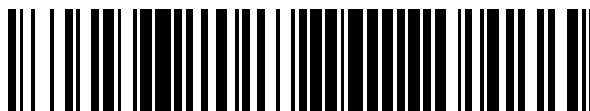


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 537**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/202** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2005 E 05736285 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1734947**

54 Título: **Expresión de desaturadas de ácido graso en maíz**

30 Prioridad:

**16.04.2004 US 563135 P**

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

**21.07.2015**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)  
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD  
ST. LOUIS, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**URSIN, VIRGINIA;  
FROMAN, BYRON;  
NAVA, A.J. y  
GONZALES, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 541 537 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

Expresión de desaturasas de ácido graso en maíz

**Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere en líneas generales a la expresión de enzimas desaturasa que modulan la cantidad y localización de dobles enlaces en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) en maíz y composiciones derivadas del mismo.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

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

15 Las dos familias principales de PUFA son los ácidos grasos omega-3 (también representados como ácidos grasos "n-3"), ejemplificados por ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:4, n-3), y los ácidos grasos omega-6 (también representados como ácidos grasos "n-6"), ejemplificados por ácido araquidónico (ARA, 20:4, n-6). Los PUFA son componentes importantes de la membrana plasmática de la célula y el tejido adiposo, donde pueden encontrarse en forma tales como fosfolípidos y como triacilglicéridos, respectivamente. Los PUFA son necesarios para el desarrollo apropiado en mamíferos, particularmente en el desarrollo del cerebro infantil, y para la formación y reparación de tejidos.

20 Varios trastornos responden al tratamiento con ácidos grasos. La suplementación con PUFA ha demostrado reducir la tasa de reestenosis después de angioplastia. Los beneficios para la salud de ciertos ácidos grasos omega-3 en la dieta para enfermedad cardiovascular y artritis reumatoide también están bien documentados (Simopoulos, 1997; James y col., 2000). Adicionalmente, los PUFA se han sugerido para su uso en tratamientos para asma y psoriasis. Las evidencias indican que los PUFA pueden estar implicados en el metabolismo del calcio, lo que sugiere que los PUFA pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de osteoporosis y de cálculos renales o del tracto urinario. La mayoría de las evidencias de los beneficios para la salud se aplica a las grasas omega-3 de cadena larga, EPA y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6), que están en el pescado y el aceite de pescado. Con esta base de evidencias, las autoridades sanitarias y los nutricionistas en Canadá (Scientific Review Committee, 1990, Nutrition Recommendations, Minister of National Health and Welfare, Canadá, Ottawa), Europa (de Deckerer y col., 1998), el Reino Unido (The British Nutrition Foundation, 1992, Unsaturated fatty-acids - nutritional and physiological significance: The report of the British Nutrition Foundation's Task Force, Chapman and Hall, Londres), y los Estados Unidos (Simopoulos y col., 1999) han recomendado un consumo aumentado en la dieta de estos PUFA.

35 Los PUFA también pueden usarse para tratar la diabetes (patente de Estados Unidos N° 4.826.877; Horrobin y col., 1993). Se ha demostrado un metabolismo y una composición alterados de los ácidos grasos en animales diabéticos. Se ha sugerido que estas alteraciones están implicadas en algunas de las complicaciones a largo plazo resultantes de la diabetes, incluyendo retinopatía, neuropatía, nefropatía y daño al sistema reproductor. El aceite de onagra, que contiene ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA, 18:3, A6, 9, 12), ha demostrado prevenir y revertir el daño nervioso diabético.

40 Los PUFA, tales como ácido linoleico (LA, 18:2, A9, 12) y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3, A9, 12, 15), se consideran como ácidos grasos esenciales en la dieta porque los mamíferos carecen de la capacidad de sintetizar estos ácidos. Sin embargo, cuando se ingieren, los mamíferos tienen la capacidad de metabolizar LA y ALA para formar las familias n-6 y n-3 de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). Estos LC-PUFA son importantes componentes celulares que confieren fluidez a las membranas y funcionan como precursores de eicosanoides biológicamente activos tales como prostaglandinas, prostaciclina, y leucotrienos, que regulan las funciones fisiológicas normales. El ácido araquidónico es el precursor principal para la síntesis de eicosanoides, que incluyen leucotrienos, prostaglandinas, y tromboxanos, y que también desempeñan un papel en el proceso de inflamación. La administración de un ácido graso omega-3, tal como SDA, ha demostrado inhibir la biosíntesis de leucotrienos (patente de Estados Unidos N° 5.158.975). El consumo de SDA ha demostrado conducir a una disminución en los niveles sanguíneos de citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (publicación de Estados Unidos N° 20040039058).

50 En mamíferos, la formación de LC-PUFA está limitada en velocidad por la etapa de  $\Delta 6$  desaturación, que convierte LA en ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA, 18:3, A6, 9, 12) y ALA en SDA (18:4, A6, 9, 12, 15). Muchas afecciones fisiológicas y patológicas han demostrado reducir esta etapa metabólica incluso más, y por consiguiente, la producción de LC-PUFA. Para superar la etapa limitante de la velocidad y aumentar los niveles tisulares de EPA, podría consumirse grandes cantidades de ALA. Sin embargo, el consumo de cantidades solo moderadas de SDA proporciona una fuente eficaz de EPA, ya que SDA es aproximadamente cuatro veces más eficaz que ALA en elevar los niveles tisulares de EPA en seres humanos (publicación de Estados Unidos N° 20040039058). En algunos estudios, la administración de SDA también fue capaz de aumentar los niveles tisulares de ácido docosapentaenoico (DPA), que

es un producto de elongación de EPA. Como alternativa, evitando la  $\Delta$ -6 desaturación mediante suplementación en la dieta con EPA o DHA puede aliviarse de forma eficaz muchas enfermedades patológicas asociadas con bajos niveles de PUFA. Sin embargo, como se expone en más detalle a continuación, las fuentes actualmente disponibles de PUFA no son deseables por múltiples razones. La necesidad de una fuente fiable y económica de PUFA ha estimulado un interés en fuentes alternativas de PUFA.

Los principales PUFA de cadena larga de importancia DHA y EPA, que se encuentran principalmente en diferentes tipos de aceite de pescado, y ARA, encontrado en hongos filamentosos tales como *Mortierella*. Para DHA, existen varias fuentes para producción comercial incluyendo una diversidad de organismos marinos, aceites obtenidos de pescado marino de agua fría y fracciones de yema de huevo. Las fuentes comerciales de SDA incluyen los géneros de plantas *Trichodesma*, *Borago* (borraja) y *Echium*. Sin embargo, existen varias desventajas asociadas con la producción comercial de PUFA a partir de fuentes naturales. Las fuentes naturales de PUFA, tales como animales y plantas, tienden a tener composiciones de aceite altamente heterogéneas. Los aceites obtenidos de estas fuentes por lo tanto pueden requerir purificación excesiva para separar uno o más PUFA deseados o para producir un aceite que esté enriquecido en uno o más PUFA.

Las fuentes naturales de PUFA también están sometidas a incontrolables fluctuaciones de disponibilidad. Las reservas de peces pueden experimentar variación natural o pueden agotarse por sobrepesca. Además, incluso con evidencias abrumadoras de sus beneficios terapéuticos, las recomendaciones dietéticas respecto a los ácidos grasos omega-3 no se han tenido en cuenta. Los aceites de pescado tienen sabor y olor desagradables, que pueden ser imposibles de separar económicamente del producto deseado, y pueden volver a dichos productos inaceptables como suplementos alimenticios. Los aceites animales, y particularmente los aceites de pescado, pueden acumular contaminantes ambientales. Los alimentos pueden enriquecerse con aceites de pescado, pero de nuevo, dicho enriquecimiento es problemático a causa del coste y la disminución de reservas de pescado en todo el mundo. Este problema también es un impedimento para el consumo e ingesta de pescado completo. No obstante, si los mensajes de salud de aumentar la ingesta de pescado se aceptaran por las comunidades, probablemente habría un problema en cumplir la demanda de pescado. Además, existen problemas con la sostenibilidad de esta industria, que depende principalmente de las reservas de pescado salvaje para la alimentación acuícola (Naylor y col., 2000).

Otras limitaciones naturales favorecen un nuevo enfoque para la producción de ácidos grasos omega-3. Las condiciones climáticas y las enfermedades pueden causar fluctuación en las producciones tanto de fuentes de pescado como vegetales. Tierra de cultivo disponible para la producción de cultivos oleaginosos alternativos está sometida a competición por la expansión estacionaria de poblaciones humanas y la necesidad aumentada asociada de producción de alimentos en el resto de la tierra cultivable. Los cultivos que producen PUFA, tales como borraja, no se han adaptado al crecimiento comercial y no pueden funcionar bien en monocultivo. El crecimiento de dichos cultivos por tanto no es económicamente competitivo cuando pueden cultivarse cultivos más rentables y mejor establecidos. La fermentación a gran escala de organismos tales como *Mortierella* también es cara. Los tejidos animales naturales contienen bajas cantidades de ARA y son difíciles de procesar. Los microorganismos tales como *Porphyridium* y *Mortierella* son difíciles de cultivar a escala comercial.

Varias enzimas están implicadas en la biosíntesis de PUFA. LA (18:2, A9, 12) se produce a partir de ácido oleico (OA, 18:1, A9) por una  $\Delta$ 12 desaturasa mientras que ALA (18:3, A9, 12, 15) se produce a partir de LA por una  $\Delta$ 15 desaturasa. SDA (18:4, A6, 9, 12, 15) y GLA (18:3, A6, 9, 12) se producen a partir de LA y ALA por una  $\Delta$ 6 desaturasa. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, los mamíferos no pueden desaturar más allá de la posición  $\Delta$ 9 y por lo tanto no pueden convertir ácido oleico en LA. Asimismo, ALA no puede sintetizarse por mamíferos. Otros eucariotas, incluyendo hongos y plantas, tienen enzimas que desaturan en las posiciones de carbono 12 y carbono 15. Los principales ácidos grasos poliinsaturados de animales por lo tanto se obtienen en la dieta mediante la desaturación y elongación posteriores de LA y ALA de la dieta.

Se han descrito diversos genes que codifican desaturasas. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.952.544 describe fragmentos de ácido nucleico aislados y clonados de *Brassica napus* que codifican enzimas ácido graso desaturasa. La expresión de los fragmentos de ácido nucleico de la patente 5.952.544 provocó la acumulación de ALA. Sin embargo, en plantas transgénicas que expresan la  $\Delta$ 15 desaturasa de *B. napus*, permanece sustancial LA sin convertir por la desaturasa. Se ha demostrado que ciertas  $\Delta$ 15 desaturasas fúngicas son capaces de convertir LA en ALA cuando se expresan en plantas. En particular, las  $\Delta$ 15 desaturasas fúngicas de *Neurospora crassa* y *Aspergillus (Emericella) nidulans* han sido eficaces (documento WO 03/099216). Niveles aumentados de ALA permiten que una  $\Delta$ 6 desaturasa, cuando se co-expresa con un ácido nucleico que codifica una  $\Delta$ 15 desaturasa, actúe sobre el ALA, produciendo de ese modo niveles superiores de SDA. A causa de la multitud de usos beneficiosos para SDA, existe la necesidad de crear un aumento sustancial en la producción de SDA.

Se han buscado ácidos nucleicos de diversas fuentes para su uso en el aumento de la producción de SDA. Se han aislado genes que codifican  $\Delta$ 6 desaturasa del hongo *Mortierella alpina* (patente de Estados Unidos N° 6.075.183) y la planta *Primula* (documento WO 05/021761). Estas han demostrado ser capaces de convertir ALA en SDA en levaduras y plantas.

Por lo tanto, sería ventajoso obtener material genético implicado en la biosíntesis de PUFA y expresar el material aislado en un sistema vegetal, en particular, un sistema vegetal de cultivo terrestre en tierra firme, que pueda

manipularse para proporcionar producción de cantidades comerciales de uno o más PUFA. También existe la necesidad de aumentar la ingesta de grasas omega-3 en seres humanos y animales. Por tanto existe una necesidad de proporcionar un amplio intervalo de alimentos enriquecidos con omega-3 y suplementos alimenticios de modo que los sujetos puedan elegir piensos, ingredientes de piensos, alimentos e ingredientes alimenticios que se adecuen a sus hábitos dietéticos habituales. Sería particularmente ventajoso aceites de semilla y harinas con SDA aumentado.

Actualmente, existe solamente un ácido graso omega-3, ALA, disponible en aceites vegetales. Sin embargo, existe una mala conversión del ALA ingerido en los ácidos grasos omega-3 de cadena más larga tales como EPA y DHA. Se ha demostrado en la publicación en trámite junto con la presente de Estados Unidos N° 20040039058 para "Tratamiento y Prevención de Trastornos Inflamatorios", que elevar la ingesta promedio de ALA en la sociedad de 1/gr por día a 14 gr/día mediante el uso de aceite de linaza solamente aumentaba moderadamente los niveles de EPA en fosfolípidos plasmáticos. Un aumento de 14 veces la ingesta de ALA provocó un aumento de 2 veces de EPA en fosfolípidos plasmáticos (Manzioris y col., 1994). Por tanto, a este fin, existe la necesidad de producción eficaz y comercialmente viable de PUFA usando ácido graso desaturadas, genes que codifiquen las mismas, y procedimientos recombinantes para producirlas. También existe una necesidad de aceites que contengan proporciones relativamente superiores de PUFA específicos, y composiciones y suplementos de alimentos y de piensos que las contengan. También existe la necesidad de procedimientos económicamente fiables para producir PUFA específicos.

