgcttgta 180
 attgctgcat tgggtggctgc agcaattcac ttcgacaact ggcttctctg gctaattctat 240
 tgccccattc aaggcacaat gttctgggct ctctttgttc ttggacatga ttggttaataa 300
 tttttgtgtt tcttactctt tttttttttt ttttgttat gatatgaatc tcacacattg 360
 ttctgttatg tcatttcttc ttcatttggc tttagacaac ttaaatttga gatctttatt 420
 atgtttttgc ttatatggta aagtgattct tcattatttc attcttcatt gattgaattg 480
 aacagtggcc atggaagctt ttcagatagc cctttgctga atagcctggg gggacacatc 540
 ttgcattcct caattcttgt gccataccat ggatggttag ttcatactgg cttttttgtt 600
 tgttcatttg tcattgaaaa aaaatctttt gttgattcaa ttatttttat agtgtgtttg 660
 gaagcccggt tgagaaaata agaaatcgca tctggaatgt gaaagttata actatthagc 720
 ttcactctgtc gttgcaagtt cttttattgg ttaaattttt atagcgtgct aggaaacca 780
 ttcgagaaaa taagaaatca catctggaat gtgaaagtta taactgttag cttctgagta 840
 aacgtggaaa aaccacattt tggatttggg accaaatttt atttgataaa tgacaaccaa 900
 attgattttg atggattttg caggagaatt agccacagaa ctcacatga aaacatgga 960
 cacattgaga aggatgagtc atgggtcca gtatgtgatt aattgcttct cctatagttg 1020
 ttcttgattc aattacattt tatttatttg gtaggtccaa gaaaaaggg aatctttatg 1080
 cttctgagg ctgttcttga acatggctct tttttatgtg tcattatctt agttaacaga 1140
 gaagatttac aagaatctag acagcatgac aagactcatt agattcactg tgccatttcc 1200
 atgtttgtgt atccaattta tttggtgagt gattttttga cttggaagac aacaacacat 1260

ES 2 532 351 T3

tattattata atatggttca aaacaatgac tttttcttta tgatgtgaac tccatttttt 1320
 agttttcaag aagccccgga aaggaaggct ctcacttcaa tccctacagc aatctgtttc 1380
 caccagtgga gagaaaagga atagcaatat caacactgtg ttgggctacc atgttttctc 1440
 tgcttatcta tctctcattc attaactagt ccacttctag tgctcaagct ctatggaatt 1500
 ccatattggg taactaaatt actcctacat tgftaactttt tctctctttt ttttattatt 1560
 tcaattctcc aattggaat ttgaaatagt taccataatt atgtaattgt ttgatcatgt 1620
 gcagatgttt gttatgtggc tggactttgt cacatacttg catcaccatg gtcaccacca 1680
 gaaactgcct tggtaaccgag gcaaggtaac aaaaataaat agaaaatagt ggggtgaacac 1740
 ttaaatgcga gatagtaata cctaaaaaaaa gaaaaaaaaata taggtataat aaataatata 1800
 actttcaaaa taaaaagaaa tcatagagtc tagcgtagtg tttggagtga aatgatgttc 1860
 acctaccatt actcaaagat tttgttgtgt cccttagttc attcttatta ttttacatat 1920
 cttacttgaa aagacttttt aattattcat tgagatctta aagtgactgt taaattaaaa 1980
 taaaaaacia gttgtttaa acttcaaata aataagagtg aagggagtgt catttgtctt 2040
 ctttctttta ttgcgttatt aatcacgttt ctcttctctt tttttttttt cttctctgct 2100
 ttccacccat tatcaagttc atgtgaagca gtggcggatc tatgtaaagtg agtggggggc 2160
 aattgcaccc acaagatttt attttttatt tgtacaggaa taataaaata aaactttgoc 2220
 cccataaaaa ataaatattt tttcttaaaa taatgcaaaa taaatataag aaataaaaag 2280
 agaataaatt attattaatt ttattatttt gtacttttta tttagttttt ttagcggtta 2340
 gatttttttt tcatgacatt atgtaatctt ttaaaagcat gtaatatttt tattttgtga 2400
 aaataaatat aatgatcat attagtctca gaatgtataa actaataata attttatcac 2460
 taaaagaaat tctaatttag tccataaata agtaaaacia gtgacaatta tattttatat 2520
 ttacttaatg tgaataaata cttgaacatt ataataaaac ttaatgacag gagatattac 2580
 atagtgccat aaagatattt taaaaataa aatcattaat aactgtact actatataat 2640
 attogatata tatttttaac atgattctca atagaaaaat tgtattgatt atattttatt 2700
 agacatgaat ttacaagccc cgtttttcat ttatagctct tacctgtgat ctattgtttt 2760
 gcttcgctgt tttgttggt caagggactt agatgtcaca atattaatac tagaagtaaa 2820
 tatttatgaa aacatgtacc ttacctcaac aaagaaagtg tggtaagtgg caacacacgt 2880
 gttgcatttt tggcccagca ataacacgtg tttttgtggg gtactaaaat ggacaggaat 2940
 ggagttattt aagaggtggc ctcaccactg tggatcgtga ctatggttgg atcaataaca 3000
 ttcacatga cattggcacc catggtatcc accatctttt ccccaaat cctcattatc 3060
 acctcgttga agcgggtacat tttattgctt attcacctaa aaacaataca attagtacat 3120

ES 2 532 351 T3

ttgttttatac tcttgggaagt tagtcatttt cagttgcatg attctaatagc totctccatt 3180
 cttaaatcat gttttcacac ccacttcatt taaaataaga acgtgggtgt tattttaatt 3240
 tctatttact aacatgagaa attaacttat ttcaagtaat aattttaaaa tatttttatg 3300
 ctattatttt attacaaata attatgtata ttaagtttat tgattttata ataattatat 3360
 taaaattata tcgatattaa tttttgattc actgatagtg ttttatattg ttagtactgt 3420
 gcatttattt taaaattggc ataaataata tatgtaacca gctcactata ctatactggg 3480
 agcttgggtg tgaaaggggt tcccaaccct cctttctagg tgtacatgct ttgatacttc 3540
 tggtaacctc ttatatcaat ataaattata ttttgctgat aaaaaaacat ggtaaccat 3600
 taaattcttt ttttaaaaaa aaaactgtat ctaaactttg tattattaaa aagaagtctg 3660
 agattaacaa taaactaaca ctcatattgga ttcactgcag acacaagcag caaaaccagt 3720
 tcttggagat tactaccgtg agccagaaag atctgogcca ttaccatttc atctaataaa 3780
 gtatttaatt cagagtatga gacaagacca cttcgtaagt gacactggag atgttgttta 3840
 ttatcagact gattctctgc tctccaactc gcaacgagac tgagtttcaa actttttggg 3900
 ttattattta ttgattctag ctactcaaat tacttttttt ttaatgttat gttttttgga 3960
 gttaacggtt ttctgaacaa cttgcaaatt acttgcatag agagacatgg 4010

5 <210> 16
 <211> 184
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10 <220>
 <223> UTR 3' de FAD3-1A
 <400> 16

gtttcaaact ttttgggta ttatttattg gattctagct actcaaatta cttttttttt 60
 aatgttatgt tttttggagt ttaacgtttt ctgaacaact tgcaaattac ttgcatagag 120
 agacatggaa tattttattg aaattagtaa ggtagtaata ataaattttg aattgtcagt 180
 ttca 184

15 <210> 17
 <211> 143
 <212> ADN
 <213> Glycine max

20 <220>
 <223> UTR 5' de FAD3-1A
 <400> 17

ES 2 532 351 T3

```
tgcggttata taaatgcact atcccataag agtatttttc gaagatttcc ttcttctat    60
tctaggtttt tacgcaccac gtatccctga gaaaagagag gaaccacact ctctaagcca    120
aagcaaaagc agcagcagca gca                                             143
```

5 <210> 18
<211> 2683
<212> ADN
<213> Glycine max

10 <220>
<223> clon genómico de FAD3-1B parcial
<400> 18

ES 2 532 351 T3

gttcaagcac agcctctaca acatgttggc aatggtgcag ggaaagaaga tcaagcttat 60
 tttgatccaa gtgctccacc acccttcaag attgcaaata tcagagcagc aattccaaaa 120
 cattgctggg agaagaacac attgagatct ctgagttatg ttctgagggg tgtggttgga 180
 gtgactgcat tggtagctgc agcaatcggc ttcaatagct ggttcttctg gccactctat 240
 tggectgcac aaggcacaat gttttgggca ctttttggtc ttggacatga ttggtaacta 300
 attattatta caaattgtta tgttatgtta tgttatggtg ttgtgccttt ttctcagtga 360
 tgctttagtc atttcatttc acttggttat gcatgattgt tcgttcatat gttctgtcat 420
 ggtgagttct aatttgattg atgcatggaa cagtggctcat ggaagttttt caaacagtcc 480
 tttggtgaac agcattgtgg gccacatctt gcactcttca attcttgtac cataccatgg 540
 atggctgggt ccttttagca acttttcatg ttcactttgt ccttaaattt tttttatgt 600
 ttgttaaaaa atctttggtc tgatttaaca acctaacat ttttacaact catggatttt 660
 ttgcaggaga attagccaca ggactcacca tcagaacctt ggccatggtg agaaggatga 720
 atcatgggtt ccggtattac tatgagtttg ctgattaat ttccacattt tttctttctt 780
 ctttaattta atcagtggtt agatttggtt gtggtccgat agaagaaaag ggggtatcta 840
 gagagatgtg aatttcatga agtggttcat gattatgtgt ctttatgcct ttatgtcagc 900
 ttacagagaa agtttacaag aatctagaca acatgacaag aatgatgaga ttcactcttc 960
 ctttccccat ctttgcatac cccttttatt tggtgagacc ctctttttcc agaatgacag 1020
 cattatntta ctatatagta cctcaatttt tatatttcta aaattttgaa ttcttgaat 1080
 tgaaaggaaa ggactttatt gggcttagca tctcaactctc tctttgtgat atgaaccata 1140
 tatttcagtg gagcagaagc cctggaaaag aaggctctca tttcaacct tacagcaact 1200
 tgttctctcc tggtgagaga agagatgtgc taacttcaac tctatggttg ggcacatgc 1260
 tttctgtgct tctctatctt tccctcacia tgggtccact ttttatgctc aagctctatg 1320
 gggttcccta tttgtaatc tcaactctcac actttcttta tacatgcac gccagtgtgg 1380
 gttatttga acctacaccg aagtaatgcc ctataattaa tgaggttaac acatgtccaa 1440
 gtccaatatt ttgttcaactt atttgaactt gaacatgtgt agatcttctg catgtggctg 1500
 gatttctgca cgtacttga tcacatgggt tacaagcaga aactgccttg gtaccgtggc 1560

ES 2 532 351 T3

caggtatccc atttaacaca atttgtttca ttaacatfff aagagaatff ttttttcaaa 1620
 atagttttcg aaattaagca aataccaagc aaattgtag atctacgctt gtacttgttt 1680
 taaagtcaaa ttcattgacca aattgtcttc acaagtccaa accgtccaact attttatttt 1740
 cacctacttt atagcccaat ttgccatttg gttacttcag aaaagagaac cccatttgta 1800
 gtaaataatat tatttatgaa ttatggtagt ttcaacataa aacatactta tgtgcagttt 1860
 tgccatcctt caaaagaagg tagaaactta ctccatgta ctctgtctat atgtaatttc 1920
 acaggaatgg agttatctaa ggggtggtct tacaacagta gatcgcgact atggttgat 1980
 caacaacatt caccatgaca ttggcaccca tgttatccat caccttttcc ctcaaattcc 2040
 acattatcat ttaatcgaag cggattaat tctctatttc acaagaaatt attgtatgtc 2100
 tgccatggtg atctaagtca atttcacat aacacatgat caaactttct taattcttcc 2160
 ttctaaattg aaaaagtgga ttatatgtca attgaaaatt ggtcaagacc acaaacatgt 2220
 gatgatctcc caccttacet ataataatff ctccattctt acaatcaata atccttctat 2280
 ggtcotgaat tgttccttcc ttttttcatt ttcttattct ttttggtgtc ccacaataga 2340
 ctaaagcagc aaaggcagtg ctaggaaagt attatcgtga gcctcagaaa tctgggcat 2400
 tgccacttca tctaataaag tacttgctcc acagcataag tcaggatcac ttcgtagcg 2460
 actctggcga cattgtgtac taccagactg attcccagct ccacaaagat tcttggaacc 2520
 agtccaacta aagtttttga tgctacattt acctatttca ctcttaata ctatttctca 2580
 tgtaatatgt aatttagaat atgttaccta ctcaaataca ttaggtgaca tgtataagct 2640
 ttcataaatt atgctagaaa tgcacttact tttcaaagca tgc 2683

5 <210> 19
 <211> 160
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10 <220>
 <223> intrón 1 de FAD3-1B
 <400> 19

gtaactaatt attattacaa attggtatgt tatggtatgt tatggtggtg tgccttttcc 60
 tcagtgatgc tttagtcatt tcatttccact tgggtatgca tgattggtcg ttcatatggt 120
 ctgtcatggt gagttctaatt ttgattgatg catggaacag 160

15 <210> 20
 <211> 119
 <212> ADN
 <213> Glycine max

20 <220>
 <223> intrón 2 de FAD3-1B

ES 2 532 351 T3

<400> 20

gttcctttta gcaacttttc atgttcactt tgtccttaaa ttttttttta tgtttgtaa 60

aaaatctttg gtctgattta acaacctaac catttttaca actcatggat tttttgcag 119

5 <210> 21
<211> 166
<212> ADN
<213> Glycine max

10 <220>
<223> intrón 3a de FAD3-1B

<400> 21

gtattactat gagtttgctt gattaatttc cacatttttt ctttcttctt aattttaatc 60

agtggttaga tttggttg^{*}tg ttccgataga agaaaagggg gtatctagag agatgtgaat 120

ttcatgaagt ggttcatgat tatgtgtctt tatgccttta tgtcag 166

15 <210> 22
<211> 156
<212> ADN
<213> Glycine max

20 <220>
<223> intrón 3b de FAD3-1B

25 <400> 22

gtgagaccct ctttttccag aatgacagca ttattttact atatagtacc tcaattttta 60

tatttctaaa attttgaatt ctgaaattg aaaggaaagg actttattgg gtctagcatc 120

tcactctctc tttgtgatat gaaccatata tttcag 156

30 <210> 23
<211> 148
<212> ADN
<213> Glycine max

35 <220>
<223> intrón 3c de FAD3-1B

<400> 23

gtaatctcac tctcactt tctttataca tcgcacgcca gtgtgggta tttgcaacct 60

acaccgaagt aatgccotat aattaatgag gttaacacat gtccaagtcc aatattttgt 120

tcacttattt gaacttgaac atgtgtag 148

40 <210> 24
<211> 351
<212> ADN
<213> Glycine max

45 <220>
<223> intrón 4 de FAD3-1B

ES 2 532 351 T3

<400> 24

```

taacacaatt tgtttcatta acattttaag agaatttttt tttcaaaata gttttcgaaa      60
ttaagcaaat accaagcaaa ttgtagatc tacgcttgta cttgttttaa agtcaaattc      120
atgacaaaat tgcctcaca agtccaaaacc gtccactatt ttattttcac ctactttata      180
gcccaatttg ccatttggtt acttcagaaa agagaacccc attttagta aatatattat      240
ttatgaatta tggtagtttc aacataaaac atacctatgt gcagttttgc catccttcaa      300
aagaaggtag aaacttactc catgttactc tgtctatag taatttcaca g                351

```

5

<210> 25
<211> 277
<212> ADN
<213> Glycine max

10

<220>
<223> intrón 5 de FAD3-1B

15

<400> 25

```

gtattaattc tctatttcac aagaaattat tgtatgtctg cctatgtgat ctaagtcaat      60
tttcacataa cacatgatca aactttctta attctttctt ctaaattgaa aaagtggatt      120
atatgtcaat tgaaaattgg tcaagaccac aaacatgtga tgatctccca cttacatat      180
aataatttct cctattctac aatcaataat ccttctatgg tcttgaattg ttcctttctt      240
ttttcatttt cttattcttt ttgttgtecc acaatag                                277

```

20

<210> 26
<211> 158
<212> ADN
<213> Glycine max

25

<220>
<223> UTR 3' de FAD3-1B

<400> 26

```

agtttttgat gctacattta cctatttcac tottaaatac tatttctat gtaatatgta      60
attagaata tgttacctac tcaaatcaat taggtgacat gtataagctt tcataaatta      120
tgctagaaat gcacttactt ttcaaagcat gctatgtc                                158

```

30

<210> 27
<211> 83
<212> ADN
<213> Glycine max

35

<220>
<223> UTR 5' de FAD3-1B

<400> 27

ES 2 532 351 T3

tctaatacga ctcaactatag ggcaagcagt ggtatcaacg cagagtacgc gggggtaaca 60
gagaaagaaa catttgagca aaa 83

5 <210> 28
<211> 4083
<212> ADN
<213> Glycine max

10 <220>
<223> clon genómico de FATB-1
<400> 28

ES 2 532 351 T3

gggaacaac aaggacgcaa aatgacacaa tagcccttct tccctgttcc cagcttttct 60
 ccttctctct ctcacatctc ttcttctctc tcaactcagtc aggtacgcaa acaaactctgc 120
 tattcattca ttcattcctc tttctctctg atcgcaaaact gcacctctac gctccactct 180
 tctcattttc tottcccttc tcgcttctca gatccaaact ctcagataac acaagaccaa 240
 acccgctttt tctgcatttc tagactagac gttctaccgg agaaggttct cgattctttt 300
 ctcttttaac tttattttta aaataataat aatgagagct ggatgctctc gttcgttggtg 360
 aatttcgagg caatgggggt ctcattttcg ttacagttac agattgcatt gtctgctttc 420
 ctcttctccc ttgtttcttt gccttgtctg atttttogtt tttatttctt acttttaatt 480
 tttggggatg gatatttttt ctgcattttt tcggtttgcg atgttttcag gattccgatt 540
 ccgagtcaga tctgogccgg cttatacgac gaatttgctc ttattcgcaa cttttcgctt 600
 gattggcttg ttttacctct ggaatctcac acgtgatcaa ataagcctgc tattttagtt 660
 gaagtagaat ttgttcttta tcggaaagaa ttctatggat ctgttctgaa attggagcta 720
 ctgtttcgag ttgtattttt ttttagtagt attaagaaca agtttgcctt ttattttaca 780
 ttttttctct ttgtttttgc caaaagtttt tatgatcact ctcttctgtt tggatataa 840
 ctgatgtgct gtgctgttat tatttgttat ttggggtgaa gtataatttt ttgggtgaac 900
 ttggagcatt ttttagtccga ttgatttctc gatatcattt aaggctaagg ttgacctcta 960
 ccacgcgctt gcgtttgatg tttttccat tttttttta tctcatatct tttacagtgt 1020
 ttgcctattt gcatttctct tctttatccc ctttctgtgg aaagggtgga gggaaaatgt 1080
 atttttttt tctcttctaa cttgctata ttttgcctgc agcgacctta gaaattcatt 1140
 atggtggcaa cagctgctac ttcacattt tccctgtta cttcacctc gccggactct 1200
 ggtggagcag gcagcaaaact tgggtgtggg cctgcaaacc ttggaggact aaaatccaaa 1260
 tctgctctt ctggtggctt gaaggcaaag gcgcaagccc cttcgaaaat taatggaacc 1320
 acagttgtta catctaaaga aggctcaag catgatgatg atctacctc gcctcccccc 1380
 agaactttta tcaaccagtt gcctgattgg agcatgcttc ttgctgctat cacaacaatt 1440
 ttcttgccg ctgaaaagca gtggatgatg cttgattgga agccacggcg acctgacatg 1500
 cttattgacc cctttgggat aggaaaaatt gttcaggatg gtcttgtgtt ccgtgaaaac 1560
 ttttctatta gatcatatga gattggtgct gatcgtaccg catctataga aacagtaatg 1620

ES 2 532 351 T3

aaccatttgc aagtaagtcc gtcctcatac aagtgaatct ttatgatctt cagagatgag 1680
tatgctttga ctaagatagg gctgtttatt tagacactgt aattcaattt catatataga 1740
taatatcatt ctggtgttac ttttcatact atatttatat caactatttg cttacaaca 1800
ggaaactgca cttaatcatg ttaaaagtgc tgggcttctt ggtgatggct ttggttccac 1860
gccagaaatg tgcaaaaaga acttgatatg ggtggttact cggatgcagg ttgtggtgga 1920
acgctatcct acatggtag tcatctagat tcaaccatta catgtgattt gcaatgtatc 1980
catgttaagc tgctatttct ctgtctattt tagtaatctt tatgaggaat gatcactcct 2040
aaatatatto atggtaatta ttgagactta attatgagaa ccaaaatgct ttggaaattt 2100
gtctgggatg aaaattgatt agatacacia gctttataca tgatgaacta tgggaaacct 2160
tgtgcaacag agctattgat ctgtacaaga gatgtagtat agcattaatt acatgttatt 2220
agataagggtg acttatcctt gtttaattat tgtaaaaata gaagctgata ctatgtattc 2280
tttgcatttg ttttcttacc agttatatat accctctggt ctgtttgagt actactagat 2340
gtataaagaa tgcaattatt ctgacttctt ggtggtgggt tgaagttaga taagctatta 2400
gtattattat ggttattcta aatctaatta tctgaaattg tgtgtctata tttgcttcag 2460
gggtgacata gttcaagtgg acacttgggt ttctggatca ggaagaatg gtatgcgtcg 2520
tgattggctt ttacgtgact gcaaaaactgg tgaaatcttg acaagagctt ccaggtagaa 2580
atcattctct gtaattttcc ttccccttcc cttctgcttc aagcaaattt taagatgtgt 2640
atcttaatgt gcacgatgct gattggacac aattttaaat ctttcaaaca tttacaaaag 2700
ttatggaacc ctttcttttc tctcttgaag atgcaaattt gtcacgactg aagtttgagg 2760
aaatcatttg aattttgcaa tgttaaaaaa gataatgaac tacatatttt gcaggcaaaa 2820
acctctaatt gaacaaactg aacattgtat cttagtttat ttatcagact ttatcatgtg 2880
tactgatgca tcaccttga gcttgtaatg aattacatat tagcattttc tgaactgtat 2940
gttatggttt tggatgacta cagtgtttgg gtcatgatga ataagctgac accgaggctg 3000
tctaaaattc cagaagaagt cagacaggag ataggatctt attttggtga ttctgatcca 3060
attctagaag aggataacag aaaactgact aaacttgacg acaacacagc ggattatatt 3120
cgtaccgggt taagtgtatg tcaactagtt tttttgtaat tgttgcatt aatttctttt 3180
cttaaattat ttcagatggt gctttctaatt tagtttacat tatgtatctt cattcttcca 3240
gtctaggtgg agtgatctag atatcaatca gcatgtcaac aatgtgaagt acattgactg 3300
gattctggag gtatttttct gttcttgtat tctaatecac tgcagtcctt gttttgttgt 3360
taaccaaagg actgtccttt gattgtttgc agagtgtccc acagccaatc ttggagagtc 3420
atgagcttcc ttccgtgact ttagagtata ggaggagtg tggtagggac agtgtgctgg 3480

ES 2 532 351 T3

attccctgac tgctgtatct ggggocgaca tgggcaatct agctcacagt ggacatggtg 3540
 agtgcaagca tttgcttcga ctcgaaaatg gtgctgagat tgtgaggggc aggactgagt 3600
 ggaggcccaa acctatgaac aacattgggtg ttgtgaacca ggttccagca gaaagcacct 3660
 aagatthtga aatgggtaac ggttggagtt gcatcagtct ccttgctatg tttagactta 3720
 ttctggcctc tggggagagt tttgottgtg tctgtccaat caatctacat atctttatat 3780
 ccttctaatt tgtgttactt tgggtgggtaa gggggaaaag ctgcagtaaa cctcattctc 3840
 tctttctgct gctccatatt tcatttcate totgattgcg ctactgctag gctgtottca 3900
 atatttaatt gcttgatcaa aatagctagg catgtatatt attattcttt tctcttggct 3960
 caattaaaga tgcaattttc attgtgaaca cagcataact attattctta ttatttttgt 4020
 atagcctgta tgcacgaatg acttgtccat ccaatacaac cgtgattgta tgctccagct 4080
 cag 4083

5 <210> 29
 <211> 109
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10 <220>
 <223> intrón I de FATB-1
 <400> 29

gtacgcaaac aaatctgcta ttcattcatt cttcctcttt tctctctgat cgcaaactgc 60
 acctctacgc tccactcttc tcattttctc ttcctttctc gcttctcag 109

15 <210> 30
 <211> 836
 <212> ADN
 <213> Glycine max

20 <220>
 <223> intrón II de FATB-1
 <400> 30

ES 2 532 351 T3

gttctcgatt cttttctctt ttaactttat ttttaaata ataataatga gagctggatg 60
 cgtctggtcg ttgtgaattt cgaggcaatg gggttctcat tttcgttaca gttacagatt 120
 gcattgtctg ctttctctt ctccttgggt tctttgcctt gtctgatttt tcgtttttat 180
 ttcttacttt taatttttgg ggatggatat tttttctgca ttttttcggt ttgcgatggt 240
 ttcaggattc cgattccgag tcagatctgc gccggcttat acgacgaatt tgttcttatt 300
 cgcaactttt cgottgattg gcttgtttta cctctggaat ctcacacgtg atcaaataag 360
 cctgctattt tagttgaagt agaatttgggt ctttatcgga aagaattcta tggatctggt 420
 ctgaaattgg agctactggt tcgagttgct atttttttta gtagtattaa gaacaagttt 480
 gccttttatt ttacattttt ttcttttggc tttgccaaaa gtttttatga tcaactctctt 540

 ctgtttgtga tataactgat gtgctgtgct gttattattt gttatttggg gtgaagtata 600
 attttttggg tgaacttggg gcatttttag tccgattgat ttctcgatat catttaaggc 660
 taaggttgac ctctaccacg cgtttgcggt tgatgttttt tccatttttt ttttatctca 720
 tatcttttac agtgtttggc tatttgcatt tctctctctt atcccctttc tgtggaaggt 780
 gggagggaaa atgtattttt tttttctctt ctaacttggc tatattttgc atgcag 836

5 <210> 31
 <211> 169
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10 <220>
 <223> intrón III de FATB-1

<400> 31

gtaagtcggt cctcatacaa gtgaatcttt atgatcttca gagatgagta tgctttgact 60
 aagatagggc tgtttattta gacactgtaa ttcaatttca tatatagata atatcattct 120
 gttgttactt ttcatactat atttatatca actatttggc taacaacag 169

15 <210> 32
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Glycine max

20 <220>
 <223> intrón IV de FATB-1

<400> 32

ES 2 532 351 T3

gtagtcac tc tagattcaac cattacatgt gatttgcaat gtatccatgt taagctgcta 60
 tttctctgtc tattttagta atctttatga ggaatgatca ctccctaaata tattcatggt 120
 aattattgag acttaattat gagaacccaaa atgctttgga aatttgtctg ggatgaaaat 180
 tgattagata cacaagcttt atacatgatg aactatggga aaccttgtgc aacagagcta 240
 ttgatctgta caagagatgt agtatagcat taattacatg ttattagata aggtgactta 300
 tccttgttta attattgtaa aatagaagc tgatactatg tattctttgc atttgttttc 360
 ttaccagtta tatataccct ctgttctggt tgagtactac tagatgtata aagaatgcaa 420
 ttattctgac ttcttgggtg tgggttgaag ttagataagc tattagtatt attatgggta 480
 ttctaaatct aattatctga aattgtgtgt ctatatttgc ttcag 525

5 <210> 33
 <211> 389
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10 <220>
 <223> intrón V de FATB-1
 <400> 33

gtagaaatca ttctctgtaa ttttccttcc ctttctcttc tgcttcaagc aaattttaag 60
 atgtgtatct taatgtgcac gatgctgatt ggacacaatt ttaaactctt caaacattta 120
 caaaagttat ggaacccttt cttttctctc ttgaagatgc aaatttgtca cgactgaagt 180
 ttgaggaaat catttgaatt ttgcaatggt aaaaaagata atgaactaca tattttgcag 240
 gcaaaaacct ctaattgaac aaactgaaca ttgtatctta gtttatttat cagactttat 300
 catgtgtact gatgcatcac cttggagctt gtaatgaatt acatattagc attttctgaa 360
 ctgtatgtta tggttttggt gatctacag 389

15 <210> 34
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> Glycine max

20 <220>
 <223> intrón VI de FATB-1
 <400> 34

tatgtcaact agtttttttg taattgtgtg cattaatttc tttctttaa ttatttcaga 60
 tgttgccttc taattagttt acattatgta tcttcattct tccagt 106

30 <210> 35
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<220>
 <223> intrón VII de FATB-1

ES 2 532 351 T3

<400> 35

gtatTTTTct gttcttGtat tctaattccac tgcagtcctt gttttgttGt taaccAAagg 60

actGtccttt gattGtttGc ag 82

5

<210> 36
 <211> 208
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10

<220>
 <223> UTR 3' de FATB-1

15

<400> 36

gatttGaaat ggTtaacgat tggagttGca tcagtctcct tgctatGttt agacttattc 60

tggttccctG gggagagttt tgcttGtGtc tatccaatca atctacatGt ctttaaatat 120

atacaccttc taatttGtga tactttGgtg ggtaaggggg aaaagcagca gtaaattcCa 180

ttctcattGt aattAAAAA aaaaaaaa 208

20

<210> 37
 <211> 229
 <212> ADN
 <213> Glycine max

25

<220>
 <223> UTR 5' de FATB-1

30

<400> 37

acaattacac tGtctctctc ttttccAAAA ttagggaaac aacaaggacg caaaatGaca 60

caatagccct tcttccctGt ttccagcttt tctccttctc tetctctcca tcttcttctt 120

cttcttcact cagtcagatc caactcctca gataacacaa gaccaaacc gctttttctG 180

catttctaga ctagacGttc taccGgagaa gGgaccttag aaattcatt 229

35

<210> 38
 <211> 1398
 <212> ADN
 <213> *Cuphea pulcherrima*

<220>
 <223> gen KAS I

<400> 38

ES 2 532 351 T3

atgcattccc tccagtcacc ctcccttogg gcctccccgc tcgaccocctt ccgcccctaaa 60
 tcatccaccg tccgccccct ccaccgagca tcaattccca acgtccgggc cgcttcccc 120
 accgtctccg ctcccaagcg cgagaccgac cccaagaagc gcgtcgtgat caccggaatg 180
 ggccttgtct cegttttcgg ctccgacgtc gatgogtact acgacaagct cctgtcaggc 240
 gagagcggga tgggccaat cgaccgcttc gacgcctcca agttccccac caggttcggc 300
 ggccagattc gtggcttcaa ctccatggga tacattgacg gcaaaaacga caggcggcct 360
 gatgattgcc ttcgctactg cattgtcgcc ggaagaagt ctcttgagga cgccgatctc 420
 ggtgcccacc gcctctccaa gatcgacaag gagagagccg gagtgctggt tgggacagga 480
 atgggtggtc tgactgtctt ctctgacggg gttcaatctc ttatcgagaa gggtcaccgg 540
 aaaatcacco ctttcttcat cccctatgcc attacaaaca tggggctctgc cctgctcgtc 600
 attgaactcg gtctgatggg cccaaactat tcaatttcca ctgcatgtgc cacttccaac 660
 tactgcttcc atgctgctgc taatcatatc cgccgtgggtg aggctgatct tatgattgct 720
 ggaggcactg aggccgcaat cattccaatt gggttgggag gctttgtggc ttgcagggct 780
 ctgtctcaaa ggaacgatga ccctcagact gcctctagggc cctgggataa agaccgtgat 840
 ggttttgtga tgggtgaagg tgctggagtg ttgggtgctgg agagcttggga acatgcaatg 900
 aaacgaggag cacctattat tgcagagtat ttgggaggtg caatcaactg tgatgcttat 960
 cacatgactg acccaagggc tgatggtctc ggtgtctctc cttgcattga gagtagcctt 1020
 gaagatgctg gcgtctcacc tgaagaggtc aattacataa atgctcatgc gacttctact 1080

 ctagctgggg atctcgccga gataaatgcc atcaagaagg ttttcaagaa cacaaggat 1140
 atcaaaatta atgcaactaa gtcaatgatc ggacactgctc ttggagcctc tggaggctt 1200
 gaagctatag cgactattaa ggaataaac accggctggc ttcattcccag cattaatcaa 1260
 ttcaatcctg agccatccgt ggagtccgac actggttgcca acaagaagca gcaacacgaa 1320
 gttaatggtg cgatctcgaa ttcatttggga ttccggaggcc acaactcagt cgtggcttcc 1380
 tcggctttca agccatga 1398

<210> 39
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> *Cuphea pulcherrima*