A pesar de las ineficacias y bajos rendimientos como se ha descrito anteriormente, la producción de ácidos grasos omega-3 mediante la cadena alimentaria terrestre es un negocio beneficioso para la salud pública y, en particular, la producción de SDA. SDA es importante porque, como se describe anteriormente, existe una baja conversión de ALA en EPA. Esto es porque la enzima inicial en la conversión,  $\Delta 6$  desaturasa, tiene baja actividad en seres humanos y es limitante de la velocidad. Las evidencias de que la  $\Delta 6$  desaturasa es limitante de la velocidad se proporcionan por estudios que demuestran que la conversión de su sustrato, ALA, es menos eficaz que la conversión de su producto, SDA en EPA en ratones y ratas (Yamazaki y col., 1992; Huang, 1991).

Ciertos aceites de semilla, tales como maíz, carecen completamente de SDA u otros importantes ácidos grasos omega-3 y por tanto existe una gran necesidad de la técnica de plantas que comprendan aceite de semilla con perfiles mejorados de PUFA. Dichos aceites pueden utilizarse para producir alimentos y suplementos alimenticios enriquecidos en ácidos grasos omega-3 y el consumo de dichos alimentos aumenta de forma eficaz los niveles tisulares de EPA. Los alimentos y productos alimenticios, tales como leche, margarina y embutidos, todos fabricados o preparados con aceites enriquecidos en omega-3, provocarán beneficios en la salud. Los piensos para animales que contienen el aceite extraído o harinas o semillas sin procesar enriquecidas en ácidos grasos omega-3 también pueden usarse para aumentar de forma eficaz los niveles tisulares de EPA y proporcionar beneficios para la salud para el ganado así como para la productividad. Por tanto, existe una fuerte necesidad de nuevas plantas para la expresión de desaturadas para la creación de aceites enriquecidos en PUFA.

### Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona una planta de maíz transgénica o semilla de maíz transgénica que comprende una construcción recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una  $\Delta 15$  desaturasa de *Neurospora crassa* mutagenizada para aumentar la expresión en una monocotiledónea tal como maíz y una secuencia polinucleotídica que codifica una  $\Delta 6$  desaturasa de *Primula julia* modificada para la expresión en plantas monocotiledóneas, comprendiendo dicha planta de maíz y semilla de maíz un aceite de semilla de maíz endógeno que tiene un contenido de ácido estearidónico (18:4 n-3) del 25 al 33%.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un aceite de semilla de maíz endógeno que se puede obtener de una semilla de maíz del primer aspecto de la invención y que tiene un contenido de ácido estearidónico del 25 al 33%. En ciertas realizaciones de la invención, el aceite de semilla de maíz comprende del 25% al 30% y del 25% al 32% de ácido estearidónico. Un aceite de semilla de maíz endógeno proporcionado por la invención puede comprender adicionalmente ácido gamma-linolénico. En ciertas realizaciones de la invención, el contenido de ácido gamma-linolénico del aceite puede ser del 0,01% al 7,5% y del 0,01% al 5%, incluyendo menos del 5% y menos del 3% y específicamente incluyendo todos los valores intermedios. También se desvela que el contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico puede ser menor del 5, 10, 15 ó 20%.

En realizaciones adicionales de la invención, un aceite de semilla de maíz de la invención puede comprender una proporción de ácido estearidónico a ácido gamma-linolénico de 1:1 a 10:1, de 2:1 a 10:1, de 3:1 a 5:1 o al menos 3:1. Un aceite de semilla de maíz proporcionado por la invención puede comprender adicionalmente una proporción de ácidos grasos omega-3 a omega-6 del 0,5%:1 a 10:1, de 5:1 a 10:1, y al menos 5:1.

También se desvela un procedimiento para producir aceite de semilla de maíz que contenga un perfil modificado de PUFA que comprende las etapas de (a) obtener semillas de una planta de acuerdo con la invención; y (b) extraer el aceite de dichas semillas. Los procedimientos preferidos para transformar dichas células vegetales en ciertas realizaciones de la invención incluyen el uso de plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium*, electroporación, y bombardeo balístico de alta velocidad.

También se desvela un procedimiento para producir una planta de maíz que comprenda aceite de semilla que contenga niveles alterados de ácidos grasos omega-3 que comprende introducir un vector recombinante de la invención en una planta productora de aceite. En el procedimiento, la introducción del vector recombinante puede comprender transformación genética. En una realización, la transformación comprende las etapas de: (a) transformar una célula vegetal con una construcción recombinante definida anteriormente en el presente documento; y (b) regenerar la planta a partir de la célula vegetal, donde la planta tiene niveles alterados de ácidos grasos omega-3 respecto a una planta correspondiente del mismo genotipo que no se transformó con el vector. La planta puede definirse adicionalmente como transformada con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 12 y/o 15. La planta puede comprender SDA y GLA aumentados. El procedimiento puede comprender adicionalmente introducir el vector recombinante en una pluralidad de plantas de maíz y seleccionar las plantas o descendencia de las mismas que tengan heredado el vector recombinante para una planta que tenga un perfil deseado de ácidos grasos omega-3.

En otro aspecto adicional más, la invención proporciona un procedimiento para aumentar el valor nutritivo de un producto comestible para consumo humano o animal, que comprende añadir un aceite de semilla de maíz proporcionado por la invención al producto comestible. En ciertas realizaciones, el producto es un alimento humano y/o animal. El producto comestible también puede ser pienso animal y/o un suplemento alimenticio. En el procedimiento, el aceite puede aumentar el contenido de SDA del producto comestible y/o puede aumentar la proporción de ácidos grasos omega-3 a omega-6 del producto comestible. El producto comestible puede carecer de SDA antes de añadir el aceite.

En otro aspecto adicional más, la invención proporciona un procedimiento para fabricar alimentos o piensos, que comprende añadir un aceite de semilla de maíz proporcionado por la invención a los ingredientes de partida del alimento o pienso para producir el alimento o pienso. En ciertas realizaciones, el procedimiento se define adicionalmente como un procedimiento para fabricar alimento y/o piensos. La invención también proporciona alimentos o piensos fabricados por el procedimiento.

En otro aspecto adicional más, la invención comprende un procedimiento para proporcionar SDA a un ser humano o animal, que comprende administrar un aceite de semilla de la invención a dicho ser humano o animal. En el procedimiento, el aceite de semilla puede administrarse en una composición comestible, incluyendo alimento o pienso. Ejemplos de alimentos incluyen bebidas, alimentos de infusión, salsas, condimentos, aliños de ensalada, zumos de frutas, jarabes, postres, glaseados y rellenos, productos congelados blandos, productos de confitería o productos alimentarios intermedios. La composición comestible puede ser sustancialmente un líquido o un sólido. La composición comestible también puede ser un suplemento alimenticio y/o nutracéutico. En el procedimiento, el aceite de semilla puede administrarse a un ser humano y/o un animal. Ejemplos de animales a los que puede administrarse el aceite incluyen ganado o aves de corral.

En otro aspecto más, un aceite de semilla de maíz de la invención se obtiene de una planta transformada con ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido capaz de desaturar una molécula de ácido graso en el carbono 6 ( $\Delta 6$ -desaturasa). Se usa una secuencia polinucleotídica aislada de una especie de *Primula* que tiene actividad desaturasa única. Los polinucleótidos aislados se aíslan de *Primula juliae*. En ciertas realizaciones adicionales de la invención, los polinucleótidos codifican un polipéptido que tiene al menos un 90% de homología con la secuencia polipeptídica de la SEC ID N° 3 y/o SEC ID N° 4, incluyendo al menos el 92%, 95%, 98% y 99% de homología con estas secuencias. Dichas secuencias pueden tener especificidad de sustrato por ácido  $\alpha$ -linolénico respecto a ácido linoleico. En ciertas realizaciones, existe una especificidad de sustrato de al menos 2:1 por ácido  $\alpha$ -linolénico respecto a ácido linoleico, incluyendo de 2:1 a 2,9:1.

La planta de maíz puede transformarse con un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 6, que comprende una secuencia seleccionada entre (a) un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4; (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2; y (c) un polinucleótido que hibrida con la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, o un complemento de las mismas, en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42°C.

Se desvela adicionalmente un polinucleótido aislado seleccionado entre (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 8; (b) un polinucleótido que hibrida con la SEC ID N° 8 en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42°C, donde el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 6; y (c) un polinucleótido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 8, donde el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 6; y (d) un complemento de la secuencia de (a), (b), o (c). En una realización, dicho polinucleótido puede comprender la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 9. Se desvelan adicionalmente construcciones recombinantes y plantas transgénicas que comprenden dicho polinucleótidos, así como el aceite de semilla producido por las plantas.

Se desvela adicionalmente una planta de maíz transformada con una construcción recombinante (vector) que comprende un polinucleótido aislado descrito anteriormente en el presente documento. La expresión "vector recombinante" como se usa en el presente documento, incluye cualquier segmento recombinante de ADN que se

desea introducir en una célula, tejido y/u organismo huésped, y específicamente incluye casetes de expresión aislados de un polinucleótido de partida. Un vector recombinante puede ser lineal o circular. En diversos aspectos, un vector recombinante puede comprender al menos una secuencia adicional elegida entre el grupo que consiste en: secuencias reguladoras acopladas de forma funcional al polinucleótido; marcadores de selección acoplados de forma funcional al polinucleótido; secuencias marcadoras acopladas de forma funcional al polinucleótido; un resto de purificación acoplado de forma funcional al polinucleótido; y una secuencia de dirección acoplada de forma funcional al polinucleótido.

Se desvelan además células de maíz transformadas con los polinucleótidos descritos en el presente documento. Además se desvelan células transformadas con vectores recombinantes que contienen promotores constitutivos y específicos de tejido además de los polinucleótidos. Dichas células pueden definirse adicionalmente como transformadas con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 12 y/o 15.

### **Breve descripción de las figuras**

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

La FIG. 1 muestra un mapa del vector pMON82812.

La FIG. 2 muestra un mapa del vector pMON78175.

La FIG. 3 muestra un mapa del vector pMON78171.

### **Descripción detallada de la invención**

La invención supera las limitaciones de la técnica previa proporcionando procedimientos y composiciones para la creación de plantas con contenido mejorado de PUFA y los aceites de semilla producidos por las mismas. En una realización de la invención, los solicitantes ha proporcionado plantas transgénicas de maíz (*Zea mays*) que producen un aceite de semilla de maíz endógeno que contiene ácido estearidónico (SDA) y también puede comprender ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA). Esto es significativo porque el aceite de semilla de maíz normalmente carece de estos componentes, cada uno de los cuales ha demostrado tener importantes beneficios para la salud. El aceite de semilla de maíz es endógeno porque puede producirse por una semilla de maíz sin la necesidad de adición externa de, por ejemplo, SDA. Dicho aceite endógeno puede ser una composición de aceite extraído que puede usarse como ingrediente de alimentos y piensos y por lo cual beneficiar a la salud de seres humanos o animales. La modificación del contenido de ácidos grasos de un organismo tal como una planta por tanto presenta muchos beneficios tales como nutrición mejorada y beneficios para la salud. La modificación del contenido de ácidos grasos puede usarse de acuerdo con la invención para conseguir niveles beneficiosos o perfiles de PUFA deseados en plantas tales como maíz, partes de plantas, y productos vegetales, incluyendo aceites vegetales de semilla. Por ejemplo, cuando se producen los PUFA deseados en el tejido de semilla de una planta, el aceite puede aislarse de las semillas típicamente produciendo un aceite de alto nivel en PUFA deseados o un aceite que tiene un contenido o perfil deseado de ácidos grasos, que a su vez puede usarse para proporcionar características beneficiosas en productos alimenticios u otros productos. La invención proporciona en particular aceite de semilla de maíz endógeno que tiene SDA.

Diversos aspectos de la invención incluyen procedimientos y composiciones para la modificación del contenido de PUFA de una célula, por ejemplo, modificación del contenido de PUFA de una célula vegetal de maíz. Las composiciones relacionadas con la invención incluyen secuencias polinucleotídicas aisladas y construcciones polinucleotídicas introducidas en plantas y/o partes de plantas. Un ejemplo de dicho polinucleótido aislado es un ácido graso desaturasa de *Primula* tal como  $\Delta 6$ -desaturasa de *Primula*. Las células de maíz preparadas de acuerdo con la invención pueden comprender otras ácido graso desaturasas, incluyendo las conocidas  $\Delta 6$ -desaturasas tales como las de *Mortierella alpina*. Los inventores han demostrado en particular que la expresión de diferentes  $\Delta 6$  y  $\Delta 15$  ácido graso desaturasas produce aceite de semilla de maíz que contiene SDA. Ciertas realizaciones de la invención por lo tanto proporcionan plantas y células de maíz transformadas con secuencias codificantes de  $\Delta 6$  y  $\Delta 15$  ácido graso desaturasas. En una realización de la invención, un  $\Delta 15$ -desaturasa puede ser de una fuente fúngica, incluyendo *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*. Diversas realizaciones de la invención pueden usar combinaciones de polinucleótidos de desaturasa y los polipéptidos codificados que típicamente dependen de la célula huésped, la disponibilidad del sustrato o sustratos, y el producto o productos finales deseados. "Desaturasa" se refiere a un polipéptido que puede desaturar o catalizar la formación de un doble enlace entre carbonos consecutivos de uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso mono o poliinsaturado o precursor del mismo. Son de particular interés polipéptidos que pueden catalizar la conversión de ácido oleico en LA, LA en ALA, o ALA en SDA, que incluye enzimas que desaturan en las posiciones 12, 15 ó 6. El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-traducciona (por ejemplo, glucosilación o fosforilación). Las consideraciones para elegir un polipéptido específico que tenga actividad

desaturasa incluyen, aunque sin limitación, el pH óptimo del polipéptido, sea el polipéptido una enzima limitante de la velocidad o un componente de la misma, sea la desaturasa usada esencial para la síntesis de un PUFA deseado, y/o sea un cofactor requerido por el polipéptido. El polipéptido expresado preferentemente tiene características que son compatibles con el entorno bioquímico de su localización en la célula huésped. Por ejemplo, el polipéptido puede tener que competir por el sustrato o sustratos.

Los análisis de la  $K_m$  y la actividad específica de un polipéptido en cuestión pueden considerarse en la determinación de la idoneidad de un polipéptido dado para modificar la producción, nivel o perfil de PUFA en una célula huésped dada. El polipéptido usado en una situación particular es uno que típicamente puede funcionar en las condiciones presentes en la célula huésped pretendida, pero por lo demás puede ser cualquier polipéptido de desaturasa que tenga una característica deseada o que sea capaz de modificar la producción relativa, nivel o perfil de uno o más PUFA deseados o cualquier otra característica deseada analizada en el presente documento. El sustrato o sustratos para la enzima expresa pueden producirse por la célula huésped o pueden suministrarse de forma exógena. Para conseguir la expresión, el polipéptido o polipéptidos de la presente invención se codifican por polinucleótidos descritos a continuación.

En otro aspecto de la invención, los vectores que contienen un ácido nucleico, o fragmento del mismo, pueden usarse conteniendo un promotor, una secuencia codificante de desaturasa y una región de terminación para la transferencia en un organismo en que las regiones promotora y de terminación son funcionales. Por consiguiente, se proporcionan por la presente invención plantas de maíz que producen  $\Delta 6$ -desaturasa recombinante. Un ejemplo de dicha secuencia codificante de  $\Delta 6$ -desaturasa proporcionada por la invención que se ha optimizado para la expresión en maíz se da por la SEC ID N° 8 y SEC ID N° 9. La invención por lo tanto proporciona específicamente ácidos nucleicos que comprenden esta secuencia, así como secuencias que tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con estas secuencias, incluyendo al menos el 93%, 95%, 98% y el 99% de identidad. Pueden realizarse comparaciones de polipéptidos y polinucleótidos y determinarse la identidad usando software de análisis de secuencia, por ejemplo, el paquete de software Sequence Analysis del paquete GCG Wisconsin (Accelrys, San Diego, CA), MEGAlign (DNASStar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715), y MacVector (Oxford Molecular Group, 2105 S. Bascom Avenue, Suite 200, Campbell, Calif. 95008). Dicho software acopla secuencias similares evaluando los grados de similitud o identidad.

Pueden proporcionarse construcciones de ácido nucleico que se integran en el genoma de una célula huésped o se replican de forma autónoma (por ejemplo, se replican de forma episómica) en la célula huésped. Para la producción de ALA y/o SDA, los casetes de expresión (es decir, un polinucleótido que codifica una proteína que está unida de forma funcional a una o más secuencias de ácido nucleico que dirige la expresión del polinucleótido) generalmente usados incluyen un casete de expresión que proporciona la expresión de un polinucleótido que codifica una  $\Delta 6$  y/o  $\Delta 15$ -desaturasa. En ciertas realizaciones, una célula huésped puede tener contenido de ácido oleico de tipo silvestre.

Los procedimientos y composiciones para la construcción de vectores de expresión, cuando se adoptan a la luz de los contenidos proporcionados en el presente documento, para la expresión de enzimas desaturadas serán evidentes para un especialista en la técnica. Los vectores de expresión, como se describen en el presente documento, son moléculas de ADN o ARN modificadas por ingeniería para la expresión controlada de un polinucleótido deseado, por ejemplo, el polinucleótido que codifica la desaturasa. Ejemplos de vectores incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmidos o virus. También se contemplan vectores lanzadera, por ejemplo (Wolk y *col.* 1984; Bustos y *col.*, 1991) de acuerdo con la presente invención. Pueden encontrarse revisiones de vectores y procedimientos para prepararlos y usarlos en Sambrook y *col.* (2001); Goeddel (1990); y Perbal (1988). Los elementos de secuencia capaces de efectuar la expresión de un polinucleótido incluyen promotores, elementos potenciadores, secuencias activadoras cadena arriba, señales de terminación de la transcripción y sitios de poliadenilación.

Los polinucleótidos que codifican desaturadas pueden colocarse bajo el control transcripcional de un promotor fuerte. En algunos casos esto conduce a un aumento en la cantidad de enzima desaturada expresada y de forma concomitante un aumento en el ácido graso producido como resultado de la reacción catalizada por la enzima. Ejemplos de dichos promotores incluyen el 35S CaMV (virus del mosaico de la coliflor), 34S FMV (virus del mosaico de la escrofularia) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.378.619), y Lec (de maíz). Existe una amplia diversidad de secuencias promotoras de plantas que pueden usarse para dirigir la expresión específica de tejido de polinucleótidos que codifican desaturadas en plantas transgénicas. De hecho, en realizaciones particulares de la invención, el promotor usado es un promotor específico de semillas. Ejemplos de promotores que pueden usarse a este respecto incluyen regiones reguladoras 5' de genes tales como napina, que se regulan durante la maduración de semillas vegetales (Kridl y *col.*, Seed Sci. Res. 1:209:219, 1991), faseolinas (Bustos, y *col.*, Plant Cell, 1(9):839-853, 1989), inhibidor de tripsina de soja (Riggs, y *col.*, Plant Cell 1(6):609-621, 1989), ACP (Baerson y *col.*, Plant Mol. Biol., 22(2):255-267, 1993), esteroil-ACP desaturasa (Slocombe y *col.*, Plant Physiol. 104(4):167-176, 1994), subunidad  $\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina de soja (P-Gm7S, véase por ejemplo, Chen y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:8560-8564, 1986), USP de *Vicia faba* (P-Vf.Usp, véase por ejemplo, SEC ID N° 1, 2, y 3, solicitud de patente de Estados Unidos 10/429.516), el promotor de globulina (véase por ejemplo Belanger y Kriz, Genet. 129: 863-872 (1991)), la subunidad alfa de  $\beta$ -conglucina de soja (7S alfa) (solicitud de patente de Estados Unidos 10/235.618,

incorporada por referencia), promotor PER1 de peroxidina de semilla de cebada (véase por ejemplo, Stacey y col., *Plant Mol. Biol.*, 31:1205-1216, 1996), y el promotor de oleosina L3 de *Zea mays* (P-Zm.L3, véase, por ejemplo, Hong y col., *Plant Mol. Biol.*, 34(3):549-555, 1997; véase también la patente de Estados Unidos N° 6.433.252).

5 Ejemplos de promotores altamente expresados en el endosperma incluyen promotores de genes que codifican zeínas, que son un grupo de proteínas de almacenamiento encontradas en endosperma de maíz. Se han aislado clones genómicos para genes de zeína (Pedersen y col., *Cell* 29:1015-1026 (1982), y Russell y col., *Transgenic Res.* 6(2):157-168) y los promotores de estos clones, incluyendo los genes de 15 kD, 16 kD, 19 kD, 22 kD, y 27 kD, también podrían usarse para proporcionar expresión en el endosperma de acuerdo con la invención (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.326.527). Otros promotores adecuados conocidos por funcionar en  
10 maíz, y en otras plantas, incluyen los promotores para los siguientes genes: céreo (sintasa de almidón unido a gránulos), frágil y reducido 2 (ADP glucosa pirofosforilasa), reducido 1 (sacarosa sintasa), enzimas de ramificación I y II, sintasas de almidón, enzimas desramificantes, oleosinas, glutelinas, sacarosa sintasas (Yang y col., 1990), Bet1 (capa de transferencia de endosperma basal) y globulina1. Otros promotores útiles en la práctica de la invención que son conocidos por los especialistas en la técnica también se contemplan por la invención.

15 Los especialistas en la técnica pueden determinar vectores y elementos reguladores (incluyendo promotores y regiones codificantes unidas de forma funcional) adecuados para la expresión en una célula huésped particular. "Unido de forma funcional" en este contexto significa que el promotor y las secuencias terminadoras funcionan de forma eficaz regulando la transcripción. Como ejemplo adicional, un vector apropiado para la expresión de  $\Delta 6$  y/o  $\Delta 15$ -desaturasa en plantas de maíz transgénicas puede comprender secuencias promotoras específicas de semilla  
20 unidas de forma funcional a la región codificante de desaturasa y adicionalmente unidas de forma funcional a una señal de terminación de proteína de almacenamiento en semilla o la señal de terminación de la nopalina sintasa. Como ejemplo adicional más, un vector para su uso en la expresión de desaturasas en plantas puede comprender un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido unido de forma funcional a la región codificante de desaturasa y unido de forma funcional adicional a un terminador constitutivo o específico de tejido o la señal de  
25 terminación de la nopalina sintasa.

Modificaciones de las secuencias de nucleótidos o elementos reguladores desvelados en el presente documento que mantienen las funciones contempladas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Dichas modificaciones incluyen inserciones, sustituciones y deleciones, y específicamente sustituciones que reflejan la degeneración del código genético.

30 Las técnicas convencionales para la construcción de dichos vectores recombinantes son bien conocidas para los especialistas en la técnica y pueden encontrarse en referencias tales como Sambrook y col. (2001), o cualquiera de la miríada de manuales de laboratorio sobre tecnología de ADN recombinante que están ampliamente disponibles. Está disponible una diversidad de estrategias para ligar fragmentos de ADN, la elección de los cuales depende de la naturaleza de los extremos de los fragmentos de ADN. Se contempla adicionalmente de acuerdo con la presente  
35 invención incluir en un vector de ácido nucleico otros elementos de secuencia de nucleótidos que faciliten la clonación, expresión o procesamiento, por ejemplo secuencias que codifican péptidos señal, una secuencia codificante de KDEL, que es necesaria para retención de proteínas en el retículo endoplasmático o secuencias que codifican péptidos de transición que dirigen la  $\Delta 6$ -desaturasa al cloroplasto. Dichas secuencias son conocidas para los especialistas en la técnica. Un péptido de tránsito optimizado se describe, por ejemplo, por Van den Broeck y col. (1985). Se desvelan secuencias señal procariotas y eucariotas, por ejemplo, por Michaelis y col. (1982).

Una vez se ha aislado el ADN genómico o ADNc deseado, puede secuenciarse por procedimientos conocidos. Se reconoce en la técnica que dichos procedimientos están sujetos a errores, de modo que la secuenciación múltiple de la misma región es rutinaria y aún se espera que conduzca a tasas medibles de errores en la secuencia deducida  
45 resultante, particularmente en regiones que tienen dominios repetidos, estructura secundaria extensiva, o composiciones de bases inusuales, tales como regiones con un alto contenido de bases GC. Cuando surgen discrepancias, puede hacerse re-secuenciación y pueden emplearse procedimientos especiales. Los procedimientos especiales pueden incluir condiciones de secuenciación alterantes usando: diferentes temperaturas; diferentes enzimas; proteínas que alteran la capacidad de los oligonucleótidos de formar estructuras de orden mayor; nucleótidos alterados tales como ITP o dGTP metilado; diferentes composiciones de gel, por ejemplo añadiendo formamida; diferentes cebadores o cebadores localizados a diferentes distancias desde la región problemática; o  
50 diferentes moldes tales como ADN monocatenario. También puede emplearse secuenciación de ARNm.