 <400> 39

5

ES 2 532 351 T3

atgggtgtgg tgactcctct aggccatgac cctgatgttt tctacaataa tctgcttgat 60
 ggaacgagtg gcataagcga gatagagacc tttgattgtg ctcaatttcc tacgagaatt 120
 gctggagaga tcaagtcttt ctccacagat ggttgggtgg ccccgaagct ctctaagagg 180
 atggacaagt tcatgctata catgctgacc gctggcaaga aagcattaac agatgggtgga 240
 atcaccgaag atgtgatgaa agagctagat aaaagaaaat gcggagttct cattggctca 300
 gcaatgggtg gaatgaaggt attcaatgat gccattgaag cccctaaggat ttcataaag 360
 aagatgaatc ccttttgtgt acctttcgct accacaaaata tgggatcagc tatgcttgca 420
 atggacttgg gatggatggg gcccaactac tcgatatcta ctgcttgtgc aacgagtaac 480
 ttttgtataa tgaatgctgc gaaccatata atcagaggcg aagcagatgt gatgctttgc 540
 gggggctcag atgcggtaat catacctatt ggtatgggag gttttgttgc atgccgagct 600
 ttgtcccaga gaaattcoga ccctactaaa gcttcaagac catgggacag taatcgtgat 660
 ggatttgta tgggggaagg agctggagtg ctactactag aggagttgga gcatgcaaag 720
 aaaagagtg cgactattta cgcagaattt ctagggtggga gtttcacttg cgatgcctac 780
 cacatgaccg agcotcacco tgatggagct ggagtgatc tctgcataga gaaggctttg 840
 gctcagtcag gagtctctag ggaagacgta aattacataa atgcccagc cacatccact 900
 cccgctggag atatcaaaga gtaccaagct cttatccact gtttcggcca aaacagagag 960
 ttaaaagtta attcaaccaa atcaatgatt ggtcaccttc tcggagcagc cgggtggtgtg 1020
 gaagcagttt cagtagttca ggcaataagg actgggtgga tccatccgaa tattaatttg 1080
 gaaaaccag atgaaggcgt ggatacaaaa ttgctcgtgg gtcctaagaa ggagagactg 1140
 aacgttaagg tcggtttgtc taattcattt gggtttgggtg ggcacaactc gtccatactc 1200
 ttcgccccctt acatctag 1218

<210> 40
 <211> 1191
 <212> ADN
 <213> *Ricinus communis*

5

<220>
 <223> delta-9 desaturasa

10

<400> 40

ES 2 532 351 T3

atggctctca agctcaatcc tttcctttct caaacccaaa agttaccttc tttcgctctt 60
ccaccaatgg ccagtaccag atctcctaag ttctacatgg cctctaccct caagtctggt 120
tctaaggaag ttgagaatct caagaagcct ttcatgcctc ctcgggaggt acatggtcag 180
gttaccocatt ctatgccacc caaaagatt gagatcttta aatccctaga caattgggct 240
gaggagaaca ttctggttca tctgaagcca gttgagaaat gttggcaacc gcaggatttt 300
ttgccagatc ccgcctctga tggatttgat gagcaagtca ggaactcag ggagagagca 360
aaggagattc ctgatgatta ttttggtggt ttggttgag acatgataac ggaagaagcc 420
cttcccactt atcaacaat gctgaatacc ttggatggag ttcgggatga aacagggtgca 480
agtcctactt cttgggcaat ttggacaagg gcatggactg cggaagagaa tagacatggt 540
gacctctca ataagtatct ctacctatct ggacgagtgg acatgaggca aattgagaag 600
acaattcaat atttgattgg ttcaggaatg gatccacgga cagaaaacag tccatacctt 660
gggttcatct atacatcatt ccaggaaagg gcaaccttca tttctcatgg gaacactgcc 720
cgacaagcca aagagcatgg agacataaag ttggctcaaa tatgtggtac aattgctgca 780
gatgagaagc gccatgagac agcctacaca aagatagtgg aaaaactctt tgagattgat 840
cctgatggaa ctgttttggc ttttgctgat atgatgagaa agaaaatttc tatgcctgca 900
cacttgatgt atgatggccg agatgataat ctttttgacc acttttcagc tgttgccgag 960
cgtcttgag tctacacagc aaaggattat gcagatatat tggagttctt ggtgggcaga 1020
tggaagggtg ataaactaac gggcctttca gctgaggac aaaaggctca ggactatggt 1080
tgtcggttac ctccaagaat tagaaggctg gaagagagag ctcaaggaag ggcaaaggaa 1140
gcaccacca tgcctttcag ctggattttc gataggcaag tgaagctgta g 1191

<210> 41
<211> 1194
<212> ADN
<213> *Simmondsia chinensis*

<220>
<223> delta-9 desaturasa

<400> 41

atggcgttga agcttcacca cacggccttc aatccttcca tggcggttac ctcttcggga 60
cttctogat cgtatcacct cagatctcac cgcgttttca tggettcttc tacaattgga 120
attactteta aggagatacc caatgccaaa aagcctcaca tgcctectag agaagctcat 180

ES 2 532 351 T3

gtgcaaaaga cccattcaat gcgcctcaa aagattgaga ttttcaaate cttggagggt 240
 tgggctgagg agaatgtctt ggtgcatctt aaacctgtgg agaagtgttg gcaaccacaa 300
 gatctttctac cgcacccggc ctccgagggga tttatggatc aagtcaagga gttgagggaa 360
 agaaccaaag aaatcccgga tgagtacott gtgggtgttg ttggcgatat gatcactgaa 420
 gaagctcttc cgacctacca gacgatgcta aacacgctcg atggagtacg tgatgagacg 480
 ggtgccagcc ttacttcttg ggctatctgg acccgggcat ggaccgctga agagaaatagg 540
 cacggtgatc ttttgaacaa gtatctttac cttactggtc gagttgacat gaagcagata 600
 gagaagacaa tccagtatct aatcggatct ggaatggacc ctcgaaagtga aaacaacccc 660
 tatctaggct tcatctacac ttctttcaa gagagagcaa cttcatctc ccatggaaac 720
 accgctagc tgcacaaaga ccacggcgac tttcaactag cacaagtatg tggcatcacc 780
 gctgcagatg agaagcgcca cgaaactgcc tacacaaaaa ttgtcgaaaa gctctttgaa 840
 atcgaccag acggcgctgt tctagcacta gctgacatga tgagaaagaa ggtttccatg 900
 ccagcccact taatgtatga tggcaaagat gacaatctct ttgagaacta ctacgacctc 960
 gctcaacaaa ttggagttta caccgogaag gactacgctg acatcctoga acacctcgtt 1020
 aatcgctgga aagtcgagaa tttaatgggt ctgtctggcg agggacataa ggctcaagat 1080
 ttcgtatgtg ggttgcccc gaggatcagg aaactcgggg agagagctca gtcgctaagc 1140
 aaaccggtat ctcttgtccc ctccagctgg attttcaaca aggaattgaa ggtt 1194

5 <210> 42
 <211> 2077
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Contig de ADNc de FATB-2

<400> 42

ES 2 532 351 T3

gagggaaaca	aggaagcgaa	atgacacaat	agtccttctt	ccctgtttcc	actttccagg	60
ttttctcctt	ctcgtttggt	gagcgctttt	ctctccctct	ccctcttctt	cactcagtea	120
gctgccgtag	aaattcatta	tggtagcaac	agctgcaact	tcctcatttt	tcctggttac	180
ttcaccctcg	ccggactctg	gtggacatgc	aaagttactc	aaaataatcg	ctggccctat	240
cacattattg	ttaatattct	tccttctttt	accttctact	ttccgaatcc	agaaaacacc	300
acaacaccac	ccagaattgt	tgggttccat	tctcaaaaaca	gagaacaaga	agaagaagaa	360
agagagagag	tgaaaacggg	aaaagcaaaa	agttgtttct	gtgattgatt	ctctgcaacc	420
gaatcatcat	cagccacttc	ttcccgtttc	atctctccca	tttcttcttt	tcttccgctc	480
tggttcagta	aggcgaagag	ggttaacggt	attcataatg	gttgcaacag	ccgctacggc	540
gtcgtttctt	cccgtcctt	tgccagacgc	tggaaaaggg	aaaccaaga	aactgggtgg	600

ES 2 532 351 T3

tgggtggcggg ggcgggtggcg gttctgtgaa cctcggagga ctcaaacaga aacaaggttt 660
 gtgcgggtggc ttgcagggtca aggcaaacgc acaagcccct ccgaagaccg tggagaaggt 720
 tgagaatgat ttgtcgtcgt cgtcctcgtc gatttcgcac gccccgagga ctttcatcaa 780
 ccagttacct gactggagca tgcttctggc cgccatcacc accgtgttcc tggcggcgga 840
 gaagcagtggt atgatgctgg attggaagcc gcgggcggcc gacatgctca ttgaccctt 900
 tgggattggg aagatcgtgc aggatgggct tgtgttcagg cagaacttcc ccattaggtc 960
 ctatgagatt ggcgccgata aaaccgcgtc tatcagagact ttaatgaatc atttgcagga 1020
 gactgcactt aatcatgtta agactgctgg gcttcttggg gatggatttg gttccacgcc 1080
 tgaaatgtgc aaaaagaacc tgatatgggt ggtgactaag atgcaggttg tggttgataa 1140
 atatcccaca tgggggtgatg ttgttcaagt agacacttgg gtatctgcat caggggaagaa 1200
 tggtatgtgt cgtgattggc ttgtgcgtga cgcgaaatct ggtgaaatct tgacaagagc 1260
 ctccagtgtt tgggtcatga tgaataaagt gacaagaaga ctgtctaaaa tccccgaaga 1320
 agtcagggca gagataagct cttattttgt ggactctgct ccagttgtgc cagaggataa 1380
 cagaaaacta accaaacttg atgaatccgc taatttcatt cgcactgggt taagtcccag 1440
 atggaatgat ctagatgtga atcagcatgt taacaatgtg aagtatgttg ggtggattct 1500
 ggagagtgtt ccacagccac ttttgagag ccatgagctg tgtgccatga cattggagta 1560
 caggaggagg tgtggcagga acagtgtgct ggattccctc tctgatctct ctgggtgctga 1620
 tgtaggaaac ttggcagatg gtggatttt tgagtgcaag cacttgcttc gacttgatga 1680
 tgggtgctgag attgtgaggg gtaggactca atggaggccc aaacctttaa gcagcaactt 1740
 tggatcatgt ttgagtcagg ttccagttcc agcagaaagc acctgaatct tatcttattg 1800
 attggcatca ctggaggagg agtggcataa attcatagag agctttgctt gtttttatca 1860
 aatctacgta tcttaaaata tatataaaag aaagtgtgtt actttggcta aaaaagggga 1920
 ggggaagtag aaagtaaaaa aaaaaaaaaa aatctcgtc tcatgatttt gtaattaa 1980
 aatagctcct agcactactt tctoctacct gctccatttt ctgtttcact tatggttatg 2040
 ctgctgcttg gtgtcatcaa tatttaattg tttcatc 2077

<210> 43
 <211> 4634
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<400> 43

ggaacaagg aagcgaatg acacaatagt ccttcttccc tgtttccact ttccagttt 60
 tctccttctc gtttggtgag cgcttttctc tccctctccc tcttcttcac tcagtcagg 120
 acgctaacaa atctgctatt caatcaattc ctctttctct ctgatctacg tacgtgtccg 180

5

10

ES 2 532 351 T3

caaactgcac ctccaactctc cactcattcc atctaatctt cccttttcgc ttcagagatc 240
 caactcctca tataattcaa gacaaaatcc cgcgttttct gcatttctag acgttctacc 300
 ctacaagggtt ctcgattctt cttttttctt tttttttaga ctattattat tttaaaaaaa 360
 taaaaataat aatgagagct ggatgcgtct gttcgttgtg aatttcgagg caatgggggtt 420
 ctgattttcg ttacagattg cattgtttgc tttcctctc tccgttttt ctttgcoctg 480
 tttttatfff taattttggg gatgtttctg gtcttgcoctt tgtttctgca tttttttttc 540
 ggtttgcgat gttttcagat ctgcgctggc ttatacgacg aatttgttct tattcgtgac 600
 tttccgcttg attgacctgt tttacctctg gaatctcaca cgtgatcaaa taaggctgct 660
 attttagttg aagtagaatc tatacacact ttgtagcatt ctttttacga tcaactacac 720
 ggggtggttt taatcaggct ttttttggg gggataaac atcttctcc tcgattcttt 780
 ccgataaaaag ctttaattgga ttataggaag tgggaaacaa tgcgtgggag ctctttgggt 840
 tgtttttcgt aggttaaact tgcaggttta agttctgaat caggagtcc aaatatagag 900
 gctgggggca taaaaaaga gaattctatg gatctgttct gaaattggag ccaactgtttc 960
 gagttgctat ttttttaacta gtattaataa gaacaagttt gctttttatt ttacattttt 1020
 tcccgtttct tttgcaaaa gtatttatga tcaactctctt ctgtttgtga tattacttat 1080
 aagtgcgtg ctgtaattat ttgttattg gggggaagta taatttttg gtgaacttgg 1140
 agcgttttta gttagattga tttctcgata tcatttaagg tttaggttga ccccttocac 1200
 tegtgttgg ttgattgtt ttttttttt atctcttctc atttacagt cttctttgcc 1260
 tatttttttc attatcccct ttcgtgaaag gtaggagaag aaaaacaatg acttgcgtaa 1320
 attttgcatt cagctgccgt agaaattcat tatgggtggca acagctgcaa ctctcatcatt 1380
 tttcctgtt acttcaccct cgcggtctc tgggtggacat gcaaagttac tcaaaaataat 1440
 cgctggccct atcacattat tgtaaatatt ctccctctt ttaccttcta ctttccgaat 1500
 ccagaaaaca ccacaacacc acccagaatt gttgggttcc attctcaaaa cagagaacaa 1560
 gaagaagaag aaagagagag agtgaaaacg ggaaaagcaa aaagtgttt ctgtgattga 1620
 ttctctgcaa ccgaatcacc atcagccact tcttcccgtt teatctctcc cttttcttct 1680
 tttcttccgc tctggttcag taaggcgaag agggttaacg ttattcataa tggttgcaac 1740
 agccgctaog gcgtcgtttc ttcccgtgcc tttgccagac gctggaaaag ggaaacccaa 1800
 gaaactgggt ggtggtggcg gtggcgggtg cggttctgtg aacctcggag gactcaacaa 1860
 gaaacaaggt ttgtgcggtg gcttgcaggt caaggcaaac gcacaagccc ctccgaagac 1920
 cgtggagaag gttgagaatg atttgtctc gtctctctc tcgatttcgc acgccccgag 1980
 gactttcacc aaccagttac ctgactggag catgcttctg gccgccatca ccaccgtgtt 2040

ES 2 532 351 T3

cctggcggcg gagaagcagt ggatgatget ggattggaag ccgcggcgcc ccgacatgct 2100
 cattgacccc tttgggattg ggaagatcgt gcaggatggg cttgtgttca ggcagaactt 2160
 ccccattagg tccatgaga ttggcgccga taaaaccgcg tctatcgaga ctttaatgaa 2220
 tcatttgcag gtcagctttt gcaaaaaatt gctgagaatt gcattcagca atcacgataa 2280
 atataacttt taataaatta ttatagaagt taagtaactt atcacgggtt gtcaacaaaa 2340
 atttagagaa taattgcata ggacaaaact tacctacagt tcgtttgaca ttttttgtgt 2400
 cgtttttaa tcaaaaattaa aattttatct tggtaatttg cagattatta gatacaactc 2460
 caatttcgat caaagaacaa tgccaaaaac acctatggaa tctaagtttt gtgcaattgc 2520
 ttattgatga ttttatttta ttgcctaaat tgtctgtttt ccaaacagga gactgcactt 2580
 aatcatgtta agactgctgg gcttcttagt gatggatttg gttccacgct gaaatgtgca 2640
 aaaagaacct gatatgggtg gtgactaaga tgcaggttgt ggttgataaa tatccacat 2700
 ggtaagttgg tgtgactaag aagaaccttt ttgatgtgtg aagaattgca aaggcgtcca 2760
 tgctcagctg tgaatcttc ttttgcctta ctcatcttta ctttgacttt atatagtatc 2820
 tggttgaatt atttgtact tctgcatttg tttctgtcac ttgtgctttt ttgtttcaca 2880
 aaattggtat gatagttagg aacttgggat taaaggcatg tttggaatat attgtgattg 2940
 tgaattattt ttaaaaatat tttcactttt caaaatctat ctcatgaatc tgtaaaaata 3000
 agaataaaaa ataaaactac tgtaatgtgt ataaaaaatt cttcttggat ggtaattgat 3060
 ctgataagca catgcttttt acataatgaa ttatatgaag tcccttgcoct taagtctggt 3120
 agactgggta tgagatatgg tagtaaatc tttttacatt ccgtacattt ttttgcatat 3180
 ttctgtctta ttattgtaa atgttggatg catatacagg ttttcaaaag aagcaactta 3240
 taccatgtgc cttttctgc attttggct gttcgagaat aatctcttta gtaaattctg 3300
 aatctgttca tctgaagttg agtgaatota tatttgettc aggggtgatg ttgttcaagt 3360
 agacacttgg gtatctgcat caggaagaa tggatgtgt cgtgattggc ttgtgcgtga 3420
 cgccaaatct ggtgaaatct tgacaagagc ctccaggtag atatcagttt caggaatcct 3480
 tttttctgt tgcctataga catgttttga agagtttttc tgaatctgaa tgtttctctc 3540
 tggtgatttg gactgcttt taatctcacg aggctgtgtg aagttatcta ttatcatatt 3600
 tactttctct taatacacca ctattgaaag gcaattcatt acagatttaa gcatacaaaa 3660
 ttttgtgat gataattttt taatctacca acagtatcta atatcttctt aatttgttat 3720
 taagtaccag ctttcaactt gtgtacatgt tgcaccttgg tgctacgaac ttataagcat 3780
 tttctgattg gttgagtttg attttgattt tgatgttatg cagtgtttgg gtcatgatga 3840
 ataaagtgac aagaagactg tctaaaattc ccgaagaagt cagggcagag ataagctctt 3900
 attttgtgga ttctgtcca gttgtgccag aggataacag aaaactaacc aaacttgatg 3960