Algo de o toda la secuencia codificante de un polipéptido que tiene actividad desaturasa puede ser de una fuente natural. En algunas situaciones, sin embargo, es deseable modificar todo o una parte de los codones, por ejemplo,  
55 para potenciar la expresión, empleando codones preferidos por el huésped. Los codones preferidos por el huésped pueden determinarse a partir de codones de la mayor frecuencia en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en una especie de huésped particular y/o tejido de interés. Por tanto, la secuencia codificante para un polipéptido que tiene actividad desaturasa puede sintetizarse por completo o en parte. Todo o partes del ADN también pueden sintetizarse para retirar cualquier secuencia o región desestabilizante de estructura secundaria que estaría presente en el ARNm transcrito. Todo o partes del ADN también pueden sintetizarse para alterar  
60 la composición de bases a una más preferible en la célula huésped deseada. Los procedimientos para sintetizar secuencias y poner secuencias juntas están bien establecidos en la bibliografía. Puede emplearse mutagénesis y



selección *in vitro*, mutagénesis dirigida al sitio, u otros medios para obtener mutaciones de genes de desaturasa de origen natural para producir un polipéptido que tenga actividad desaturasa *in vivo* con parámetros físicos y cinéticos más deseables para funcionar en la célula huésped, tales como semi-vida más larga o un tasa mayor de producción de un ácido graso poliinsaturado deseado.

5 Una vez se ha obtenido el polinucleótido que codifica un polipéptido de desaturasa, se coloca en un vector con capacidad de replicación en una célula hospedadora, o se propagad *in vitro* mediante técnicas tales como PCR o PCR larga. Los vectores de replicación pueden incluir plásmidos, fagos, virus, cósmidos y similares. Los vectores deseables incluyen aquellos útiles para mutagénesis del gen de interés o para la expresión del gen de interés en células huésped. La técnica de PCR larga ha hecho posible la propagación *in vitro* de construcciones grandes, de modo que las modificaciones al gen de interés, tales como mutagénesis o adición de señales de expresión, y propagación de las construcciones resultantes puede suceder completamente *in vitro* sin el uso de un vector de replicación o una célula huésped.

10 Para la expresión de un polipéptido desaturasa, las regiones funcionales de inicio y terminación de la transcripción y la traducción se unen de forma funcional al polinucleótido que codifica el polipéptido desaturasa. La expresión de la región codificante del polipéptido puede tener lugar *in vitro* o en una célula huésped. Las regiones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción se obtienen de una diversidad de fuentes no exclusivas, incluyendo el polinucleótido a expresar, genes conocidos o sospechosos de tener capacidad de expresión en el sistema deseado, vectores de expresión, síntesis química, o de un locus endógeno en una célula huésped.

15 La expresión en una célula huésped puede realizarse de un modo transitorio o estable. La expresión transitoria puede suceder a partir de construcciones introducidas que contienen señales de expresión funcionales en la célula huésped, pero dichas construcciones no se replican y raramente se integran en la célula huésped, o donde la célula huésped no es proliferante. La expresión transitoria también puede realizarse induciendo la actividad de un promotor regulable unido de forma funcional al gen de interés, aunque dichos sistemas inducibles frecuentemente muestran un bajo nivel basal de expresión. La expresión estable puede conseguirse mediante la introducción de una construcción que puede integrarse en el genoma huésped o que se replica de forma autónoma en la célula huésped. La expresión estable del gen de interés puede seleccionarse a través del uso de un marcador de selección localizado en o transfectado con la construcción de expresión, seguido de selección de células que expresan el marcador. Cuando la expresión estable resulta de la integración, la integración de construcciones puede suceder aleatoriamente dentro del genoma huésped o puede dirigirse a través del uso de construcciones que contienen regiones de homología con el genoma huésped suficiente para dirigir la recombinación con el locus huésped. Cuando las construcciones están dirigidas a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y la traducción pueden proporcionarse por el locus endógeno.

20 Cuando se desea la expresión aumentada del polipéptido desaturasa en el organismo fuente, pueden emplearse varios procedimientos. Pueden introducirse genes adicionales que codifican el polipéptido desaturasa en el organismo huésped. La expresión del locus desaturasa nativo también puede aumentarse a través de recombinación homóloga, por ejemplo insertando un promotor más fuerte en el genoma huésped para causar expresión aumentada, eliminando secuencias desestabilizantes del ARNm o la proteína codificada por delección de esa información del genoma huésped, o añadiendo secuencias estabilizantes al ARNm (patente de Estados Unidos N° 4.910.141).

25 Se contempla que puede introducirse más de un polinucleótido codificante de desaturasa o un polinucleótido codificante de más de una desaturasa y propagarse en una célula huésped a través del uso de vectores de expresión episómicos o integrados. Cuando se expresan dos o más genes a partir de vectores de replicación diferentes, es deseable que cada vector tenga un medio diferente de replicación. Cada construcción introducida, se integre o no, debe tener un medio diferente de selección y debe carecer de homología con otras construcciones para mantener la expresión estable y prevenir la redistribución de elementos entre las construcciones. Las elecciones sensatas de regiones reguladoras, medios de selección y procedimientos de propagación de la construcción introducida pueden determinarse experimentalmente de modo que todos los polinucleótidos introducidos se expresen a los niveles necesarios para proporcionar la síntesis de los productos deseados.

30 Cuando es necesario para la transformación, una secuencia codificante de desaturasa puede insertarse en un vector de transformación de plantas, por ejemplo el vector binario descrito por Bevan (1984). Los vectores de transformación de plantas pueden obtenerse modificando el sistema de transferencia génica natural de *Agrobacterium tumefaciens*. El sistema natural comprende plásmidos Ti grandes (que inducen tumores) que contienen un gran segmento, conocido como ADN T, que se transfiere a plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región vir, es responsable de la transferencia del ADN T. La región de ADN T está limitada por repeticiones terminales. En los vectores binarios modificados los genes que inducen tumor se han delecionado y las funciones de la región vir se utilizan para transferir ADN foráneo limitado por las secuencias límite del ADN T. La región T también contiene un marcador de selección para la resistencia a antibióticos, y un sitio de clonación múltiple para insertar secuencias para transferencia. Dichas cepas modificadas por ingeniería son conocidas como cepas de *A. tumefaciens* "desarmadas", y permiten la eficaz transformación de secuencias limitadas por la región T en los genomas nucleares de plantas.

La presente invención encuentra muchas aplicaciones. Sondas basadas en los polinucleótidos de la presente invención pueden encontrar uso en procedimientos para aislar moléculas relacionadas o en procedimientos para detectar organismos que expresan desaturasas. Cuando se usan como sondas, los polinucleótidos u oligonucleótidos deben ser detectables. Esto habitualmente se consigue uniendo un marcador en un sitio interno, por ejemplo mediante incorporación de un resto modificado, o en el extremo 5' o 3'. Dichos marcadores pueden ser directamente detectables, puede unirse a una molécula secundaria que está marcada de forma detectable, o pueden unirse a una molécula secundaria no marcada y una molécula terciaria marcada de forma detectable; este procedimiento puede prolongarse siempre que sea práctico para conseguir una señal satisfactoriamente detectable sin niveles inaceptables de señal de fondo. Los sistemas secundarios, terciarios, o de puente pueden incluir el uso de anticuerpos dirigidos contra cualquier otra molécula, incluyendo marcadores u otros anticuerpos, o pueden implicar moléculas cualesquiera que se unan entre sí, por ejemplo un sistema de biotina-estreptavidina/avidina. Los marcadores detectables típicamente incluyen isótopos radiactivos, moléculas que producen de forma química o enzimática o alteran la luz, enzimas que producen productos de reacción detectables, moléculas magnéticas, moléculas fluorescentes o moléculas cuya fluorescencia o características emisoras de luz cambian tras la unión. Pueden encontrarse ejemplos de procedimientos de marcaje en la patente de Estados Unidos Nº 5.011.770. Como alternativa, la unión de las moléculas diana puede detectarse directamente midiendo el cambio en el calor de la solución en el momento de la unión de sonda a la diana mediante calorimetría de titulación isotérmica, o recubriendo la sonda o la diana sobre una superficie y detectando el cambio en la dispersión de la luz desde la superficie producida por unión de la diana o sonda, respectivamente, como puede hacerse con el sistema BIAcore.

Pueden introducirse construcciones que comprenden el gen de interés en una célula huésped por técnicas convencionales. Por conveniencia, na célula huésped que se ha manipulado por cualquier procedimiento para captar una secuencia de ADN o construcción se mencionará como "transformada" o "recombinante" en el presente documento. El huésped objeto tendrá al menos una copia de la construcción de expresión y puede tener dos o más, por ejemplo, dependiendo de si el gen se integra en el genoma, se amplifica, o está presente en un elemento extracromosómico que tiene múltiples números de copia.

La célula huésped transformada puede identificarse por selección de un marcador contenido en la construcción introducida. Como alternativa, puede introducirse una construcción marcadora diferente con la construcción deseada, ya que muchas técnicas de transformación introducen muchas moléculas de ADN en células huésped. Típicamente, los huéspedes transformados se seleccionan por su capacidad de crecer en medio selectivo. Los medios selectivos pueden incorporar un antibiótico o carecer de un factor necesario para el crecimiento del huésped no transformado, tal como un nutriente o factor de crecimiento. Un gen marcador introducido por lo tanto puede conferir resistencia a antibiótico, o codificar un factor de crecimiento o enzima esencial, y permite el crecimiento en medio selectivo cuando se expresa en el huésped transformado. La selección de un huésped transformado también puede suceder cuando la proteína marcadora expresada puede detectarse, directa o indirectamente. La proteína marcadora puede expresarse sola o como una fusión con otra proteína. La proteína marcadora puede detectarse por su actividad enzimática; por ejemplo, la beta-galactosidasa can convertir el sustrato X-gal en un producto coloreado, y la luciferasa puede convertir la luciferina en un producto emisor de luz. La proteína marcadora puede detectarse por sus características productoras o modificadoras de luz; por ejemplo, la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* emite fluorescencia cuando se ilumina con luz azul. Pueden usarse anticuerpos para detectar la proteína marcadora o una marca molecular en, por ejemplo, una proteína de interés. Las células que expresar la proteína marcadora o marca pueden seleccionarse, por ejemplo, visualmente, o por técnicas tales como FACS o selección usando anticuerpos. De forma deseable, la resistencia a kanamicina y el amino glucósido G418 son de interés, así como la capacidad de crecer en medios que carecen de uracilo, leucina, lisina o triptófano.

Otro aspecto de la presente invención proporciona plantas transgénicas o descendencia de plantas que contienen el ADN aislado descrito en el presente documento. Las células vegetales pueden transformarse con uno o más ADN aislados que codifican  $\Delta 6$ - y  $\Delta 15$ -desaturasa por cualquier procedimiento de transformación de plantas. La célula vegetal transformada, a menudo en un cultivo de callo o disco foliar, se regenera en una planta transgénica completa por procedimientos bien conocidos para los especialistas en la técnica (por ejemplo, Horsch y col., 1985). Como la descendencia de plantas transformadas hereda el polinucleótido o polinucleótidos que codifican la desaturasa, pueden usarse semillas o esquejes de plantas transformadas para mantener la línea de planta transgénica.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para proporcionar plantas transgénicas con un contenido aumentado de GLA y/o SDA. En ciertas realizaciones de la invención, puede introducirse un ADN que codifica una  $\Delta 15$ - y/o  $\Delta 12$ -desaturasa en células vegetales con una  $\Delta 6$  desaturasa. Dichas plantas pueden también comprender o no actividad  $\Delta 12$ - y/o  $\Delta 15$ -desaturasa endógena. La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para proporcionar plantas de maíz transgénicas que contienen niveles elevados de PUFA incluyendo GLA y/o SDA, que están ausentes en plantas de maíz nativas. Pueden construirse vectores de expresión que comprenden ADN que codifica una  $\Delta 6$ -desaturasa, y/o a  $\Delta 12$ -desaturasa y/o una  $\Delta 15$ -desaturasa, por procedimientos de tecnología recombinante conocidos para los especialistas en la técnica (Sambrook y col., 2001).

Para suplementación en la dieta, pueden incorporarse los PUFA purificados, plantas o partes de plantas transformadas, o derivados de las mismas, en aceites de cocinado, grasas o margarinas formuladas de modo que en uso normal el destinatario recibiera la cantidad deseada. Los PUFA también pueden incorporarse en fórmulas para bebés, suplementos nutritivos u otros productos alimenticios, y pueden encontrarse uso como agentes anti-

inflamatorios o reductores de los niveles de colesterol.

Como se usa en el presente documento, "composición comestible" se define como composiciones que pueden ingerirse por un mamífero tales como productos alimenticios, sustancias nutricionales y composiciones farmacéuticas. Como se usa en el presente documento "productos alimenticios" se refiere a sustancias que pueden usarse o prepararse para su uso como alimentos para un mamífero e incluyen sustancias que pueden usarse en la preparación de alimentos (tales como aceites para freír) o aditivos alimenticios. Por ejemplo, los productos alimenticios incluyen animales usados para consumo humano o cualquier producto de los mismos tales como, por ejemplo, huevos. Los productos alimenticios típicos incluyen aunque sin limitación bebidas (por ejemplo, refrescos, bebidas carbonatadas, bebidas listas para mezclarse), alimentos de infusión (por ejemplo, frutas y hortalizas), salsas, condimentos, aliños de ensalada, zumos de frutas, jarabes, postres (por ejemplo, pudines, gelatina, glaseados y rellenos, productos horneados y postres congelados tales como helados y sorbetes), productos congelados blandos (por ejemplo, natas congeladas blandas, helados congelados blandos y yogures), coberturas congeladas blandas tales como coberturas batidas lácteas o no lácteas), aceites y productos emulsionados (por ejemplo, grasa alimentaria, margarina, mahonesa, mantequilla, aceite de cocinar, y aliños de ensalada) y alimentos de hidratación intermedia (por ejemplo, arroz y piensos para perros).