ES 2 532 351 T3

```

attcagctaa tttcattcgc actggtttaa gtcccagatg gaatgatcta gatgtgaatc 4020
agcatgttaa caatgtgaag tatgttgggt ggattctgga gagtgctcca cagccacttt 4080
tggagagcca tgagctgtgt gccatgacat tggagtacag gagggagtgt gccaggaaca 4140
gtgtgctgga ttccctctct gatctctctg gtgctgatgt aggaaacttg gcagatggtg 4200
gattttttga gtgcaagcac ttgcttcgac ttgatgatgg tgctgagatt gtgaggggta 4260
ggactcaatg gaggcccaaa cctttaagca gcaactttgg tcatgttttg agtcaggttc 4320
cagttccagc agaaagcacc tgaatcttat cttattgatt ggcatcactg gaggaggagt 4380
ggcataaatt catagagagc tttgcttggt tttatcaaat ctacgtatct taaaatatat 4440
ataaaagaaa gtgtgttact ttggctaaaa aaggggaggg gaagttagaaa gtaaaaaaaaa 4500
aaaaaaaaat ctgctctca tgattttgta attaaaaaat agctcctagc actactttct 4560
cctacctgct ccattttctg tttcacttat ggttatgctg ctgcttggtg tcatcaatat 4620
ttaattgttt catc 4634

```

5

```

<210> 44
<211> 1215
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 44

```

ES 2 532 351 T3

gtacgctaac aaatctgcta ttcaatcaat tctcttttct ctctgatcta cgtaoigtgc 60
 cgcaaaactgc acctccactc tccactcatt ccatctaate ttcccttttc gcttcagaga 120
 tccaactcct catataattc aagacaaaat cccgcgtttt ctgcatttct agacgttcta 180
 cctacaagg ttctcgattc ttcttttttc ttttttttta gactattatt attttaaaaa 240
 aataaaaaata ataatgagag ctggatgcgt ctgttcgttg tgaatttcga ggcaatgggg 300
 ttctgatttt cgttacagat tgcattgttt gctttcctcc tctccgtttt ttctttgcct 360
 tgtttttatt ttttaatttg gggatgtttt cggctctgcc tttgtttctg cttttttttt 420
 tcggtttgcg atgttttcag atctgcgctg gcttatacga cgaatttggt cttattcgtg 480
 actttccgct tgattgacct gttttacctc tggaaatcct cacgtgatca aataaggctg 540
 ctattttagt tgaagtagaa tctatacaca cttttagca ttctttttac gatcacttac 600
 acgggtgggt tttaatcagg ctttttttgt gggggataaa acatcttctc cctcgattct 660
 ttccgataaa agcttaattg gattatagga agtgggaaac aatgcgtggg agctctttgg 720
 tttgtttttc gtaggttaaa cttgcagggt taagttctga atcaggaggt ccaaataatag 780
 aggctggggg cataaaaaaa gagaattcta tggatctggt ctgaaattgg agccactggt 840
 tcgagttgct atttttttac tagtattaat aagaacaagt ttgcttttta ttttacattt 900
 ttcccggtt cttttgcaa aagtatttat gatcactctc ttctgtttgt gatattactt 960
 ataagtgctg tgctgtaatt atttgttatt tggggggaag tataattttt gggggaactt 1020
 ggagcgtttt tagtttagatt gatttctoga tatcatttaa ggttaggtt gaccocctcc 1080
 actcgtttgt ggttgattgt tttttttttt ttatctctta tcatttacag tgcttctttg 1140
 cctatttttt tcattatccc ctttcgtgaa aggtaggaga agaaaaaaa tgacttgcgt 1200
 aaattttgca tgcag 1215

<210> 45
 <211> 338
 <212> ADN
 <213> Glycine max

5

<400> 45

gtcagctttt gcaaaaaatt gctgagaatt gcattcagca atcacgataa atataacttt 60
 taataaatta ttatagaagt taagtaactt atcacgggtt gtcaaaaaa atttagagaa 120
 taattgcata ggacaaaaact tacctacagt tcgtttgaca ttttttgtgt cgtttttaaa 180
 tcaaaattaa aattttatct tggttaattg cagattatta gatacaactc caatttcgat 240
 caaagaacaa tgccaaaaac acctatggaa totaagtttt gtgcaattgc ttattgatga 300
 ttttatttta ttgcctaaat tgtctgtttt ccaaacag 338

10

<210> 46

ES 2 532 351 T3

<211> 641
 <212> ADN
 <213> Glycine max

5 <400> 46

gtaagttggt gtgactaaga agaacctttt tgatgtgtga agaattgcaa aggcgtccat 60
 gctcagctgt gaaatcttct ttgccttac tcatctttac ttgacttta tatagtatct 120
 ggttgaatta ttttgtactt ctgcatttgt ttctgtcact tgtgcttttt tgtttcacia 180
 aattggtatg atagttagga acttgggatt aaaggcatgt ttggaatata ttgtgattgt 240
 gaattatfff taaaaatatt ttcacttttc aaaatctatc tcatgaatct gtaaaaataa 300
 gaataaaaaa taaaactact gtaatgtgta taaaaaatc ttcttggatg gtaattgatc 360
 tgataagcac atgctttttta cataatgaat tatatgaagt cctttgcctt aagtctgtta 420
 gactgggtat gagatatggt agtaaattct ttttacattc cgtacatttt tttgcatatt 480
 tctgtcttat tattgtaaaa tgttggatgc atatacaggt tttcaaaga agcaacttat 540
 accatgtgcc cttttctgca ttttggctcg ttcgagaata atctcttttag taaattctga 600
 atctgttcat ctgaagttga gtgaatctat atttgcttca g 641

<210> 47
 <211> 367
 <212> ADN
 <213> Glycine max

10

<400> 47

15

gtagatatca gtttcaggaa tccttttttt ctggtgccta tagacatggt ttgaagagtt 60
 tttctgaatc tgaatgtttc tctctgggtga ttggcactg cttttaatct caccaggctg 120
 tgtgaagtta tctattatca tatttacttt ctcttaatac accactattg aaaggcaatt 180
 cattacagat ttaagcatac aaaatfttgt tgatgataat tttttaatct accaacagta 240
 tctaataatct tcttaatttg ttattaagta ccagccttca acttgtgtac atgttgcacc 300
 ttgggtctac gaacttataa gcattttctg attgggtgag tttgattttg attttgatgt 360
 tatgcag 367

<210> 48
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador de PCR

25

<400> 48
 ctgttccac ttccagg 18

30

<210> 49
 <211> 17
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de PCR	
	<400> 49	
	cttctcgttt gttgagc	17
10	<210> 50	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 50	
	cagctgcaac ttcac	16
20	<210> 51	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 51	
30	cttccccatt aggtcc	16
	<210> 52	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
40	<400> 52	
	cactaatca tgtaaga	18
	<210> 53	
	<211> 17	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
50	<400> 53	
	gtcgtgattg gcttgtg	17
	<210> 54	
55	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador de PCR	
	<400> 54	
	ctctgctcca gttgtgc	17
65	<210> 55	
	<211> 18	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de PCR	
	<400> 55	
	gcgagggtga agtaacag	18
10	<210> 56	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 56	
	gcacaaacct tgttctg	18
20	<210> 57	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 57	
30	caagaagccc agcagtc	17
	<210> 58	
	<211> 17	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 58	
40	gattcacca gatttcg	17
	<210> 59	
	<211> 17	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 59	
50	gtgcgaatga aattagc	17
	<210> 60	
	<211> 17	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
60	<400> 60	
	ctttctgctg gaactgg	17
	<210> 61	
65	<211> 97	
	<212> ADN	

ES 2 532 351 T3

<213> Glycine max

<400> 61

5 aaaagatttc atttctcctc ttctaggtta ttacgcacca cccaccacgt atccctgaaa 60
 agagagaaaa acacactaag ccaaagccaa agcagca 97

<210> 62

<211> 159

<212> ADN

10 <213> Glycine max

<400> 62

 gttatttatt ggattctagc tactcaaatt actttttttt taatggtacg tttttggagt 60
 tttaacgttt tctgaacaac ttgcaaatta catgcataga gagacaggaa ttcatagtgg 120
 gcctcaatgg aatatttatt tgaaattagt aaggtggta 159

1

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una semilla de soja que muestra una composición de ácidos grasos de aceite de la semilla que comprende un contenido de ácido oleico del 42 % al 85 % en peso de los ácidos grasos totales y un contenido de ácidos grasos saturados del 1,5 % al 8 % en peso de los ácidos grasos totales, en la que dicha semilla comprende adicionalmente un genoma con una secuencia de ácido nucleico que comprende un fragmento de un intrón FAD2-1 de soja que es entre aproximadamente 20 y aproximadamente 420 nucleótidos contiguos de longitud y un fragmento de un gen FATB de soja que es entre aproximadamente 40 y aproximadamente 450 nucleótidos contiguos de longitud.
- 10 2. Una semilla de soja de acuerdo con la reivindicación 1, que muestra una composición de aceite que comprende de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80 % en peso de ácido oleico, aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 1,5 % en peso de ácidos grasos saturados, aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 45 % en peso de ácido linoleico, aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 14 % en peso de ácido linolénico, en la que una cantidad combinada del ácido oleico y el ácido linolénico es de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 90 % en peso de la composición total de aceite, y la semilla comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ADN que comprende un fragmento del intrón FAD2-1 que es entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400 nucleótidos contiguos de longitud, una región codificante de péptido de tránsito en cloroplastos FATB, y 42 nucleótidos contiguos de una UTR 5' de FATB.
- 15 3. Un procedimiento de producción de una composición de aceite que comprende producir semillas de soja de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y procesar la semilla para producir el aceite.