Un ejemplo de un producto alimenticio proporcionado por la invención es un alimento formulado para un animal de compañía. La expresión "animal de compañía" se refiere a un animal domesticado. El animal de compañía puede ser un mamífero en particular, e incluye específicamente, aunque sin limitación, perros, gatos, conejos, roedores, y caballos. Como se describe, el animal de compañía puede obtener beneficios para la salud mediante el consumo de dicho producto alimenticio que comprende aceite de semilla de acuerdo con la invención.

La formulación de productos alimenticios para animales es bien conocida para los especialistas en la técnica, incluyendo alimentos formulados para animales de compañía. En el área de alimentos para gatos y perros, por ejemplo, también se conocen alimentos hidratados para mascotas, alimentos semi-hidratados para mascotas, alimentos secos para mascotas y premios y aperitivos para mascotas. También están disponibles bebidas para mascotas tales como bebidas lácteas para gatos. Un alimento de hidratación intermedia, por ejemplo, generalmente tiene un contenido de humedad por encima del 20% mientras que un alimento hidratado tiene una humedad de al menos aproximadamente el 65%. Los alimentos semi-hidratados típicamente tienen un contenido de humedad entre aproximadamente el 20 a aproximadamente al 65% y pueden incluir humectantes tales como propilenglicol, sorbato potásico, y otros ingredientes para evitar el crecimiento microbiano (es decir, bacterias y mohos). Los alimentos hidratados para mascotas (croqueta) generalmente tienen un contenido de humedad por debajo de aproximadamente el 20%, y su producción puede incluir extrusión, secado y/o cocción en calor. Los premios y aperitivos para mascotas a menudo son premios o aperitivos masticables semi-hidratados; premios o aperitivos secos en cualquiera de varias configuraciones o formas; huesos masticables; premios horneados, extruidos o impresos; premios/aperitivos de confitería; u otros tipos de premios, como se sabe bien en la técnica.

Un producto alimenticio para mascotas de hidratación intermedia puede incluir ingredientes tales como granos de cereal, carnes, grasas, vitaminas, minerales, agua e ingredientes funcionales que se mezclan, cocinan y envasan juntos. Sin embargo, puede usarse cualquier formulación de alimento semi-hidratado para mascotas conocido para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, puede formarse un alimento para mascotas añadiendo, en una base de materia seca, aproximadamente el 5-40% en peso de proteína; aproximadamente el 5-45% en peso de grasa; aproximadamente el 0,1-12% en peso de fibra; aproximadamente el 1-90% en peso de carbohidrato, y aproximadamente el 0,1-2% en peso de un ingrediente funcional. Una composición de aceite de la invención puede añadirse en cualquier cantidad deseada, por ejemplo, en aproximadamente el 1-50% en peso, incluyendo aproximadamente el 1-30% y aproximadamente el 3-15%. Pueden hacerse variaciones en base a las características deseadas del producto final, como saben bien los especialistas en la técnica.

Además, las composiciones comestibles descritas en el presente documento también pueden ingerirse como un aditivo o suplemento contenido en alimentos y bebidas. Éstas pueden formularse junto con una sustancia nutricional tal como diversas vitaminas y minerales e incorporarse en composiciones sustancialmente líquidas tales como bebidas nutritivas, leches de soja y sopas; composiciones sustancialmente sólidas; y gelatinas o usarse en forma de un polvo a incorporarse en diversos alimentos. El contenido del ingrediente eficaz en dicho alimento funcional o para la salud puede ser similar a la dosis contenida en un agente farmacéutico típico.

Los PUFA purificados, plantas o partes de plantas transformadas también pueden incorporarse en pienso de animales, particularmente ganado. De este modo, los propios animales pueden beneficiarse de una dieta rica en PUFA, mientras que los consumidores humanos de productos alimenticios producidos a partir de dicho ganado pueden beneficiarse también. Se espera en ciertas realizaciones que el SDA se convierta en EPA en animales y por tanto dichos animales pueden beneficiarse de un aumento en EPA mediante el consumo de SDA.

Para uso farmacéutico (humano o veterinario), las composiciones generalmente pueden administrarse por vía oral pero pueden administrarse por cualquier vía mediante la cual puedan absorberse satisfactoriamente, por ejemplo, por vía parenteral (es decir subcutánea, intramuscular o intravenosa), rectal, vaginal o tópica, por ejemplo, como una pomada o loción cutánea. Los PUFA, plantas o partes de plantas transformadas de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando están

disponibles, las cápsulas de gelatina son la forma preferida de administración oral. La suplementación en la dieta como se ha expuesto anteriormente también puede proporcionar una vía oral de administración. Los ácidos insaturados de la presente invención pueden administrarse en formas conjugadas, o como sales, ésteres, amidas o profármacos de los ácidos grasos. Se desvela en el presente documento cualquier sal farmacéuticamente aceptable, son especialmente preferidas las sales de sodio, potasio o litio. También se desvelan las sales de N-alquilpolihidroxamina, tales como N-metil glucamina, encontradas en la publicación PCT WO 96/33155. Los ésteres preferidos son los ésteres de etilo. Como sales sólidas, los PUFA también pueden administrarse en forma de comprimido. Para administración intravenosa, los PUFA o derivados de los mismos pueden incorporarse en formulaciones comerciales tales como Intralípidos.

Se proporcionan secuencias codificantes o fragmentos de las mismas unidas de forma funcional a un promotor heterólogo, en orientación con sentido o antisentido. También se proporcionan construcciones de expresión que comprenden estas secuencias, y también plantas y células vegetales transformadas con las secuencias. La construcción de construcciones que pueden emplearse junto con técnicas de transformación de plantas usando éstas u otras secuencias de acuerdo con la invención serán bien conocidas para los especialistas en la técnica a la luz de la presente divulgación (véase, por ejemplo, Sambrook y *col.*, 2001; Gelvin y *col.*, 1990).

Un uso de las secuencias desveladas en el presente documento será en la alteración de la composición de aceite. El gen de la desaturasa puede proporcionarse con otras secuencias. Cuando se emplea una región codificante expresable que no es necesariamente una región codificante marcadora en combinación con una región codificante marcadora, pueden emplearse las regiones codificantes diferentes en el mismo segmento de ADN o en diferentes segmentos de ADN para la transformación. En el último caso, los diferentes vectores se suministran de forma concurrente a las células destinatarias para maximizar la cotransformación.

La elección de cualquier elemento adicional usado junto con las secuencias codificantes de desaturasa a menudo dependerá del propósito de la transformación. Uno de los propósitos principales de transformación de plantas de cultivo es añadir rasgos agrónomicamente importantes comercialmente deseables, a la planta. Como se sabe que los PUFA confieren muchos efectos beneficiosos a la salud, aumentos concomitantes en la producción de SDA también pueden ser beneficiosos y podrían conseguirse mediante la expresión de  $\Delta 6$ -desaturasa de *Primula*. Dicho aumento de SDA puede comprender, en ciertas realizaciones de la invención, la expresión de  $\Delta 12$  y/o  $\Delta 15$  desaturasa.

Los vectores usados para la transformación de plantas pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, YAC (cromosomas artificiales de levadura), BAC (cromosomas artificiales de bacterias) o cualquier otro sistema de clonación adecuado, así como fragmentos de ADN de los mismos. Por tanto, cuando se usa el término "vector" o "vector de expresión", se incluyen todos los tipos anteriores de vectores, así como secuencias de ácido nucleico aisladas de los mismos. Se contempla que la utilización de sistemas de clonación con capacidades de insertos grandes permitirá la introducción de grandes secuencias de ADN que comprenden más de un gen seleccionado. Esto podría usarse para introducir diversos ácidos nucleicos codificantes de desaturasa. La introducción de dichas secuencias puede facilitarse mediante el uso de cromosomas artificial de bacterias o levaduras (BAC o YAC, respectivamente), o incluso cromosomas artificiales de plantas. Por ejemplo, se desveló el uso de BAC para transformación mediada por *Agrobacterium* por Hamilton y *col.* (1996).

Son particularmente útiles para la transformación los casetes de expresión que se han aislado de dichos vectores. Los segmentos de ADN usados para transformar células vegetales generalmente comprenderán, por supuesto, el ADNc, gen o genes que se desea introducir en y expresar en las células huésped. Estos segmentos de ADN pueden incluir adicionalmente estructuras tales como promotores, potenciadores, polienlazadores, o incluso genes reguladores según se desee. El segmento de ADN o gen elegido para introducción celular a menudo codificará una proteína que se expresará en las células recombinantes resultantes produciendo un rasgo investigable o seleccionable y/o que conferirá un fenotipo mejorado a la planta transgénica resultante. Sin embargo, éste puede no ser siempre el caso, y también se desvelan plantas transgénicas que incorporan transgenes no expresados. Los componentes preferidos a incluir probablemente con los vectores desvelados en el presente documento son los siguientes.

La secuencia de ADN entre el sitio de inicio de la transcripción y el inicio de la secuencia codificante, es decir, la secuencia líder no traducida, también puede influir en la expresión génica. Por tanto se puede desear el empleo de una secuencia líder particular con la construcción de transformación. Se contempla que las secuencias líder preferidas incluyen aquellas que comprenden secuencias predichas para dirigir la expresión óptima del gen unido, es decir, para incluir una secuencia líder consenso preferida que puede aumentar o mantener la estabilidad del ARNm y evitar el inicio inapropiado de la traducción. La elección de dichas secuencias será conocida para los especialistas en la técnica a la luz de la presente divulgación. Las secuencias que se obtienen de genes que se expresan altamente en plantas serán típicamente preferidas.

Las construcciones de transformación preparadas de acuerdo con la invención típicamente incluirán una secuencia de ADN en el extremo 3' que actúa como señal para terminar la transcripción y permitir la poliadenilación del ARNm producido por las secuencias codificantes unidas de forma funcional a un gen de desaturasa (por ejemplo, ADNc). En una realización de la invención, se usa el terminado nativo de un gen de desaturasa. Como alternativa, un

extremo 3' heterólogo puede potenciar la expresión de regiones codificantes de desaturasa. Ejemplos de terminadores considerados útiles incluyen aquellos del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (extremo 3' de nos) (Bevan y col., 1983), el extremo 3' de los genes de inhibidor I o II de proteasa de patata o tomate y el terminador de CaMV 35S. Pueden incluirse adicionalmente elementos reguladores tales como un intrón Adh (Callis y col., 1987), intrón de la sacarosa sintasa (Vasil y col., 1989) o elemento omega de TMV (Gallie y col., 1989), donde se desee.

Se cree que los procedimientos adecuados para la transformación de células vegetales u otras células para su uso con la presente invención incluyen casi cualquier procedimiento por el cual puede introducirse ADN en una célula, tal como por suministro directo de ADN tal como por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993), por captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus y col., 1985), por electroporación (patente de Estados Unidos N° 5.384.253), por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler y col., 1990; patentes de Estados Unidos N° 5.302.523 y 5.464.765), por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de Estados Unidos N° 5.591.616 y 5.563.055) y por aceleración de partículas recubiertas con ADN (patentes de Estados Unidos N° 5.550.318; 5.538.877 y 5.538.880). A través de la aplicación de técnicas tales como éstas, pueden transformarse de forma estable las células de casi cualquier especie de planta, y desarrollarse estas células en plantas transgénicas.

Después de realizar el suministro de ADN exógeno a las células destinatarias, las siguientes etapas generalmente conciernen a la identificación de las células transformadas para cultivo adicional y regeneración de la planta. Para mejorar la capacidad de identificar transformantes, se puede desear el empleo de un gen marcador de selección o exploración con un vector de transformación preparado de acuerdo con la invención, que es bien conocido en la técnica. En este caso, entonces generalmente se ensayaría la población celular potencialmente transformada por exposición de las células a un agente o agentes selectivos, o se seleccionarían las células por el rasgo del gen marcador deseado.

Además de la transformación directa de un genotipo vegetal particular con una construcción preparada de acuerdo con la presente invención, pueden prepararse plantas transgénicas cruzando una planta que tenga un ADN seleccionado de la invención con una segunda planta que carezca del ADN. También pueden usarse técnicas de reproducción de plantas para introducir múltiples desaturasas, por ejemplo  $\Delta 6$ ,  $\Delta 12$ , y/o  $\Delta 15$ -desaturasa en una única planta. De este modo, el producto de una reacción de  $\Delta 6$ -desaturasa puede aumentarse de forma eficaz. Creando plantas homocigóticas para un gen de  $\Delta 6$ -desaturasa y/u otros genes de desaturasa (por ejemplo, genes de  $\Delta 12$ - y/o  $\Delta 15$ -desaturasa) pueden aumentarse metabolitos beneficiosos en la planta.

Como se ha expuesto anteriormente, puede introducirse un gen de desaturasa seleccionado en una variedad de planta particular cruzando, sin la necesidad de transformar nunca directamente una planta de esa variedad dada. Por lo tanto, también se revela no solamente una planta directamente transformada o regenerada a partir de células que se han transformado de acuerdo con la presente invención, sino también la descendencia de dichas plantas. Como se usa en el presente documento el término "descendencia" se refiere a los descendientes de cualquier generación de una planta precursora preparada de acuerdo con la presente invención, donde la descendencia comprende una construcción de ADN seleccionada preparada de acuerdo con la invención. "Cruzar" una planta para proporcionar una línea de plantas que tenga uno o más transgenes o alelos añadidos respecto a una línea de partida de plantas, como se desvela en el presente documento, se define como las técnicas que provocan que una secuencia particular se introduzca en una línea de plantas por cruce de una línea de partida con una planta donante que comprende un transgén o alelo de la invención. Para conseguir esto se podrían realizar, por ejemplo, las siguientes etapas: (a) plantar semillas de la primera (línea de partida) y segunda (línea de planta donante que comprende un transgén o alelo deseado) plantas precursoras; (b) cultivar las semillas de la primera y segunda plantas precursoras en plantas que albergan flores; (c) polinizar una flor de la primera planta precursora con polen de la segunda planta precursora; y (d) recoger las semillas producidas en la planta precursora que alberga la flor fertilizada.

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

La introgresión de un elemento de ADN en un genotipo vegetal se define como el resultado del procedimiento de conversión por retrocruzamiento. Un genotipo vegetal en que se ha introducido por introgresión una secuencia de ADN puede mencionarse como genotipo, línea, endogámico, o híbrido convertido por retrocruzamiento. Asimismo un genotipo vegetal que carece de la secuencia de ADN deseada puede mencionarse como genotipo, línea, endogámico, o híbrido no convertido.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar realizaciones de la invención. Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones son con fines ilustrativos.

### Ejemplo 1

#### 5 Vectores para la expresión de $\Delta 15$ - y $\Delta 6$ -desaturasas en maíz

Se construyó un vector binario para expresar una  $\Delta 15$ -desaturasa y una  $\Delta 6$ -desaturasa en embrión y tejido aleurona de maíz. Esta construcción se preparó con el promotor de globulina dirigiendo la expresión de una  $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* mutagenizada para aumentar su expresión en una monocotiledónea tal como maíz (SEC ID N° 5) y de una  $\Delta 6$  desaturasa de *Mortierella alpina* (SEC ID N° 6, pb 71-1444) (patente de Estados Unidos N° 6.075.183). La  $\Delta 6$  desaturasa de *M. alpina* se clonó en un vector lanzadera que contenía el promotor de globulina, pMON67624, produciendo pMON82809. La  $\Delta 15$  desaturasa de *N. crassa* mutagenizada se clonó en un vector lanzadera que contenía el promotor de globulina, pMON67624, produciendo pMON82810.

Los dos casetes de expresión de globulina y desaturasa después se clonaron en el vector binario de maíz pMON30167 que contenía el gen marcador CP4 para resistencia a glifosato. El primer casete de expresión que contiene la  $\Delta 6$  desaturasa de *M. alpina* se clonó en pMON30167, produciendo pMON82811. El segundo casete de expresión que contenía la  $\Delta 15$  desaturasa de *N. crassa* mutagenizada después se clonó en pMON82811, produciendo la construcción de transformación de maíz pMON82812 (FIG. 1). Se obtienen explantes transformados mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas se regeneran a partir de tejido transformado. Las plantas cultivadas en invernadero después se analizan para la composición de aceite.

Se construyó otro vector binario, pMON78175 para expresar una  $\Delta 15$ -desaturasa y una  $\Delta 6$ -desaturasa en embrión y tejido aleurona de maíz. Para generar el vector binario, se amplificó por PCR un casete de expresión que contenía la  $\Delta 15$  desaturasa de *N. crassa* (SEC ID N° 5) bajo el control del promotor de globulina usando pMON82812 como molde, se clonó en un vector lanzadera, y se verificó la secuencia del casete. El casete de expresión que contenía la  $\Delta 6$ -desaturasa de *P. juliae* (SEC ID N° 7) dirigida por el promotor de globulina se generó por PCR. Como parte de este procedimiento, se cambiaron los nucleótidos que preceden inmediatamente al codón de inicio ATG de la  $\Delta 6$ -desaturasa de *P. juliae* a CAGCC, para generar una región de inicio de la traducción optimizada para la expresión génica en plantas monocotiledóneas tales como maíz. Usando procedimientos convencionales de restricción y ligamiento que están bien establecidos en la técnica, se clonaron posteriormente la  $\Delta 6$ -desaturasa de *P. juliae* y la  $\Delta 15$  desaturasa de *N. crassa* en un vector binario que albergaba un casete de expresión de CP4 como marcador de selección para generar el vector de transformación de maíz, pMON78175 (FIG. 2). Los explantes transformados se obtienen mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas se regeneran a partir del tejido transformado. Las plantas cultivadas en invernadero después se analizan para la composición de aceite.

### Ejemplo 2

#### 35 Vector para la expresión de una $\Delta 6$ desaturasa de *Primula juliae* de secuencia optimizada para monocotiledóneas en maíz

Este ejemplo expone el diseño y construcción de una molécula polinucleotídica de  $\Delta 6$  desaturasa de *Primula juliae* modificada para su expresión en plantas monocotiledóneas. Es bien sabido en la técnica que las secuencias que codifican proteína no endógena pueden no expresarse bien en plantas (patente de Estados Unidos N° 5.880.275). Por lo tanto, usando una secuencia polipeptídica PjD6D nativa (SEC ID N° 3), se diseñó y construyó una secuencia polipeptídica codificante de proteína PjD6D artificial por 1) uso de una desviación de uso de codones similar a la de proteínas de monocotiledóneas altamente expresadas, y por 2) eliminación de elementos desestabilizantes del ARN previamente caracterizados y conocidos por afectar a la estabilidad del ARNm *in planta* (patente de Estados Unidos N° 5.880.275). La secuencia polinucleotídica de PjD6D modificada resultante se denominó PjD6Dnno (SEC ID N° 8) y codifica un polipéptido idéntico en secuencia al polipéptido PjD6D nativo (SEC ID N° 3).

Se construyó un vector binario, pMON78171 para expresar una  $\Delta 15$ -desaturasa y la  $\Delta 6$ -desaturasa modificada en secuencia en embrión y tejido aleurona de maíz. Para generar el vector binario, se amplificó por PCR un casete de expresión que contenía la  $\Delta 15$  desaturasa de *N. crassa* (SEC ID N° 5) bajo el control del promotor de globulina usando pMON82812 como molde, se clonó en un vector lanzadera, y se verificó la secuencia del casete. El casete de expresión que contenía la  $\Delta 6$ -desaturasa de *P. juliae* (SEC ID N° 9) dirigida por el promotor de globulina se generó por PCR. Como parte de este procedimiento, se cambiaron los nucleótidos que preceden inmediatamente el codón de inicio ATG de la  $\Delta 6$ -desaturasa de *P. juliae* a CAGCC, para generar una región de inicio de la traducción optimizada para la expresión génica en plantas monocotiledóneas, tales como maíz. Usando procedimientos convencionales de restricción y ligamiento que están bien establecidos en la técnica se clonaron posteriormente la  $\Delta 6$ -desaturasa de *P. juliae* y la  $\Delta 15$  desaturasa de *N. crassa* en un vector binario que albergaba un casete de expresión de CP4 como marcador de selección para generar el vector de transformación de maíz, pMON78171 (FIG. 3). Los explantes transformados se obtienen mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas se regeneran a partir del tejido transformado. Las plantas cultivadas en invernadero después se analizan para la composición de aceite.

**Ejemplo 3****Análisis de ácidos grasos**

Se determinó la composición de ácidos grasos de granos maduros que expresaban pMON82812 moliendo granos de maíz y extrayendo el homogeneizado con heptano. El extracto de heptano se trató con tolueno que contenía triheptadecanoína a 0,25 mg/ml y metóxido sódico en metanol (0,6 N). La reacción se detuvo con cloruro sódico acuoso (10% p/vol). Después de repartir a temperatura ambiente, la fase orgánica se analizó por GLC (Hewlett Packard modelo 6890 (120 voltios) equipado con una entrada de capilar con/sin fraccionamiento (250°C) y un detector de ionización de llama (270°C). La columna era una Supelco 24077 (0,25 mm d.e. x 15 m de longitud) con una fase estacionaria de polietilenglicol pegada de 0,25 mm. Los ésteres metílicos de ácido graso se identifican por comparación del tiempo de retención con patrones comercial. Las composiciones porcentuales en peso cualitativas se calculan como porcentajes de área de picos identificados. Los resultados del análisis para los granos que mostraban SDA y GLA se dan en la Tabla 1. No se encontraron granos inválidos parciales que contuvieran solamente GLA. Globalmente, más de dos tercios de los granos analizados contenían GLA y SDA. El análisis de un grano maduro del evento ZM\_103111:@, que se transformó con pMON82812, demostró un 9,68% de SDA.

15 **TABLA 1: Análisis de ácidos grasos de granos de maíz maduros individuales que expresan SDA y/o GLA**

Linaje	Gen	Oleico (18:1)	LA (18:2)	GLA (18:3)	ALA (18:3)	SDA (18:4)
ZM_S103111:@.	R1	26,08	13,62	0,91	26,44	9,68
ZM_S103432:@.	R1	23,63	14,87	0,85	30,17	8,56
ZM_S103121:@.	R1	27,39	16,2	1,14	27,61	5,8
ZM_S103432:@.	R1	21,44	14,11	0,68	36,19	5,79
ZM_S103111:@.	R1	25,5	16,36	0,61	30,56	5,19
ZM_S103435/LH244	F1	22,3	16,98	0,99	33,28	4,81
ZM_S103435/LH244	F1	23,85	19,52	0,84	29,91	4,21
ZM_S103121:@.	R1	26,2	15,07	1,11	32,29	3,93
ZM_S103432:@.	R1	20,38	18,37	0,85	35,49	3,84
ZM_S103121:@.	R1	25,07	17,73	0,77	30,96	3,78
ZM_S103110:@.	R1	21,57	18,99	0,68	34,07	3,69
ZM_S103432:@.	R1	19,99	19,61	0,78	34,71	3,69
ZM_S103110:@.	R1	22,17	18,57	0,58	34,81	3,67
ZM_S103427:@.	R1	18,42	23,76	1,01	32,27	3,61
ZM_S103435/LH244	F1	20,83	19,3	0,68	34,71	3,53
ZM_S103427:@.	R1	19,17	25,22	1,53	30,79	3,53
ZM_S103110:@.	R1	22,12	17,73	0,79	34,38	3,48
ZM_S103099/LH244	F1	20,26	21,88	0,75	32,13	3,4
ZM_S103432:@.	R1	16,98	18,61	0,8	40,32	3,27
ZM_S103432:@.	R1	21,18	19,65	0,73	34,34	3,25
ZM_S103111:@.	R1	24,59	19,08	0,35	30,79	3,23
ZM_S103111:@.	R1	21,29	19,93	0,71	33,77	3,23
ZM_S103099/LH244	F1	21,11	23,29	0,79	30,95	3,21
ZM_S103432:@.	R1	18,2	18,81	0,61	38,94	3,19

ES 2 541 537 T3

(continuación)

Linaje	Gen	Oleico (18:1)	LA (18:2)	GLA (18:3)	ALA (18:3)	SDA (18:4)
ZM_S103435/LH244	F1	21,27	19,75	0,7	34,33	3,13
ZM_S103432:@.	R1	20,8	21,47	0,76	33,59	3,12
ZM_S103121:@.	R1	23,71	18,96	0,75	31,97	3,1
ZM_S103121:@.	R1	23,81	17,28	0,98	33,75	3,07
ZM_S103099/LH244	F1	19,64	21,46	0,7	34,49	2,99
ZM_S103121:@.	R1	23,83	16,72	1,01	34,5	2,93
ZM_S103427:@.	R1	16,68	26,92	1,03	30,59	2,87
ZM_S103168/LH244	F1	18,58	23,81	1,34	32,42	2,87
ZM_S103432:@.	R1	17,94	18,89	0,72	39,8	2,84
ZM_S103110:@.	R1	20,14	19,32	0,58	36,65	2,77
ZM_S103111:@.	R1	20,57	19,13	0,34	36,1	2,7
ZM_S103168/LH244	F1	20,04	25,44	1,26	30,32	2,69
ZM_S103110:@.	R1	21,6	19,78	0,61	35,15	2,66
ZM_S103099/LH244	F1	21,06	23,54	0,67	31,49	2,58
ZM_S103435/LH244	F1	19,26	22,53	0,9	34,92	2,53
ZM_S103433/LH244	F1	22,95	20,01	0,39	33,51	2,47
ZM_S103168/LH244	F1	19,39	26,31	1,23	31,06	2,4
ZM_S103110:@.	R1	18,05	22,96	0,65	35,53	2,39
ZM_S103110:@.	R1	18,99	21,92	0,65	35,22	2,38
ZM_S103111:@.	R1	17,14	22,59	0,71	36,95	2,32
ZM_S103433/LH244	F1	23,64	19,84	0,38	33,12	2,29
ZM_S103436/LH244	F1	20,71	26,64	1,07	28,11	2,26
ZM_S103435/LH244	F1	21,89	21,12	0,6	33,35	2,24
ZM_S103110:@.	R1	22,59	28,35	0,52	25,05	2,15
ZM_S103168/LH244	F1	19,41	27,76	1,19	28,96	2,14
ZM_S103168/LH244	F1	17,81	28,33	1,28	31,34	2,1
ZM_S103097/LH244	F1	18,61	25,34	1,19	31,88	2,09
ZM_S103168/LH244	F1	20,08	28,05	1,27	28,28	2,06
ZM_S103433/LH244	F1	20,11	19,18	0,38	38,29	2,04
ZM_S103427:@.	R1	18,38	30,32	1,19	26,79	1,98
ZM_S103427:@.	R1	20,06	29,56	1,13	27,23	1,95
ZM_S103436/LH244	F1	19,82	28,13	0,89	28,57	1,94
ZM_S103110:@.	R1	18,74	22,83	0,72	35,29	1,91