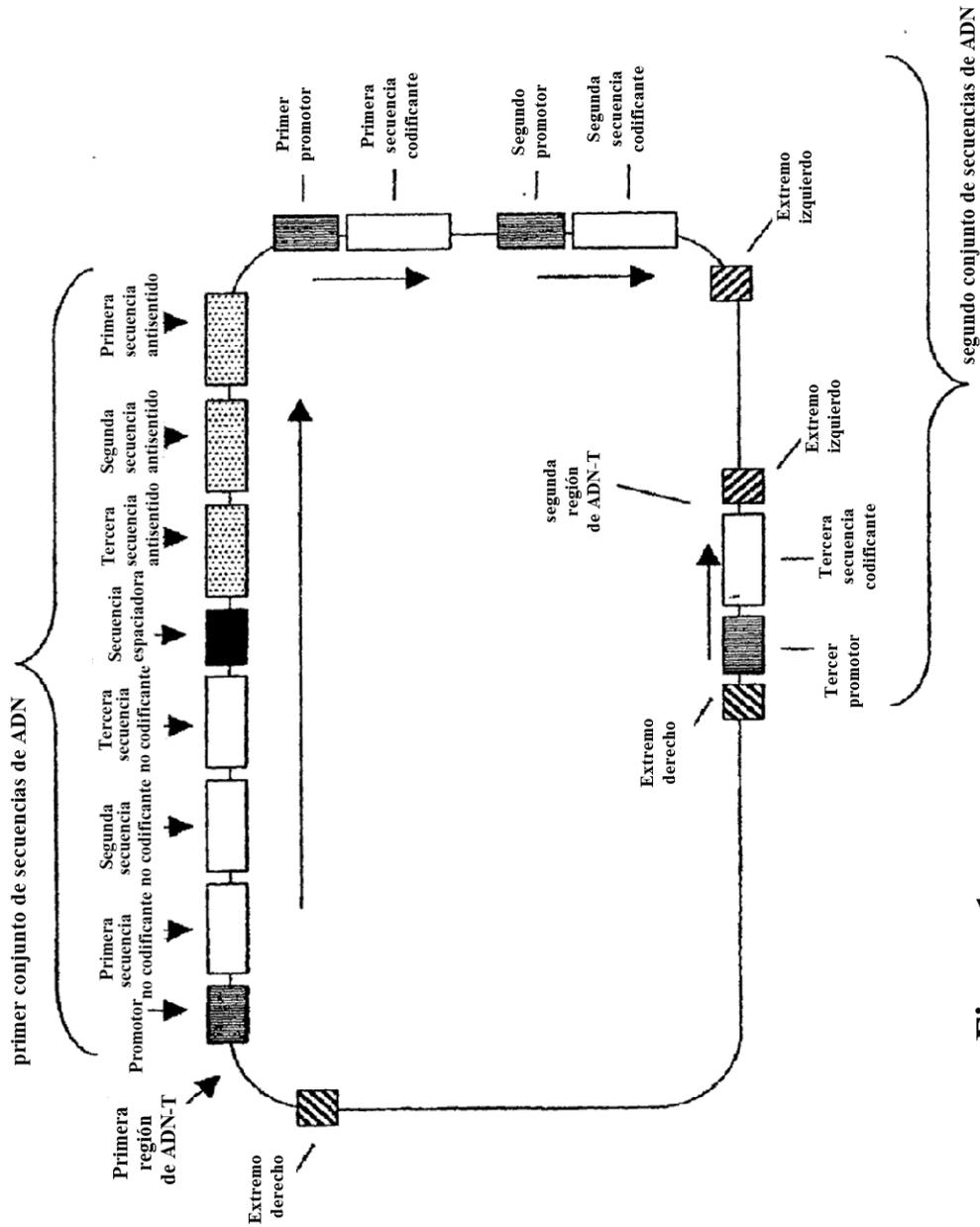


Figura 1

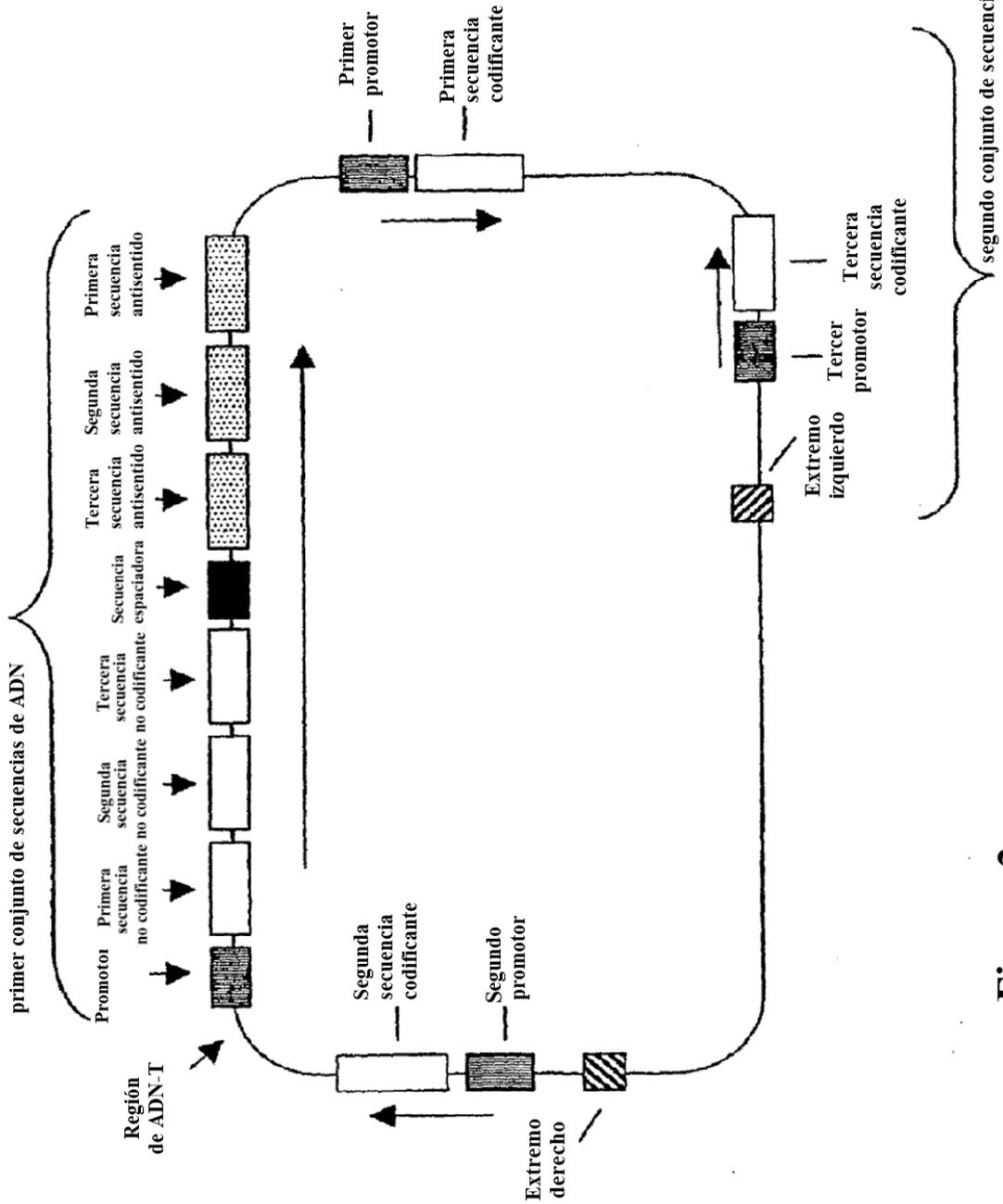


Figura 2

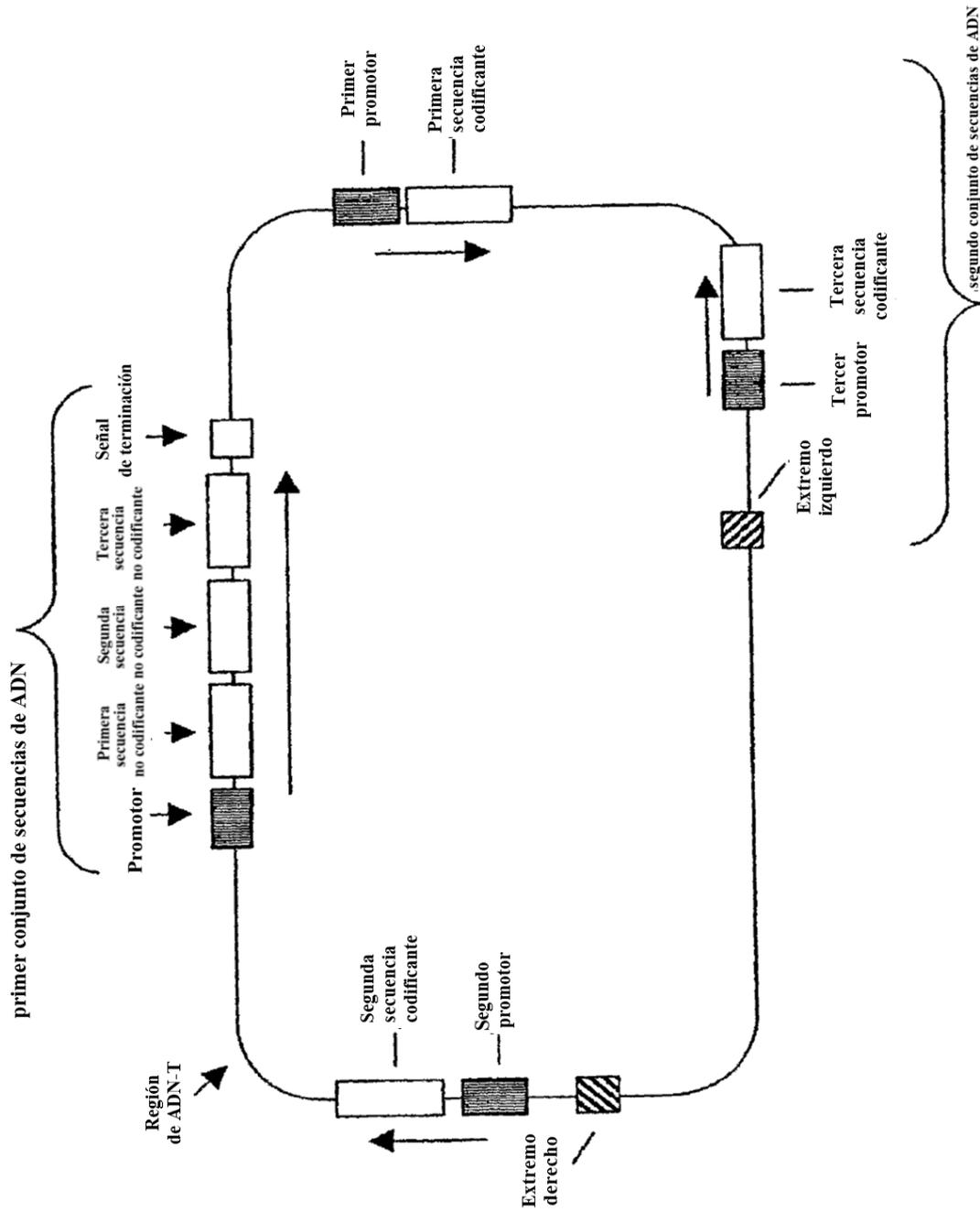


Figura 3

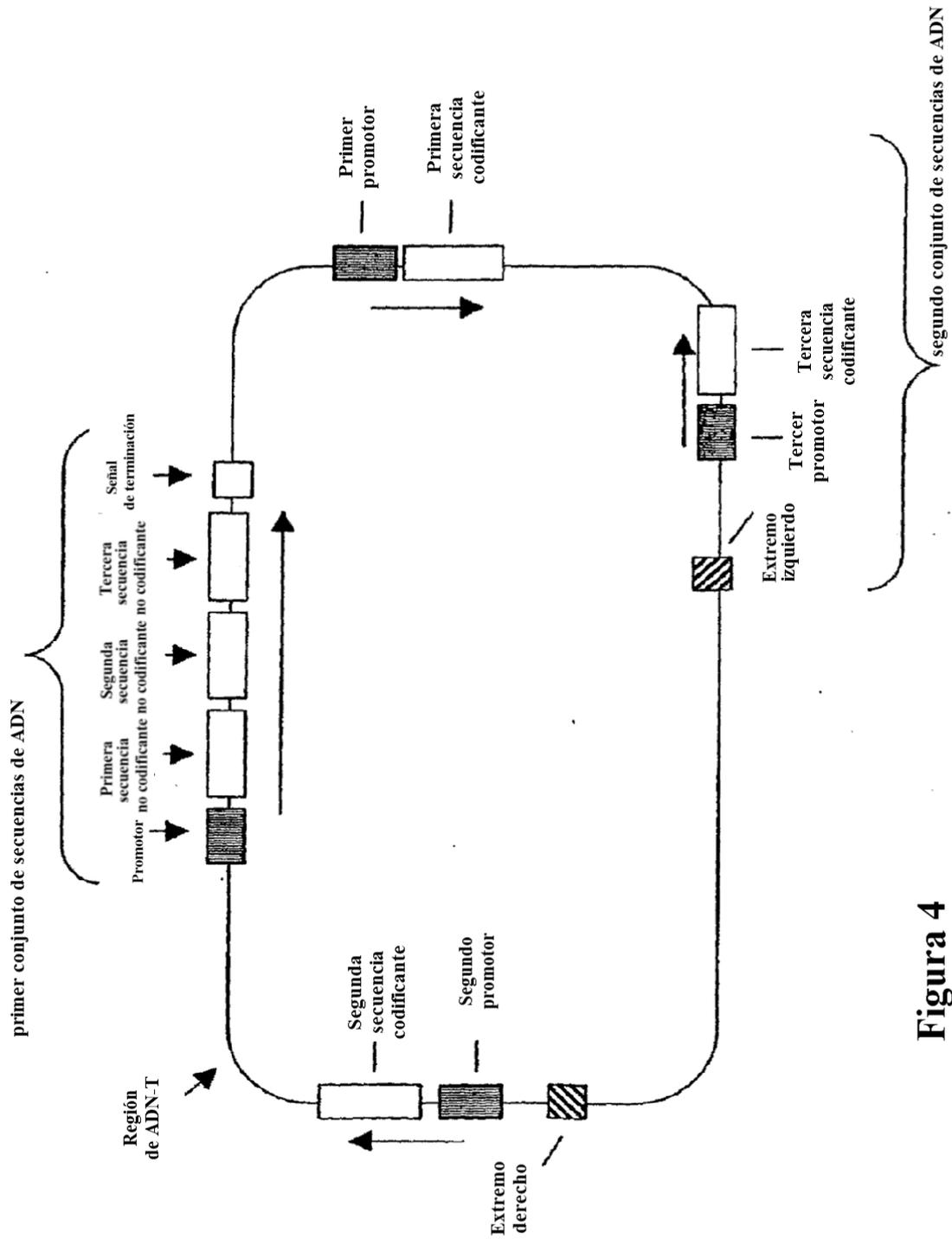


Figura 4

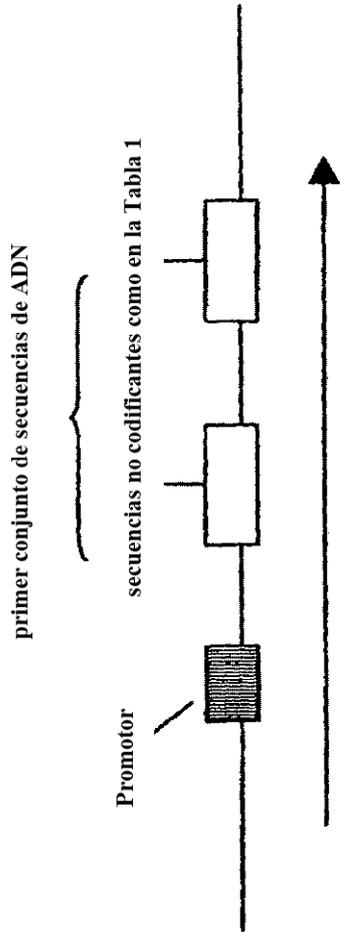


Figura 5(a)

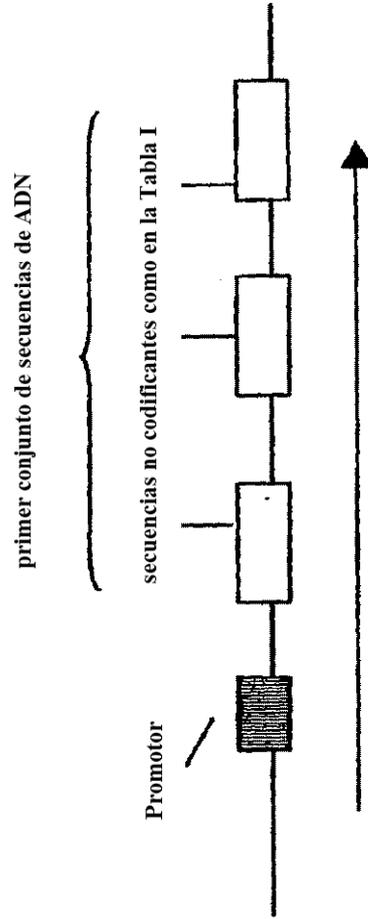


Figura 5(b)

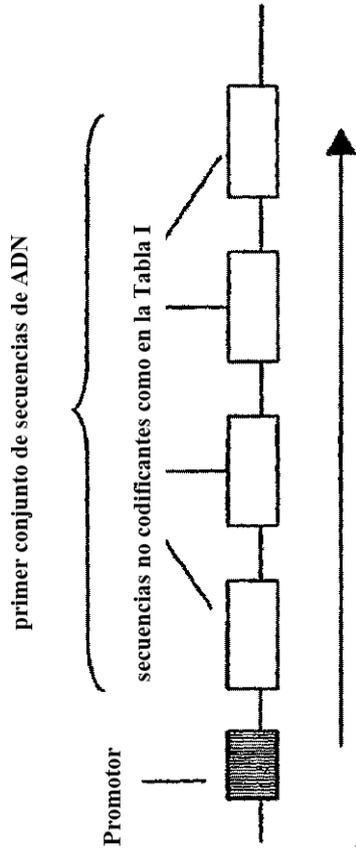


Figura 5(c)

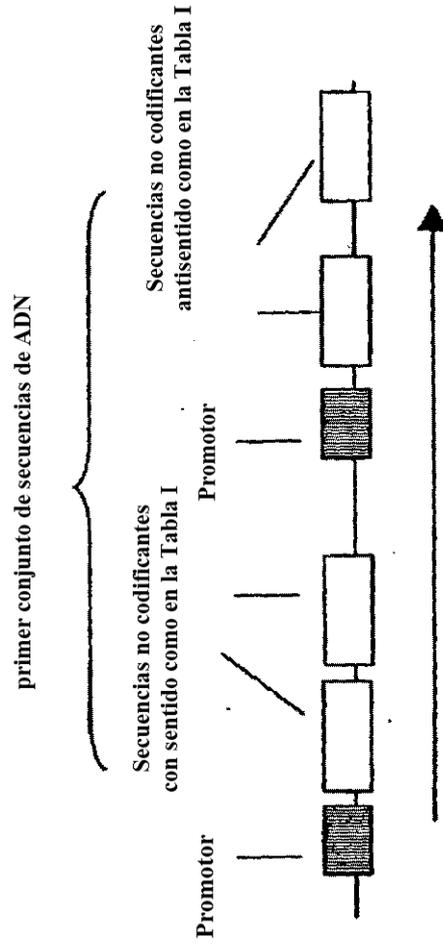


Figura 5(d)

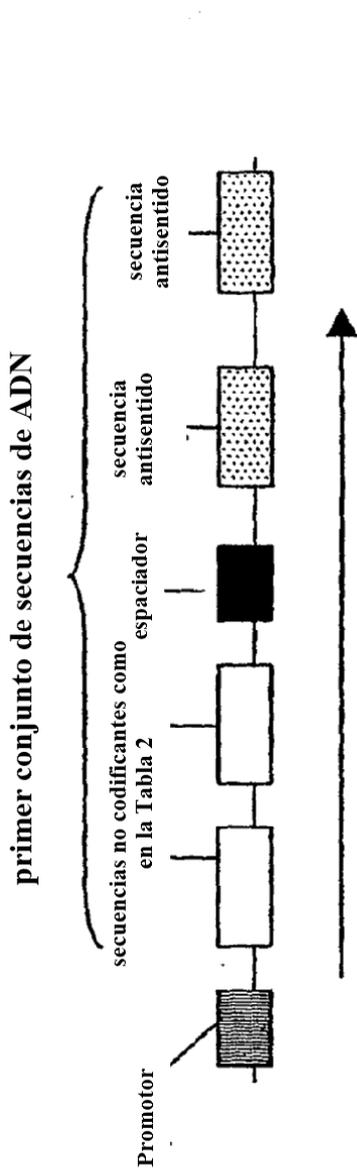


Figura 6(a)

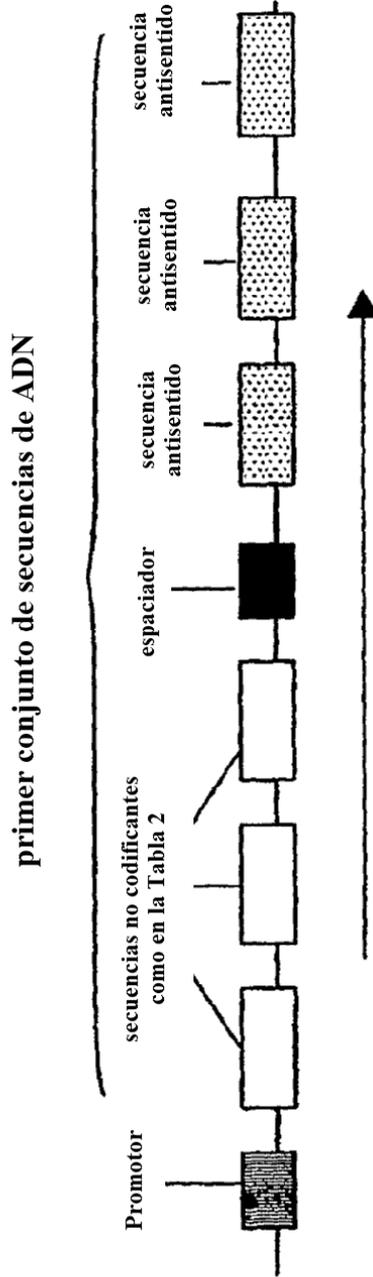


Figura 6(b)

primer conjunto de secuencias de ADN

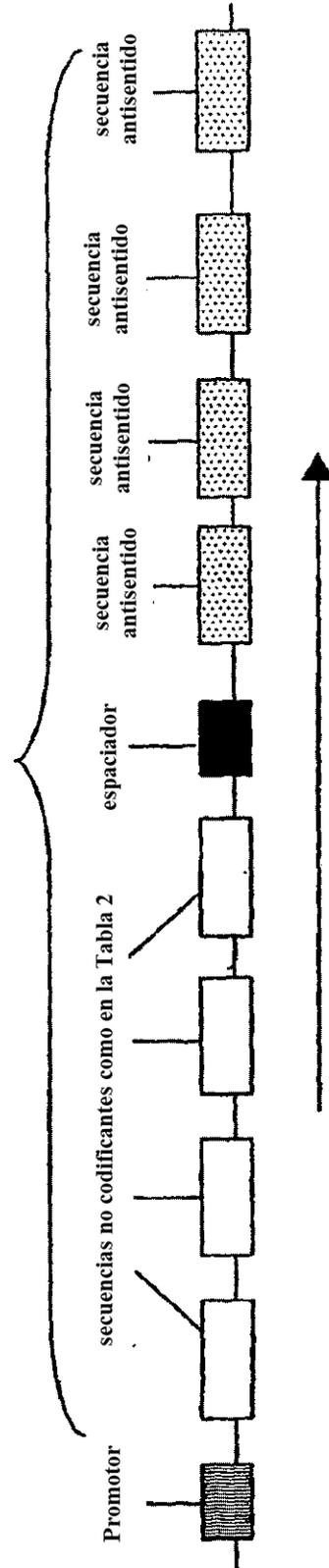


Figura 6(c)

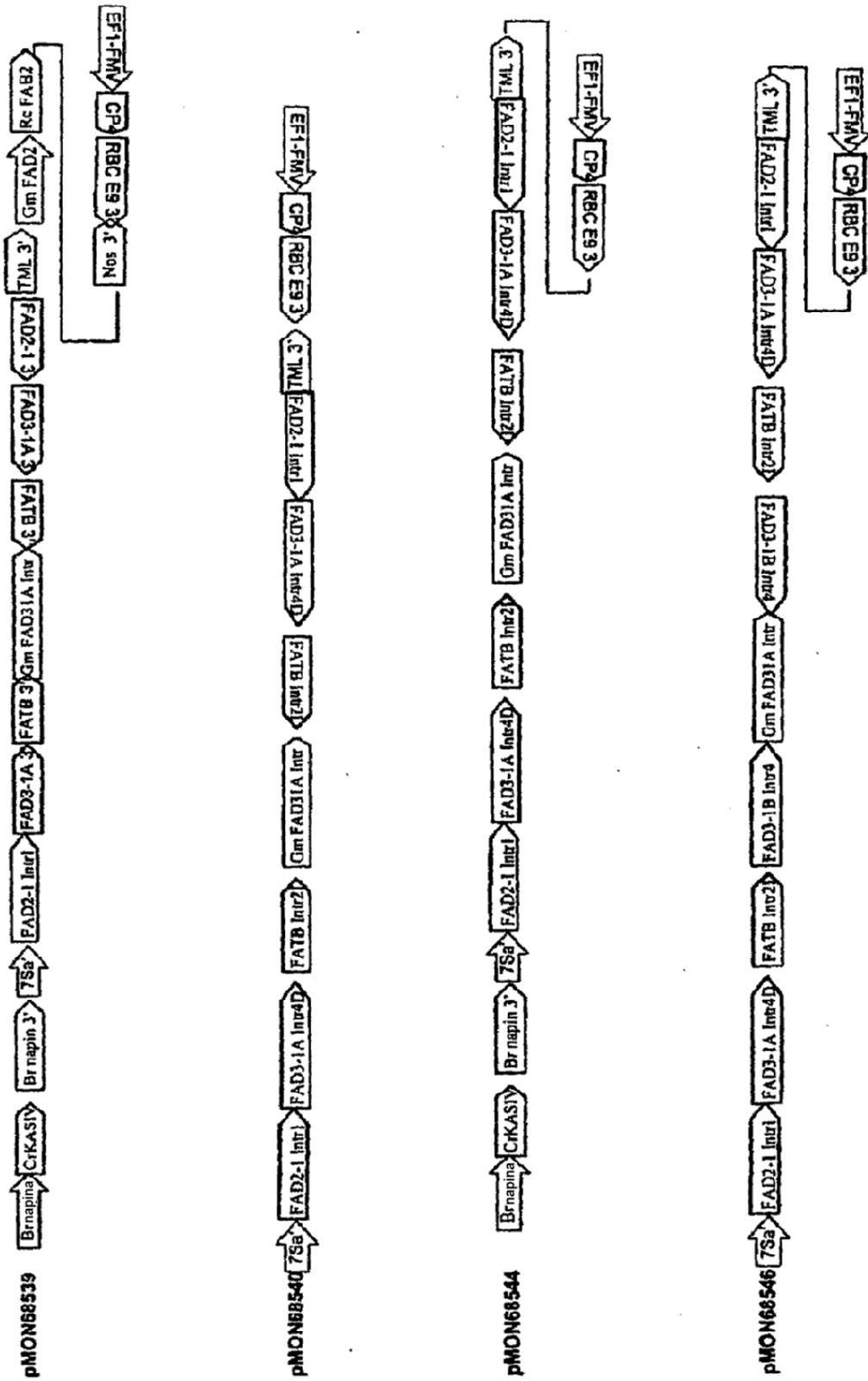


Figura 7

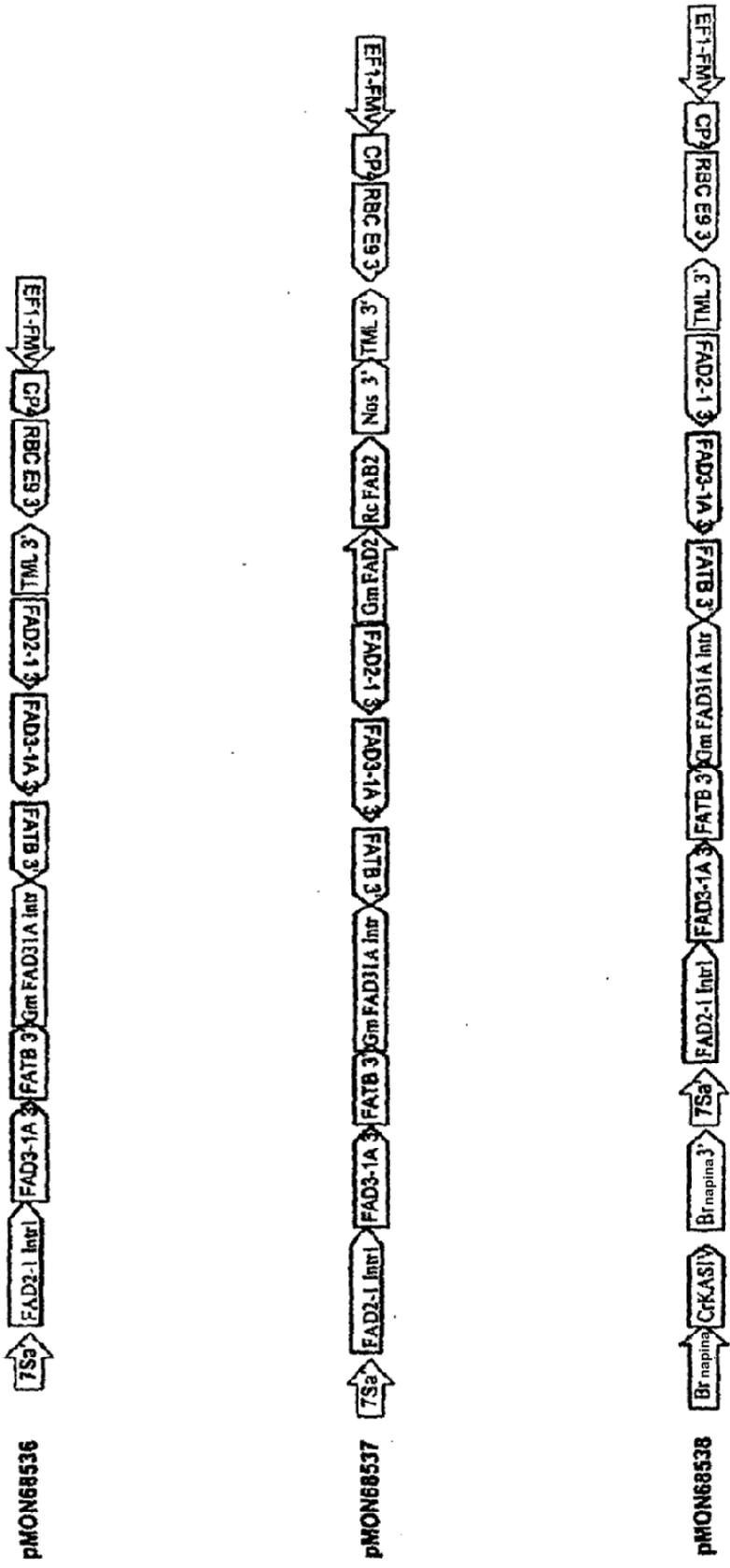


Figura 8

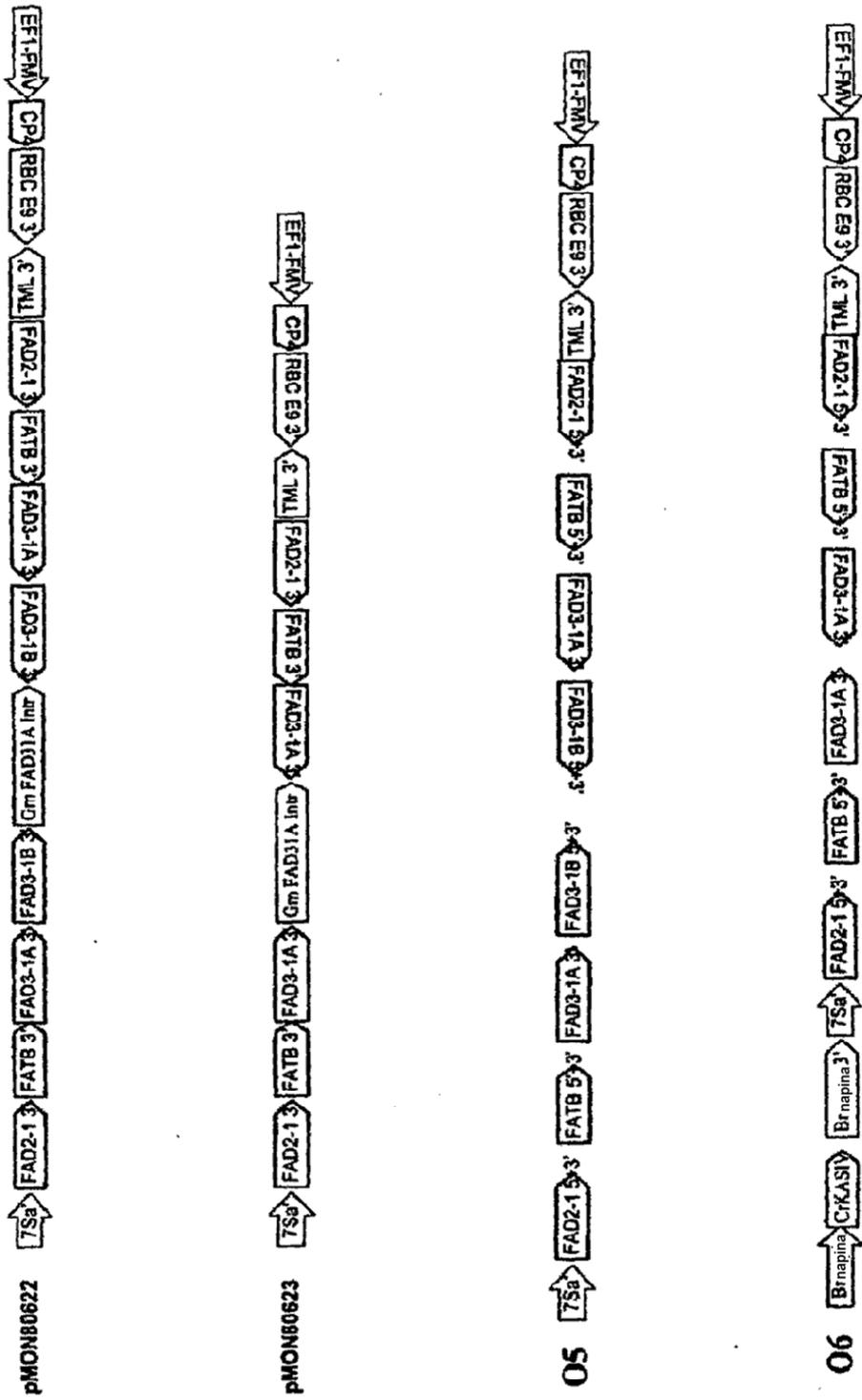


Figura 9

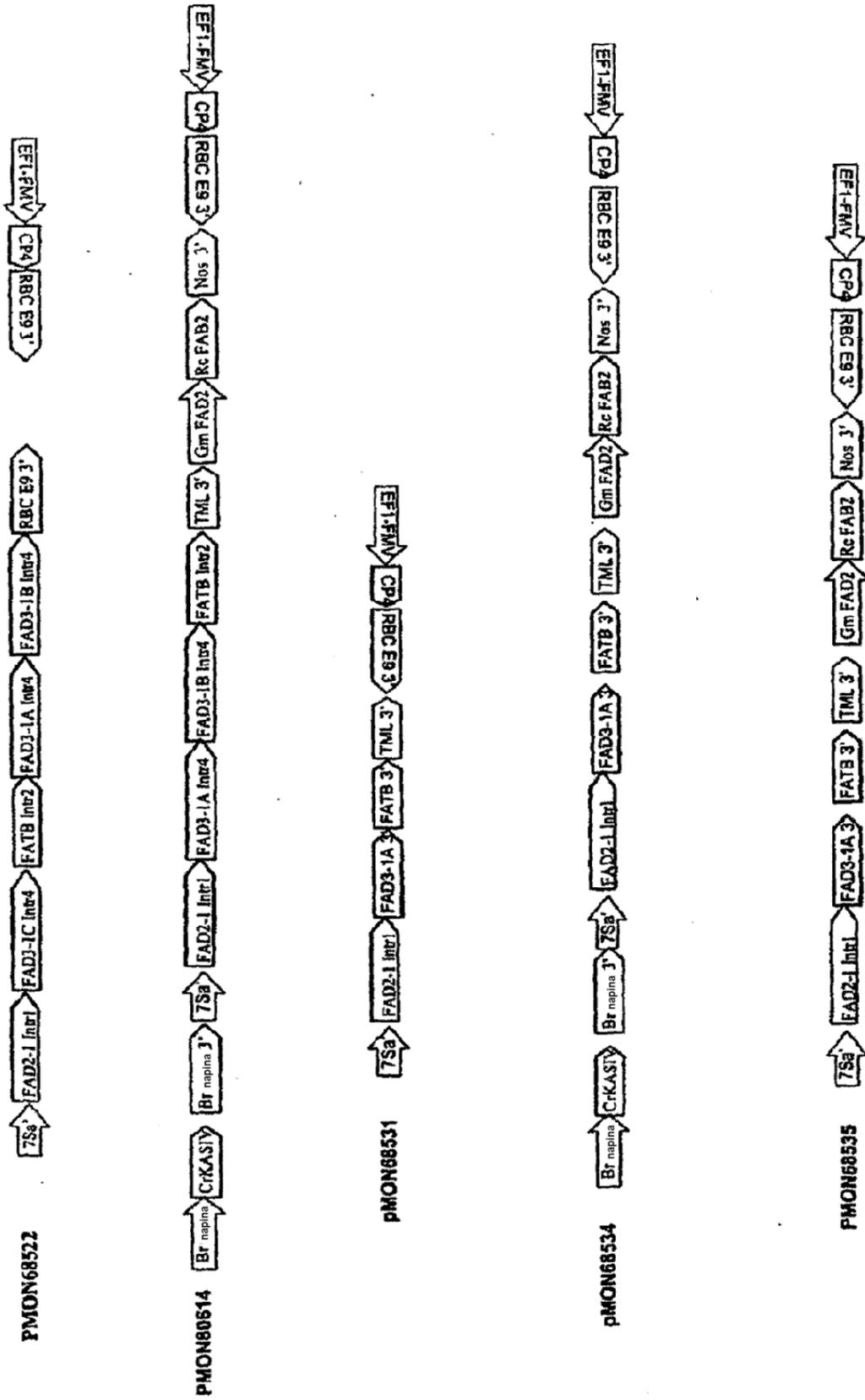


Figura 10

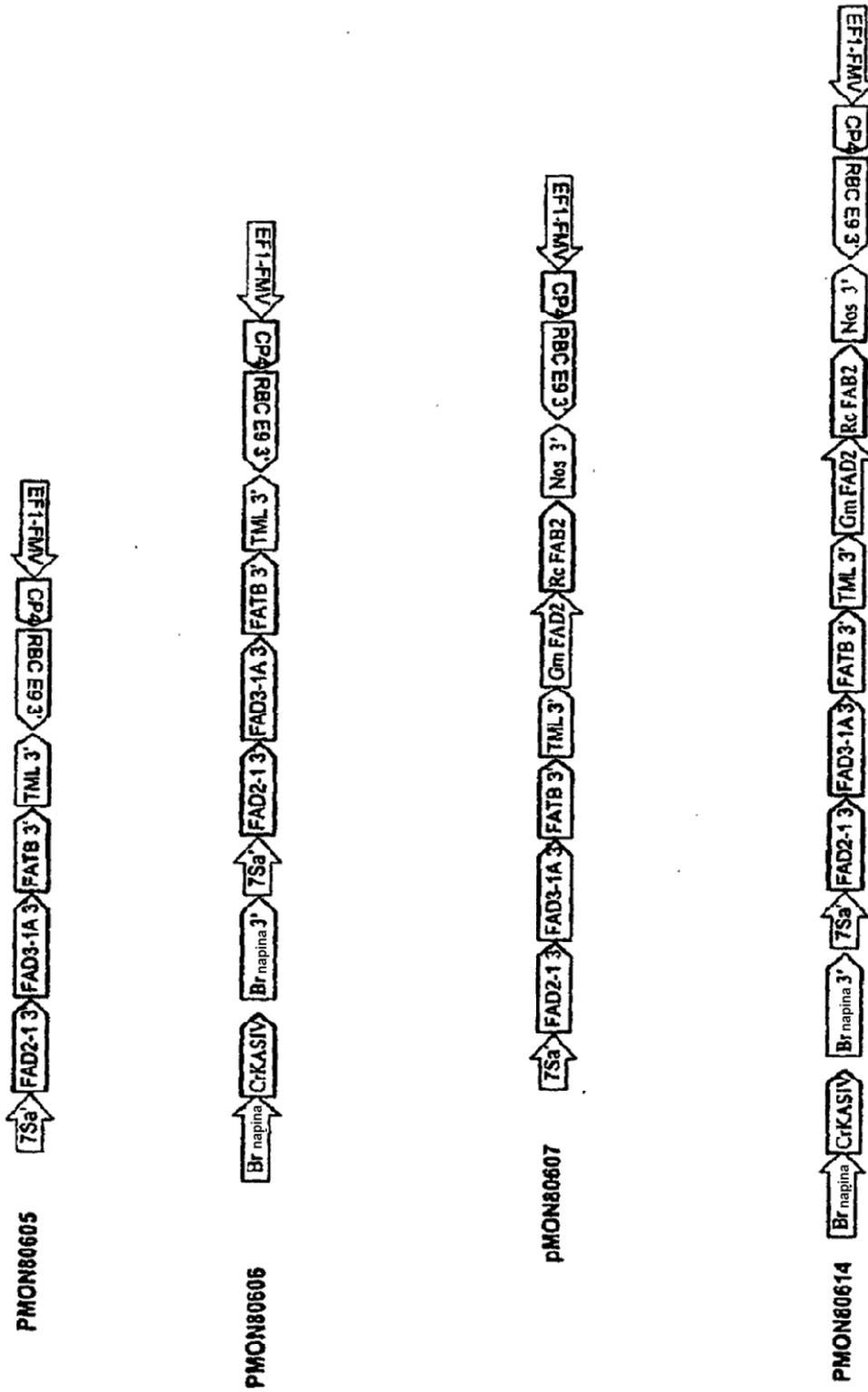