ES 2 541 537 T3

(continuación)

Linaje	Gen	Oleico (18:1)	LA (18:2)	GLA (18:3)	ALA (18:3)	SDA (18:4)
ZM_S103433/LH244	F1	21,69	21,09	0,4	34,71	1,9
ZM_S103430/LH244	F1	23,25	25,64	0,92	27,64	1,89
ZM_S103099/LH244	F1	17,77	25,43	0,61	33,61	1,88
ZM_S103111:@.	R1	21,04	22,99	0,29	31,6	1,86
ZM_S103168/LH244	F1	18,19	27,7	1,18	31,55	1,86
ZM_S103099/LH244	F1	18,24	23,16	0,65	35,78	1,85
ZM_S103435/LH244	F1	21,02	27,67	0,88	28,27	1,83
ZM_S103433/LH244	F1	21,7	21,08	0,39	34,49	1,8
ZM_S103097/LH244	F1	20,11	26,32	1,08	29,94	1,8
ZM_S103427:@.	R1	16,95	30,23	1,08	30,11	1,8
ZM_S103437/LH244	F1	23,93	26,23	1,12	25,86	1,78
ZM_S103437/LH244	F1	23,5	26,49	0,99	26,32	1,77
ZM_S103168/LH244	F1	19,4	27,81	1,06	30,29	1,74
ZM_S103427:@.	R1	17,94	30,11	1,17	29,42	1,74
ZM_S103103/LH244	F1	21,32	31,31	1,16	24,36	1,66
ZM_S103433/LH244	F1	20,48	21,06	0,41	35,4	1,64
ZM_S103437/LH244	F1	19,71	26,4	1,06	31,7	1,6
ZM_S103433/LH244	F1	18,98	21,89	0,36	37,18	1,59
ZM_S103430/LH244	F1	21,41	26,76	0,91	27,06	1,56
ZM_S103437/LH244	F1	18,67	28,15	1,07	30,71	1,56
ZM_S103097/LH244	F1	19,97	28,13	1,18	28,16	1,55
ZM_S103436/LH244	F1	19,29	31,27	0,79	25,74	1,53
ZM_S103430/LH244	F1	22,43	25,58	0,81	28,41	1,53
ZM_S103430/LH244	F1	18,48	27,25	1,05	31,73	1,53
ZM_S103103/LH244	F1	21,25	31,91	1,13	24,06	1,53
ZM_S103435/LH244	F1	20,92	27,87	0,82	27,48	1,51
ZM_S103121:@.	R1	20	24,11	0,99	33,48	1,5
ZM_S103103/LH244	F1	20,9	31,44	1,08	25,09	1,5
ZM_S103103/LH244	F1	20,06	32,22	1,04	25,4	1,4
ZM_S103103/LH244	F1	20,02	33,05	1,09	24,5	1,39
ZM_S103097/LH244	F1	18,78	28,78	1,03	29,82	1,31
ZM_S103111:@.	R1	19,23	27,51	0,62	29,58	1,25
ZM_S103436/LH244	F1	18,53	30,87	0,66	27,55	1,22

ES 2 541 537 T3

(continuación)

Linaje	Gen	Oleico (18:1)	LA (18:2)	GLA (18:3)	ALA (18:3)	SDA (18:4)
LH244/ZM_S103431	F1	20,88	23,22	0,34	32,46	1,19
LH244/ZM_S103431	F1	20,07	25,05	0,35	33,01	1,19
ZM_S103436/LH244	F1	20,39	31,62	0,69	26,02	1,16
ZM_S103111:@.	R1	20,48	24,18	0,47	32,33	1,11
ZM_S103435/LH244	F1	20,4	26,7	0,52	31,26	1,09
ZM_S103436/LH244	F1	19,35	31,69	0,71	27,3	1,08
LH244/ZM_S103431	F1	19,75	23,35	0,26	33,86	0,98
ZM_S103436/LH244	F1	20,11	32,54	0,71	26,25	0,96
ZM_S103430/LH244	F1	18,87	29,25	0,7	30,17	0,95
LH244/ZM_S103431	F1	21,18	25,86	0,2	29,33	0,87
LH244/ZM_S103098	F1	21,77	24,64	0,15	32,57	0,81
LH244/ZM_S103105	F1	17,72	32,84	0,41	27,61	0,68
ZM_S143434/LH244	F1	20,34	26,19	0,3	31,48	0,6
ZM_S103434/LH244	F1	21,59	26,44	0,28	29,99	0,58
ZM_S103434/LH244	F1	20,22	27,13	0,31	30,47	0,58
LH244/ZM_S103098	F1	19,29	27,08	0,19	33,6	0,52
ZM_S103434/LH244	F1	19,24	28,24	0,26	31,45	0,51
LH244/ZM_S103105	F1	17,73	34,46	0,44	27,24	0,5
LH244/ZM_S103431	F1	19,12	31,08	0,24	27,77	0,47
ZM_S103434/LH244	F1	17,63	29,39	0,24	32,47	0,38
LH244/ZM_S103105	F1	18,37	36,34	0,36	24,68	0,33
LH244/ZM_S103105	F1	18,62	38,05	0,34	22,84	0,27
ZM_S103110:@.	R1	18,35	57,16	0	2,25	0
LH244/ZM_S103098	F1	19,18	58,95	0	1,78	0
LH244/ZM_S103098	F1	19,35	58,56	0	1,79	0
LH244/ZM_S103098	F1	19,17	59,15	0	1,8	0
LH244/ZM_S103098	F1	16,76	62,23	0	1,81	0
LH244/ZM_S103098	F1	18,39	59,37	0	1,88	0
LH244/ZM_S103098	F1	18,26	59,91	0	1,96	0
LH244/ZM_S103098	F1	17,14	61,34	0	2,06	0
LH244/ZM_S103098	F1	16,65	61,17	0	2,39	0

El análisis de ácidos grasos de eventos generados por transformación con pMON78171 se muestra en la siguiente Tabla 2. Se analizaron diez semillas R1 o F1 maduras para su composición de ácidos grasos como anteriormente, y

## ES 2 541 537 T3

se calculó la composición promedio de ácidos grasos a partir de esos números, excluyendo los inválidos. El evento de mejor rendimiento obtenido con vector pMON78171 contenía en promedio el 28,6% de SDA, y el 2,2% de GLA. La semilla individual de maíz de mejor rendimiento contenía el 32,9% de SDA y el 3,5% de GLA.

TABLA 2: Análisis de ácidos grasos de granos de maíz maduros

Linaje	Gen	Oleico	LA	GLA	ALA	SDA
ZM_S126797:@.	R1	21,34	12,92	3,53	13,49	32,92
ZM_S126797:@.	R1	22,11	12,12	3,3	14,12	32,58
ZM_S126797:@.	R1	21,91	12,87	3,5	13,1	32,28
ZM_S127034:@.	R1	23,26	9,86	1,22	17,05	31,2
ZM_S126797:@.	R1	24,07	14,98	3,24	13,06	28,74
ZM_S128026/LH244	F1	21,96	16,99	3,24	12,69	28,5
ZM_S127034:@.	R1	24,15	11,3	1,2	18,06	28,19
ZM_S129919:@.	R1	21,79	17,34	2,43	14,1	28,19
ZM_S127034:@.	R1	27,39	9,56	1,28	16,03	28,04
ZM_S127034:@.	R1	29,01	9,8	1,19	15,19	27,41
ZM_S128026/LH244	F1	22,35	17,95	3,58	12,5	26,93
ZM_S129919:@.	R1	20,77	19,48	3,02	14,79	26,51
ZM_S127034:@.	R1	25,09	12,21	1,29	17,85	26,4
ZM_S127034:@.	R1	22,99	15,22	1,3	18,47	25,87
ZM_S126797:@.	R1	21,95	19,77	4,66	11,88	25,81
ZM_S127034:@.	R1	26,95	13,34	1,35	15,95	25,62
ZM_S126797:@.	R1	20,94	20,76	4,4	13,5	24,7
ZM_S126790/LH244	F1	24,46	19,05	2,71	13,05	24,57
ZM_S128026/LH244	F1	23,44	19,46	3,71	12,28	24,24
ZM_S126797:@.	R1	21,41	22,02	4,87	11,41	23,95
ZM_S126808:@.	R1	25,61	18,44	2,38	14,16	23,81
ZM_S126797:@.	R1	22,74	20,52	4,23	12,86	23,8
ZM_S126797:@.	R1	20,95	22,77	4,76	11,94	23,74
ZM_S126808:@.	R1	22	19,57	2,76	16,21	23,64
ZM_S129919:@	R1	21,49	23,45	2,95	13,33	22,4
ZM_S128026/LH244	F1	23,12	22,18	3,87	12,33	22,34
ZM_S126797:@.	R1	21,51	24,35	4,56	12	21,82
ZM_S126790/LH244	F1	25,99	20,48	2,46	13,48	21,71
ZM_S126995/LH244	F1	24,4	22,45	2,12	14,26	20,03
ZM_S126790/LH244	F1	24,33	23,6	2,87	13,24	19,76
ZM_S126790/LH244	F1	24,24	24,08	2,88	12,74	19,44

ES 2 541 537 T3

(continuación)

Linaje	Gen	Oleico	LA	GLA	ALA	SDA
ZM_S126995/LH244	F1	29,51	20,1	1,96	12,44	19,17
ZM_S126800/LH244	F1	26,18	24,62	3,01	11,52	18,9
ZM_S126800/LH244	F1	24,35	26,28	3,26	10,89	18,56
ZM_S129919:@.	R1	21,87	27,84	2,77	12,76	18,28
ZM_S126995/LH244	F1	26,78	24,15	2,09	11,97	18,26
ZM_S129919:@.	R1	21,22	28,87	3	12,33	18,18
ZM_S126800/LH244	F1	23,23	27,22	3,54	11,35	17,98
ZM_S126790/LH244	F1	22,01	28,63	3,36	12,63	17,78
ZM_S126995/LH244	F1	26,48	23,9	1,84	12,93	17,78
ZM_S126800/LH244	F1	26,6	25,01	2,72	11,7	17,54
ZM_S126995/LH244	F1	25,83	25,52	2,12	12,59	17,15
ZM_S129919:@.	R1	21,8	30	2,79	11,51	16,89
ZM_S129919:@.	R1	20,77	31,81	3,03	11,33	16,65
ZM_S126808:@.	R1	22,22	30,61	2,64	11,91	16,07
ZM_S126808:@.	R1	22,6	30,58	2,5	11,72	15,54
ZM_S126800/LH244	F1	23,86	31,07	3,13	11,37	15,07
ZM_S126800/LH244	F1	26,73	29,67	2,92	9,6	14,26
ZM_S126995/LH244	F1	31,78	22,68	1,87	12,32	14,07
ZM_S126808:@.	R1	22,94	33,24	2,81	10,51	13,79
ZM_S126808:@.	R1	21,28	34,77	3,15	10,62	13,65
ZM_S126808:@.	R1	25,73	32,94	2,19	9,26	11,95
ZM_S128026/LH244	F1	18,81	62,08	0,09	1,61	0,7
ZM_S126790/LH244	F1	19,23	62,98	0	1,36	0,06
ZM_S126790/LH244	F1	19,62	63,27	0	1,18	0
ZM_S126790/LH244	F1	19,56	63,19	0	1,38	0
ZM_S126790/LH244	F1	19,88	61,96	0	1,3	0
ZM_S126790/LH244	F1	20,43	61,28	0	1,37	0
ZM_S126800/LH244	F1	22,09	59,61	0	1,22	0
ZM_S126800/LH244	F1	20,09	62,11	0	1,32	0
ZM_S126800/LH244	F1	21,8	59,52	0	1,34	0
ZM_S126800/LH244	F1	22,55	59,63	0	1,28	0
ZM_S126808:@.	R1	20,9	60,65	0	1,43	0

(continuación)