Figura 11

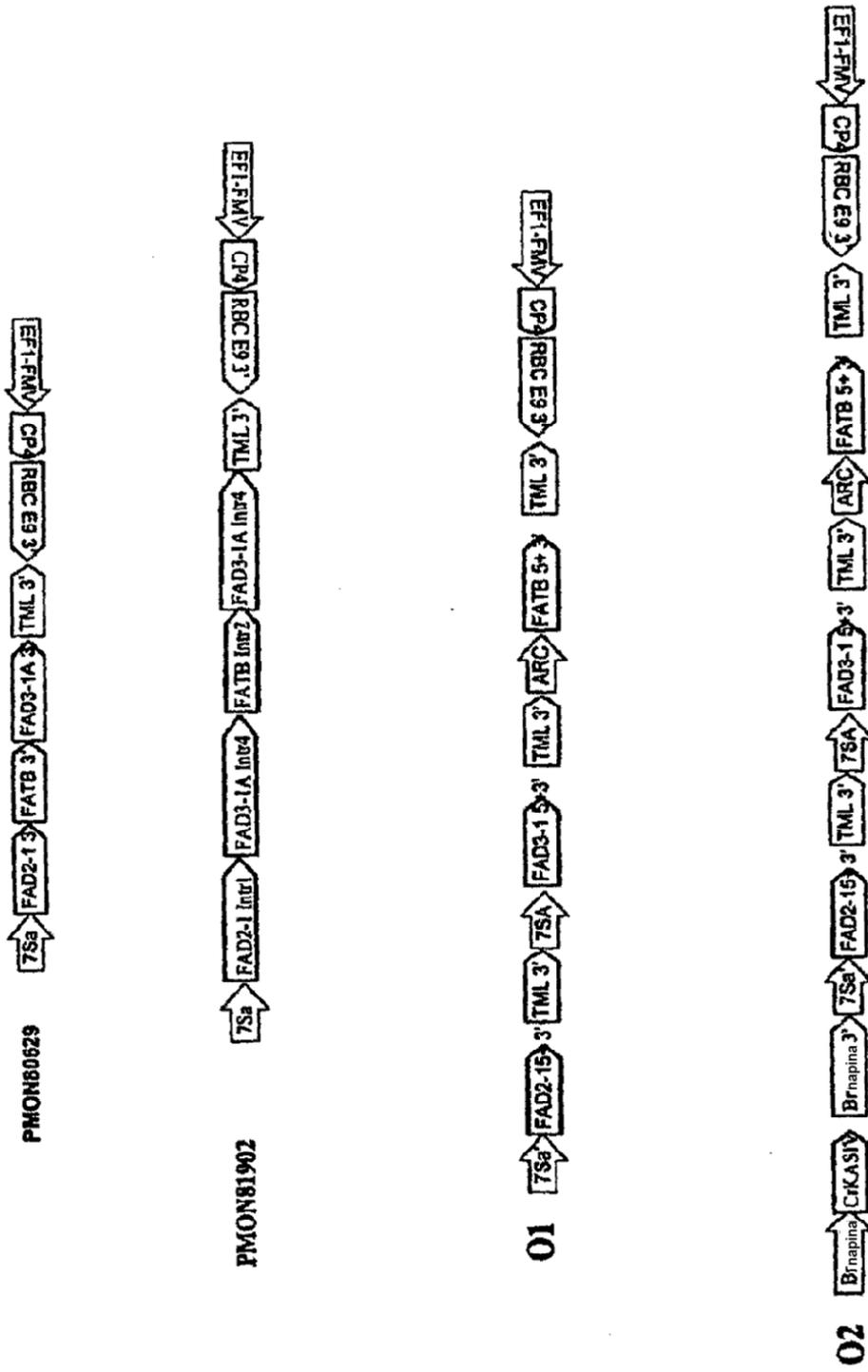


Figura 12

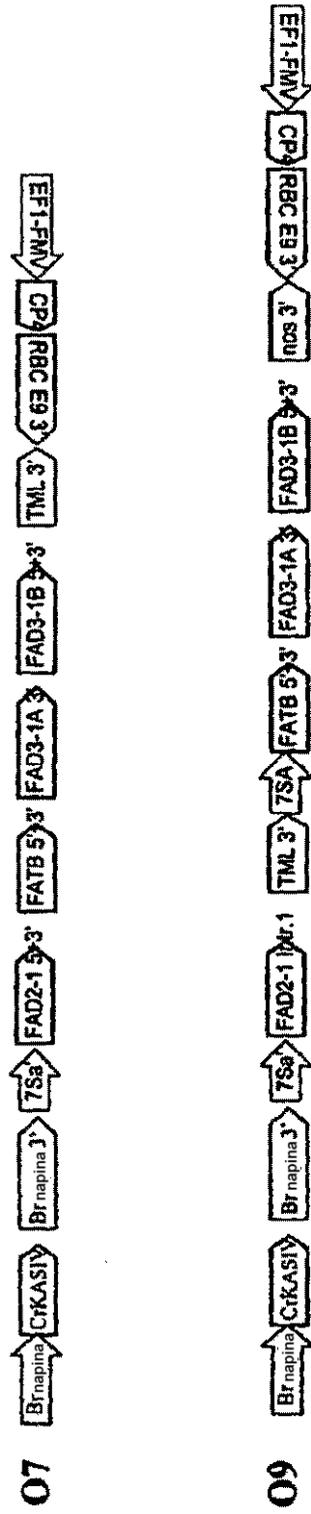


Figura 13

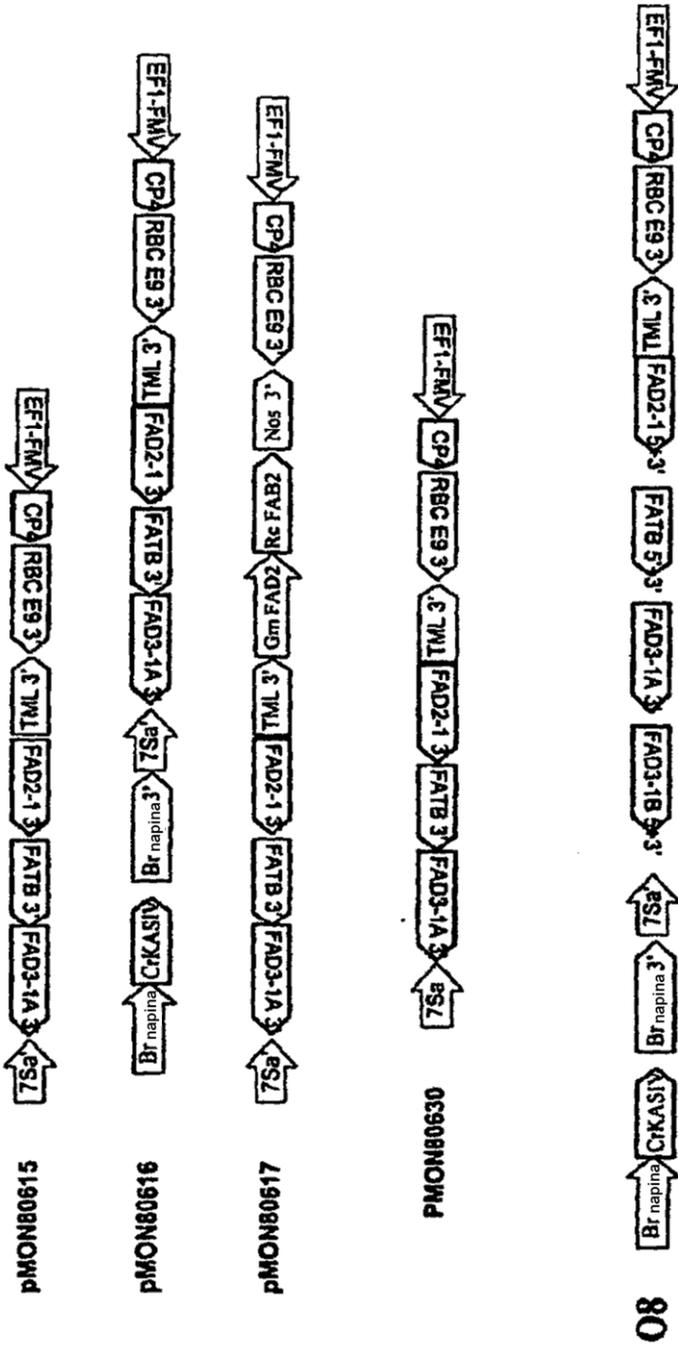


Figura 14

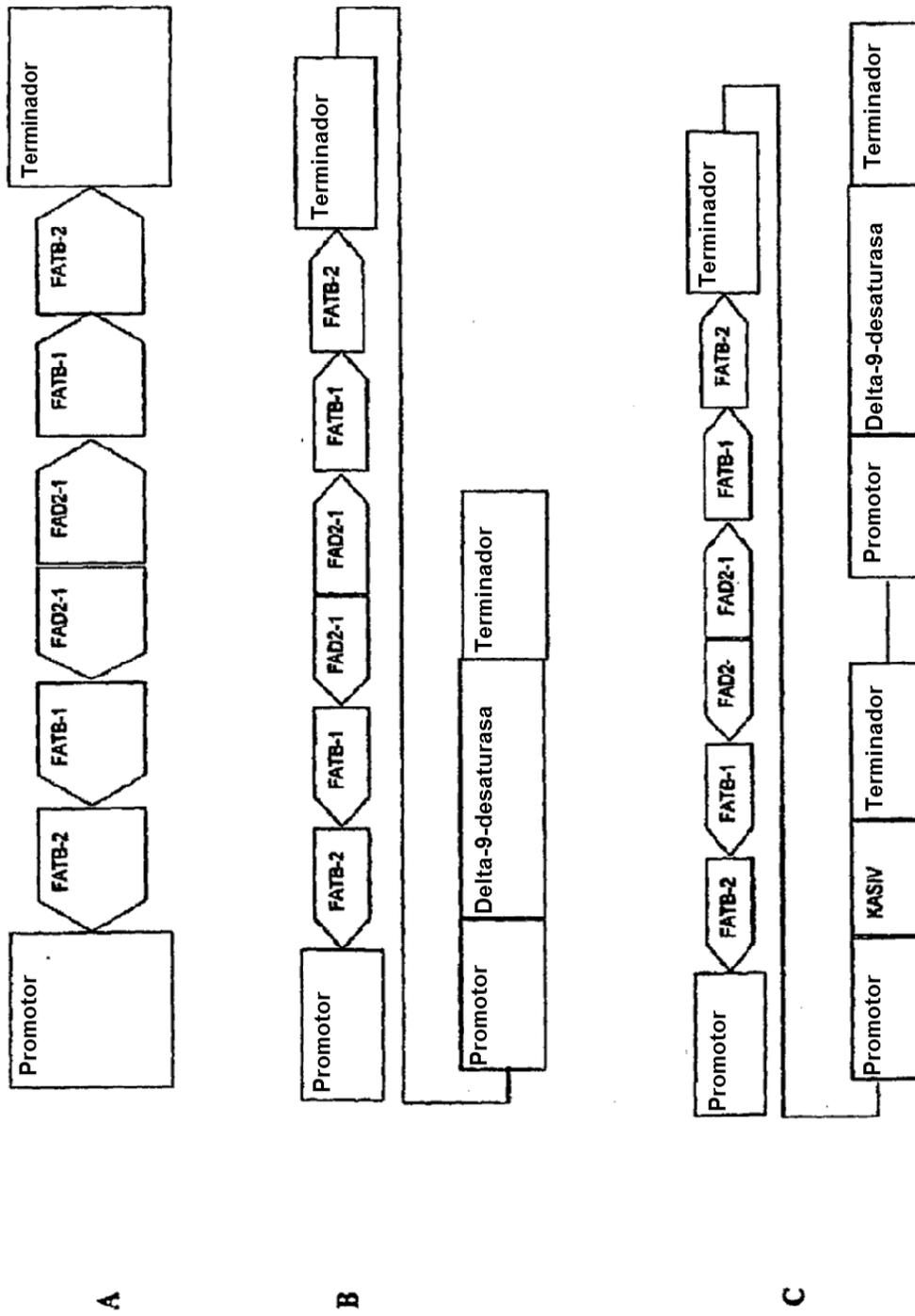


Figura 16

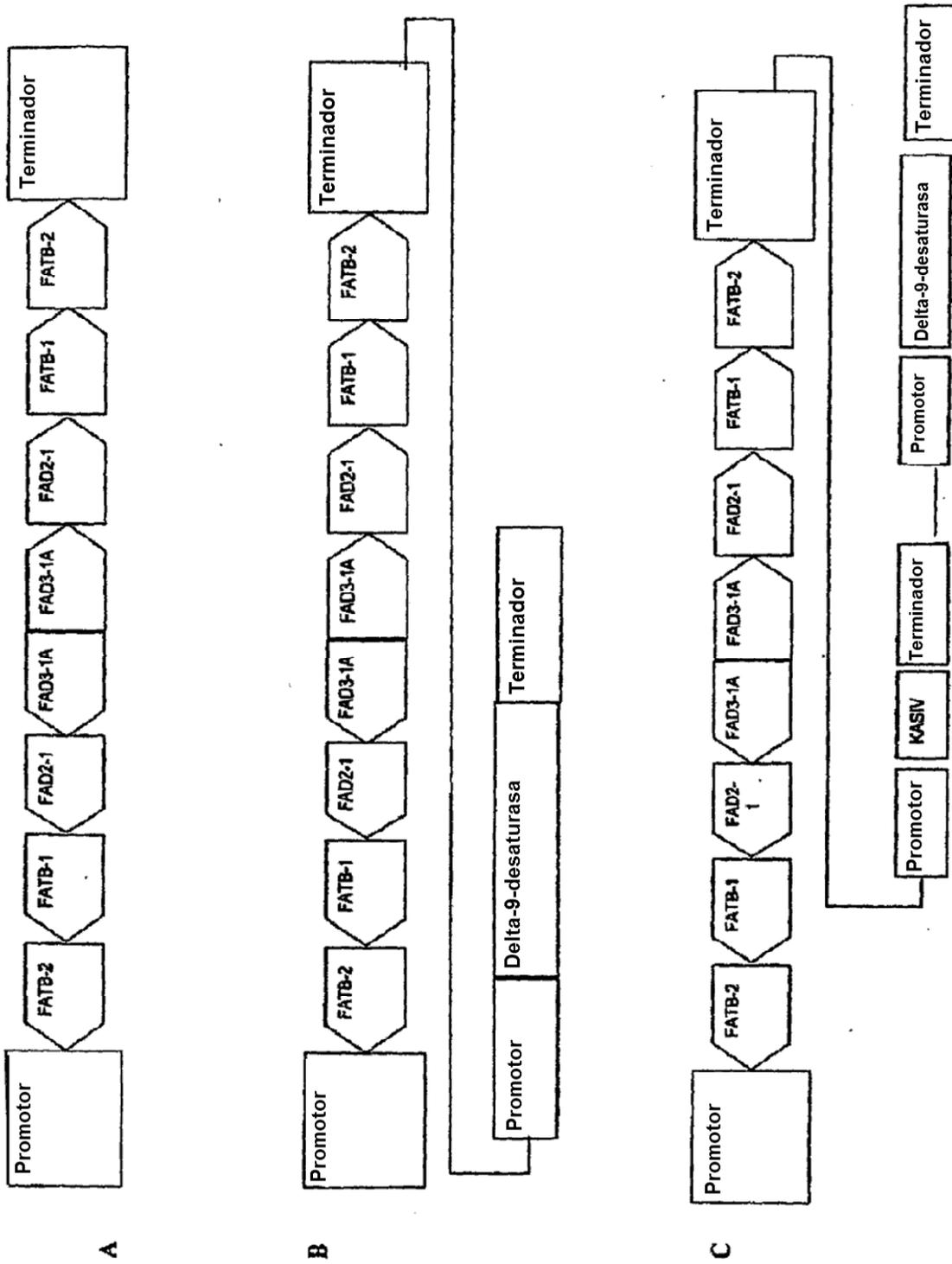


Figura 17

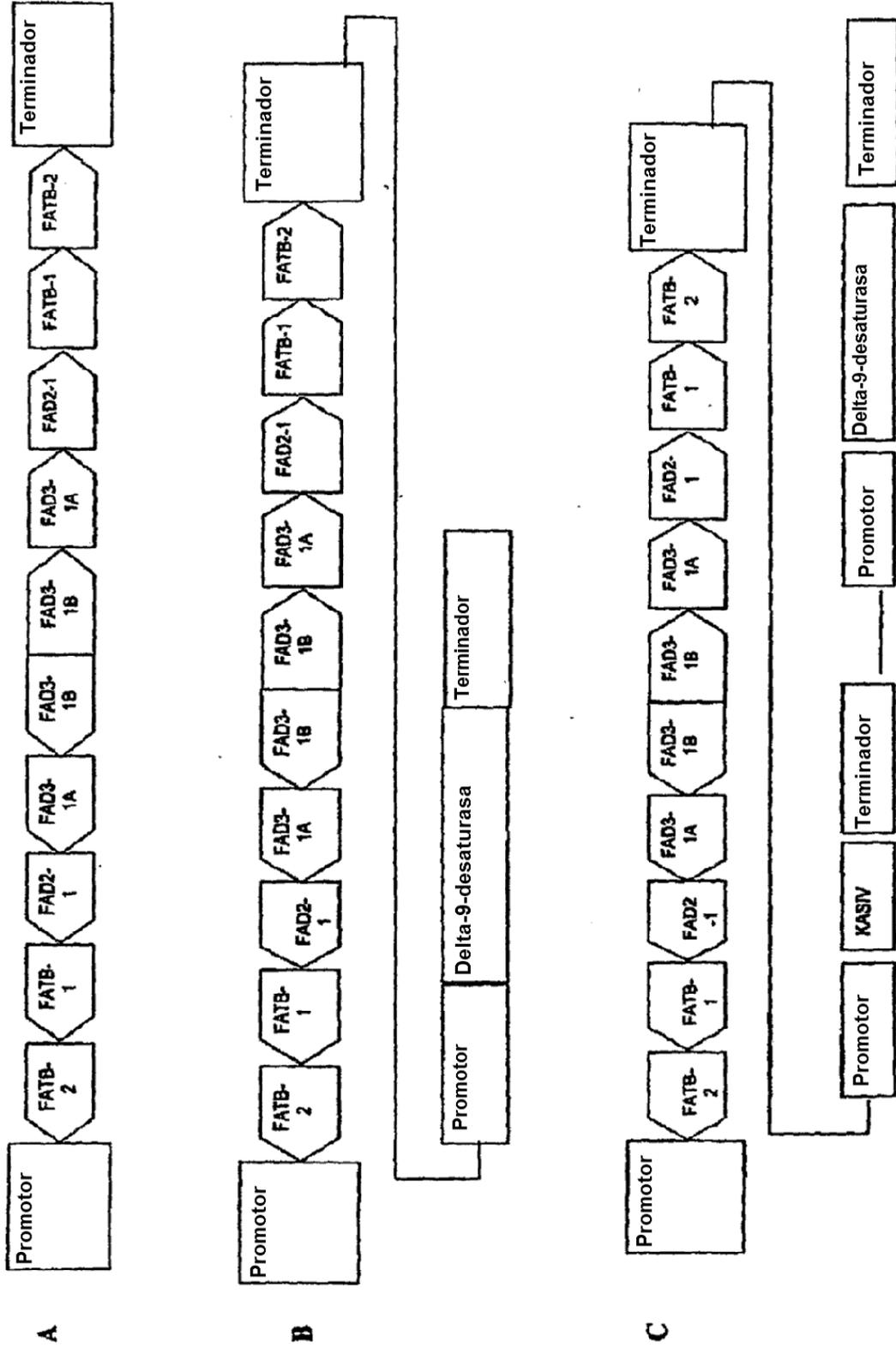


Figura 18

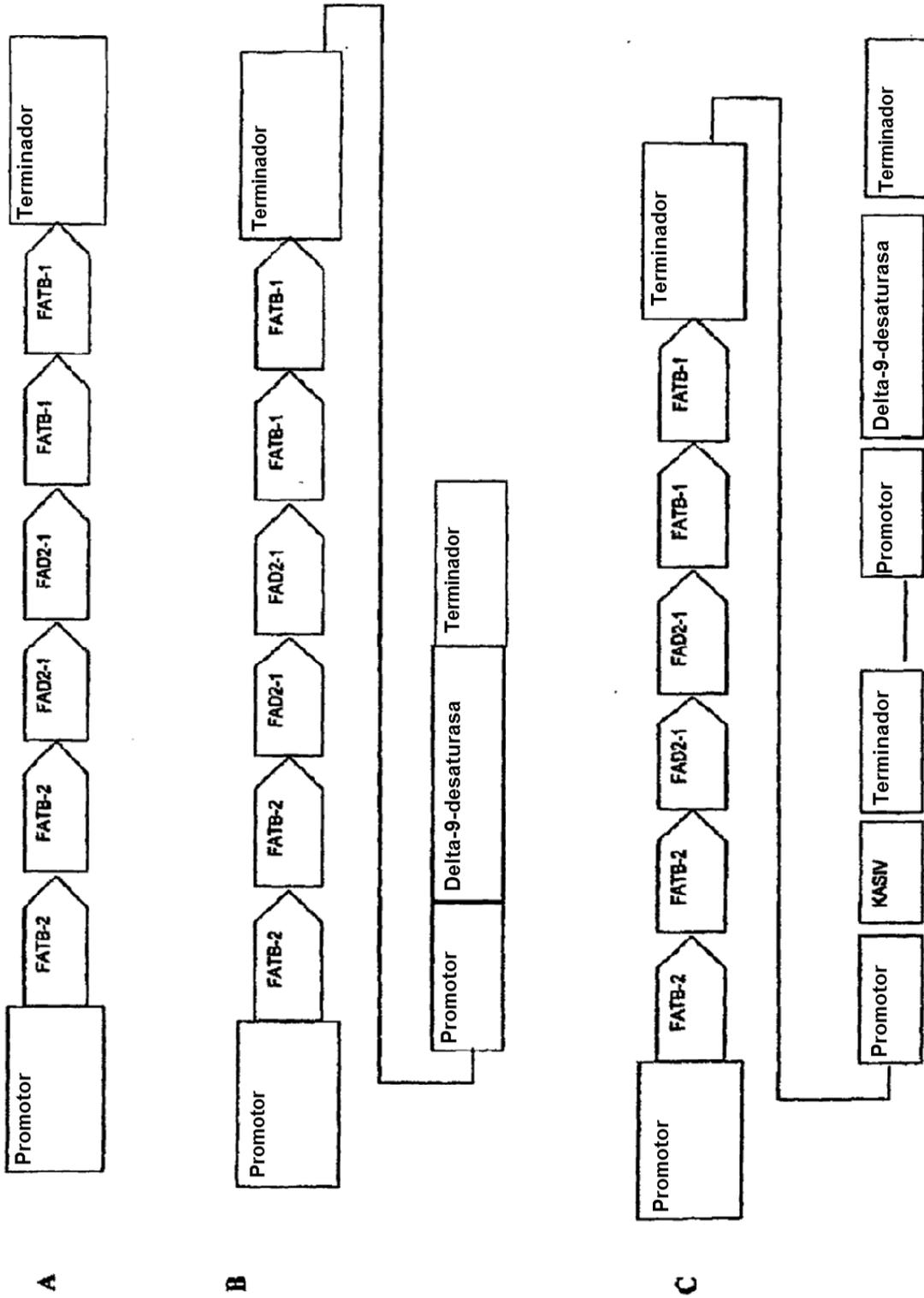


Figura 19

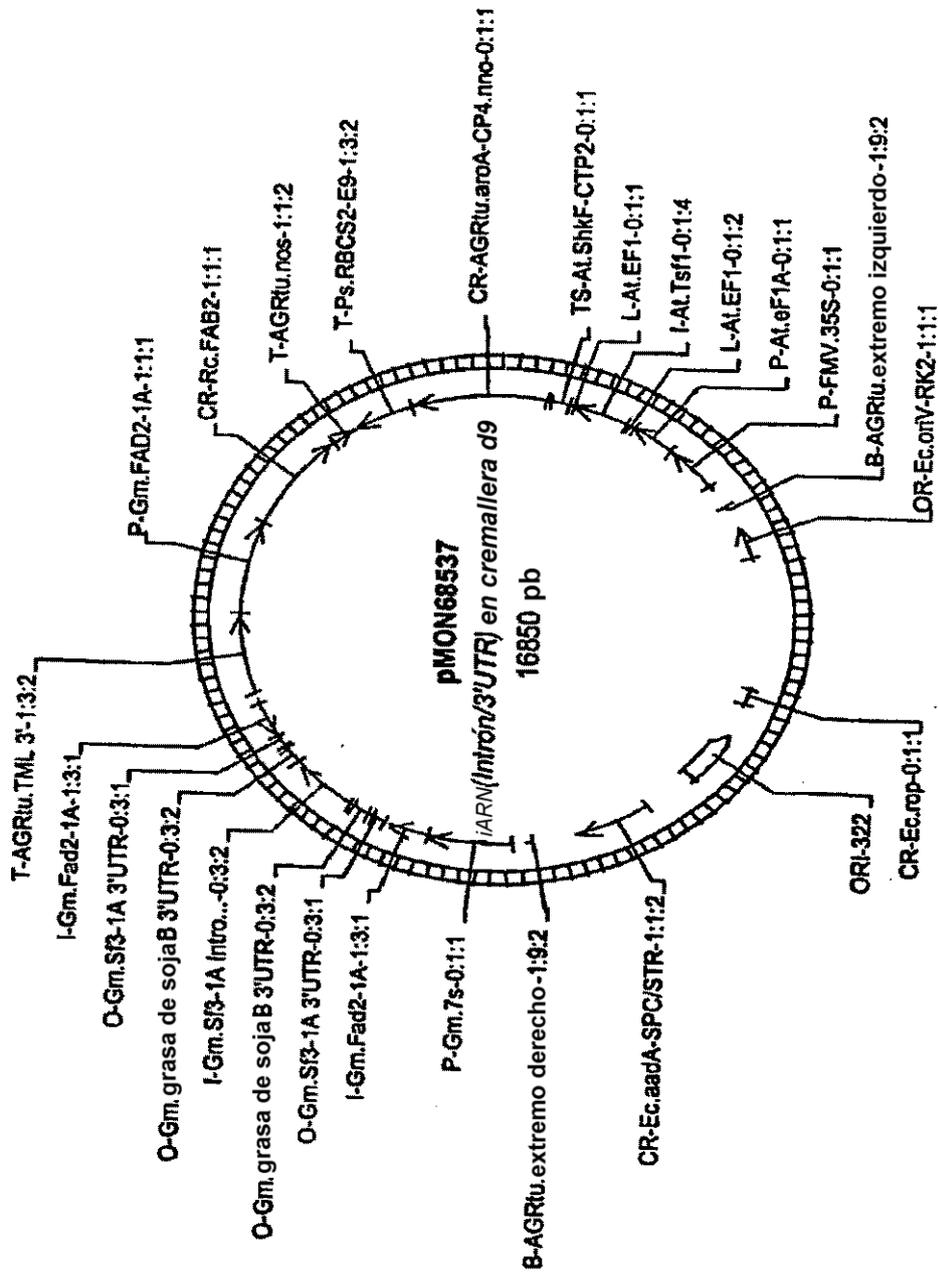


Figura 21

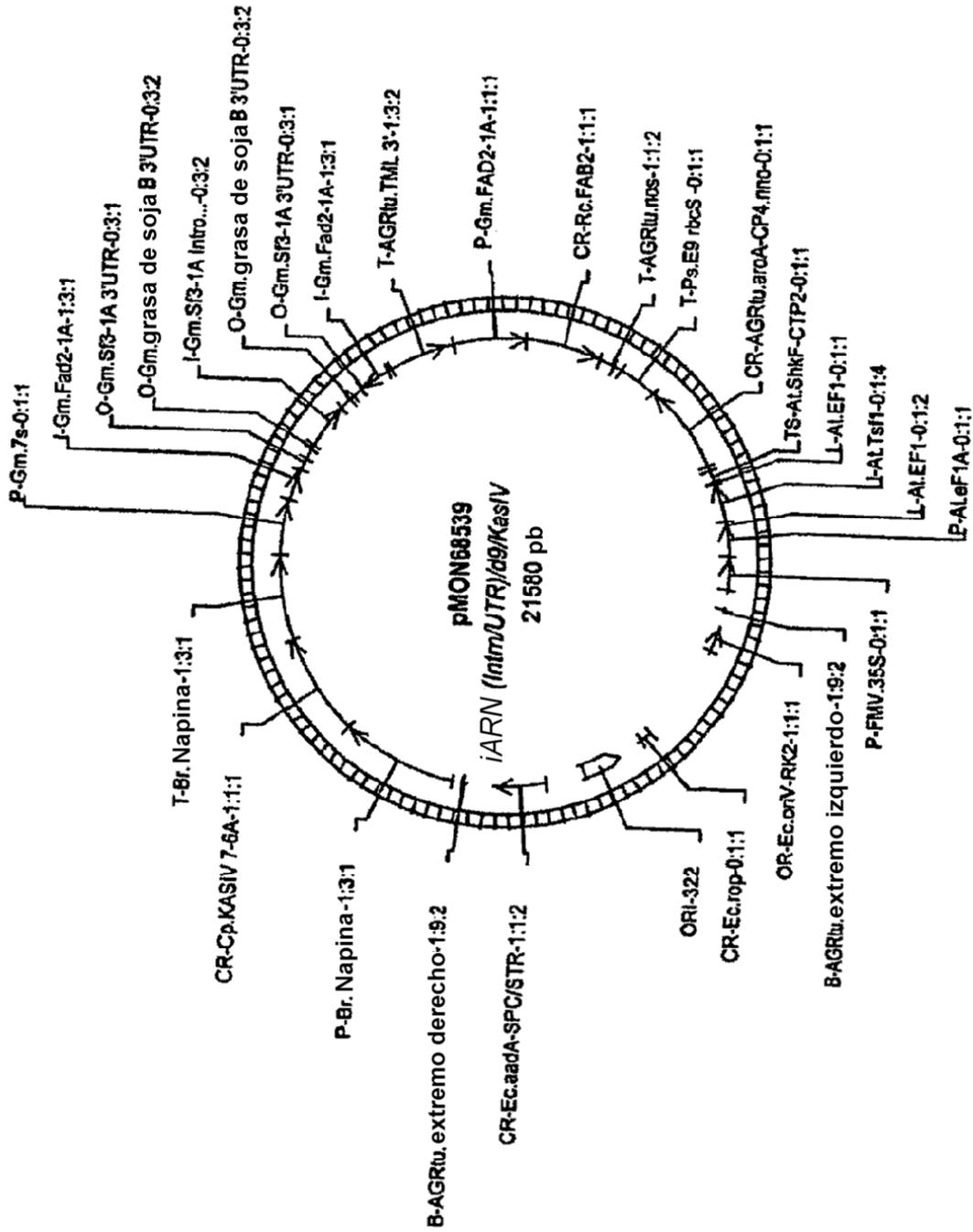


Figura 22