Linaje	Gen	Oleico	LA	GLA	ALA	SDA
ZM_S126808:@.	R1	20,57	60,95	0	1,54	0
ZM_S126808:@.	R1	18,75	62,61	0	1,45	0
ZM_S126995/LH244	F1	20,03	63,35	0	1,22	0
ZM_S126995/LH244	F1	21,55	59,59	0	1,1	0
ZM_S126995/LH244	F1	24,63	56,02	0	1,12	0
ZM_S126995/LH244	F1	20,12	60,75	0	1,23	0
ZM_S126998:@.	R1	21,51	60	0	1,62	0
ZM_S126998:@.	R1	22,17	27,15	0	34,29	0
ZM_S126998:@.	R1	19,77	62,76	0	1,61	0
ZM_S126998:@.	R1	20,73	28,41	0	33,75	0
ZM_S126998:@.	R1	20,59	33,96	0	29,47	0
ZM_S126998:@.	R1	20,8	33,48	0	28,9	0
ZM_S126998:@.	R1	22,15	33,67	0	27,92	0
ZM_S126998:@.	R1	19,86	30,92	0	32,91	0
ZM_S126998:@.	R1	21,47	30,99	0	31,39	0
ZM_S126998:@.	R1	21,37	31,16	0	30,85	0
ZM_S127034:@.	R1	19,76	62,38	0	1,36	0
ZM_S127034:@.	R1	19,99	62,51	0	1,26	0
ZM_S127034:@.	R1	20,76	61,27	0	1,25	0
ZM_S128026/LH244	F1	20,86	59,51	0	1,63	0
ZM_S128026/LH244	F1	18,57	63,07	0	1,38	0
ZM_S128026/LH244	F1	19,7	62,41	0	1,13	0
ZM_S128026/LH244	F1	19,8	61,53	0	1,2	0
ZM_S128026/LH244	F1	17,96	65,06	0	1,32	0
ZM_S129919:@.	R1	20,7	60,71	0	1,29	0
ZM_S129919:@.	R1	20,04	61,49	0	1,45	0
ZM_S129919:@.	R1	19,53	61,77	0	1,37	0

El análisis de ácidos grasos de eventos generados por transformación con pMON78175 se muestra en la siguiente Tabla 3. Se analizaron diez semillas R1 o F1 maduras para su composición de ácidos grasos como anteriormente. La semilla individual de maíz de mejor rendimiento contenía el 12,4% de SDA y el 0% de GLA.

5

**TABLA 3: Análisis de ácidos grasos de granos de maíz maduros**

Linaje	Gen	Ácido oleico	Ácido linoleico	GLA	ALA	SDA
ZM_S130139:@.	R1	26,57	8,39	0	34,39	12,36

(continuación)

Linaje	Gen	Ácido oleico	Ácido linoleico	GLA	ALA	SDA
S130134:@.	R1	30,59	9,04	0	30,31	11,86
ZM_S130139:@.	R1	26,39	9,41	0	34,91	11,12
ZM S130135:@.	R1	25,09	12,98	0,12	34,81	9,93
ZM_S130133:@.	R1	30,62	10,85	0	30,93	9,63
ZM_S130136:@.	R1	30,55	11,99	0	32,28	7,63
ZM_S130136:@.	R1	28,27	13,53	0	33,41	7,45
ZM_S130136:@.	R1	29,14	10,61	0	34,59	7,44
ZM_S130134:@.	R1	25,43	14,32	0	35,68	7,3
ZM_S130134:@.	R1	23,94	16,92	0	35,7	6
ZM_S130133:@.	R1	22,93	17,14	0,02	37,21	5,88
ZM_S130136:@.	R1	28,28	11,89	0	35,63	5,86
ZM_S130140:@.	R1	23,47	15,34	0	37,85	5,68
ZM_S130133:@.	R1	21,75	17,83	0	37,43	5,59
ZM_S130072/LH244	F1	23,17	25,78	0,2	28,61	5,39
ZM_S130140:@.	R1	22,75	17,26	0	37,98	4,83
ZM_S130161:@.	R1	28,54	13,26	0	37,6	2,88
ZM_S130140:@.	R1	20,82	23,51	0	35,48	2,88
ZM_S130155/LH244	F1	20,87	59,43	0	2,2	0

## Referencias

- 5 Patentes de Estados Unidos 4.826.877; 4.910.141; 5.011.770; 5.158.975; 5.302.523; 5.378.619; 5.384.253; 4.826.877; 4.910.141; 5.011.770; 5.158.975; 5.302.523; 5.378.619; 5.384.253; 5.464.765; 5.538.877; 5.538.880; 5.550.318; 5.563.055; 5.591.616; 5.952.544; 6.603.061.
- Ausubel y col., En: Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Assoc., NY, 1994.
- Baerson y col., Plant Mol. Biol., 22(2):255-267, 1993.
- 10 Bevan y col., Nucleic Acids Res., 11(2):369-385, 1983.
- Bevan, Nucleic Acids Res., 12:8111, 1984.
- Bustos y col., J. Bacteriol., 174:7525-7533, 1991.
- Bustos, y col., Plant Cell, 1(9):839-853, 1989.
- Callis y col., Genes Dev., 1:1183-1200, 1987.
- 15 Chen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8560-8564, 1986.
- Chou y Fasman, Adv. Enzymol., 47:45-148, 1978.
- de Deckerer, Eur. J. Clin. Nutr., 52:749, 1998.
- Garcia-Maroto y col., Lipids, 37 (4), 2002.
- Gelvin y col., En: Plant Molecular Biology Manual, 1990.
- 20 Goeddel, En: Methods in Enzymology, Perbal (Ed.), Academic Press, John Wiley and Sons, 185, 1988.
- Hamilton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(18):9975-9979, 1996.
- Hong y col., Plant Mol. Biol., 34(3):549-555, 1997.
- Horrobin y col., Am. J. Clin. Nutr., 57(Supl.):732S-737S, 1993.
- Horsch y col., Science, 227:1229, 1985.
- 25 Huang, Biochem. Biophys. Acta, 1082:319, 1991.
- James y col., Semin. Arthritis Rheum., 28:85, 2000.
- Kaeppler y col., Plant Cell Reports, 9:415-418, 1990.
- Koncz y Schell, Mol. Gen. Genet., 204:383-396, 1986.

Kridl y col., *Seed Sci. Res.*, 1:209-219, 1991.  
 Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.  
 Manzioris y col., *Am. J. Clin. Nutr.*, 59:1304, 1994.  
 Michaelis y col., *Ann. Rev. Microbiol.*, 36:425, 1982.  
 5 Napier y col., *Biochem. J.*, 328, 717-720, 1997.  
 Napier y col., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68 (2), 135-143, 2003.  
 Naylor y col., *Nature*, 405:1017, 2000.  
 Omirulleh y col., *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-28, 1993.  
 Documento PCT US03/16144; documento WO 96/33155; documento WO 03/06870.  
 10 Pedersen y col., *Cell*, 29:1015-1026, 1982.  
 Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-77, 1985.  
 Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.  
 Radke y col., *Plant Cell Reports*, 11:499-505, 1992.  
 Reed y col., *Plant Physiol.*, 122:715-720, 2000.  
 15 Riggs, y col., *Plant Cell*, 1(6):609-621, 1989.  
 Russell y col., *Transgenic Res.*, 6(2):157-168.  
 Sambrook y col., En: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.  
 Sayanova y col., *FEBS Let.*, 542:100-104, 2003.  
 Sayanova y col., *Plant Physiol.*, 121, 641-646, 1999.  
 20 Shanklin y col., *Biochemistry* 33, 12787-12794, 1994.  
 Simopoulos y col., *Am. Coll. Nutr.*, 18:487, 1999.  
 Slocombe y col., *Plant Physiol.*, 104(4):167-176, 1994.  
 Sperling y Heinz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103, 158-180, 2001.  
 Van den Broeck y col., *Nature*, 313:358, 1985.  
 25 Vasil y col., *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.  
 Yang y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.  
 Wolk y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1561-1565, 1984.  
 Yamazaki y col., *Biochem. Biophys. Acta*, 1123:18, 19992,

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Ursin, Virginia  
 Froman, Byron  
 Nava, A. J.  
 Gonzales, Jennifer  
 35 <120> EXPRESIÓN DE DESATURASAS DE ÁCIDO GRASO EN MAÍZ  
 <130> MONS:046WO  
 40 <140> DESCONOCIDO  
 <141> 15-04-2005  
 <150> 60/563.135  
 <151> 16-04-2004  
 45 <160> 22  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 50 <210> 1  
 <211> 1953  
 <212> ADN  
 <213> *Primula juliae*  
 55 <400> 1

ES 2 541 537 T3

tatatatata tatatatata atcccaaaca aacactgtca cttgcaaac aaactcaacc 60  
cacgttactt atcccttttc cccaaaatgg aaaacacatt ttcaccacca cctactaaca 120  
ccaattccaa ccccatgact aagaccattt acataaccag ctcagaactt gaaaaacata 180  
acaagccagg tgacctatgg atatcaattc acgggtcaagt ttacgacgtt tcttctgagg 240  
ctgcgcttca cccggggggc atcgctcccc tctctgcctt tgcaggacat gatgtgaccg 300  
acgctttcct cgcttaccat cccctycca cctccgcct cctccctccc ttctccacca 360  
acctacttct agaaaaacat tccgtgtccg agacctcttc cgactatcgc aaacttctag 420  
acagctttca taagatgggc atgtttcgtg ccaggggcca cactgcctac gcgaccttg 480  
tcattatgat acttatgttg gtttctctg tgactggggg gctttgcagt gagaatccgt 540  
gggtgcattt ggtttgtgga gcggcaatgg ggtttgctg gatccagtgc ggatggatag 600  
gtcatgattc cggacattac cggataatga ctgacaggaa atggaaccgg ttcgctcaga 660  
tcttgagctc aaactgcctc caagggatta gtatcgggtg gtggaagtgg aaccacaacg 720  
cgcaccacat tgcctgcaat agtctggagt acgacctga cctccagtac attccttgt 780  
tggttgtgtc cccgaagttc ttttaactccc tcaacttctg tttctacgac aagaagctga 840  
acttcgacgg tgtgtcgagg tttttggtc aataccagca ctgggtcgtt tatccggtca 900  
tgtgtgttgc taggctgaac atgcttgcgc agtcgtttat actgctttt tcgaggaggg 960  
aggtggcgaa caggggtgcag gagattcttg gactagcggg tttttggctt tggtttccgc 1020  
tctgctttc ttgccttctt aattgggggtg agagaataat gtttttgctc gcgagctact 1080  
ccgttacggg gatacaaac gtgcagttca gcttgaacca tttctcatct gacgtttaac 1140  
tgggccacc cgtaggtaac gattggttta agaaacagac tgcagggaca ctcaacatat 1200  
cgtgcccggc gtggatggat tggttccacg gtggattgca gtttcaggtc gagcaccact 1260  
tgttcccgc gatgcctagg ggtcagttc ggaagattc tctttttgtg agggatttgt 1320  
gtaagaaaca caatttgact tacaatattg cgtottttac taaagcaaat gtgttgacgc 1380  
ttgagaccct gagaaacaca gccattgagg ctggggacct ctctaactcg atcccaaaga 1440  
atatggtgtg ggaggctggt aaaaatgtcg ggtgaaattg actatgtgtt ttgctattgg 1500  
agcttcaatt tcgtgattgt cgtttaaggg ggtatacaca atcaccagat aatcaaacgt 1560  
tttctgttgt atttcttct tgttatttac attttagag tggtcatgt aactgactg 1620  
tgtcgaatcg ttaagcctaa atacaagtgt aacaatttag tttctgtcca atttgagaaa 1680  
tagaaaagtt tggttgagcc tttttttct tctaatttct tcaacagget tattgagtgc 1740  
cttatttgcc acatacttaa gcgaaatgct ccaagtgcgc tagccgcaga tgtataaatt 1800  
gtctttttc gcttcaagtt ttaactgtat aacgtcattt cggcttatcg taatggttca 1860  
aattagctgc ttttgtttg acaattgtoc taagcaggca ctgatcaaca ctatcagttg 1920  
ttctttcctt ggtaaaaaag aactgttgaa ttt 1953

<210> 2  
<211> 1341  
<212> ADN



ES 2 541 537 T3

<213> *Primula juliae*

<400> 2

5

```

atgactaaga ccatttacat aaccagctca gaacttgaaa aacataacaa gccagggtgac      60
ctatggatat caattcacgg tcaagtttac gacgtttctt cctgggctgc gcttcacccg     120
gggggcatcg ctcccctcct cgccttgca ggacatgatg tgaccgacgc tttcctcgct     180
taccatcccc cttccacctc cgcctcctc cctcccttct ccaccaacct acttctagaa     240
aaacattccg tgtccgagac ctcttcgggc tatcgcaaac ttctagacag ctttcataag     300
atgggcatgt ttcgtgccag gggccacct gcctacgca cctttgtcat tatgatactt     360
atgttggttt cctctgtgac tggggtgctt tgcagtgaga atccgtgggt gcatttggtt     420
tgtggagcgg caatggggtt tgctggatc cagtgcggat ggataggtca tgattccgga     480
cattaccgga taatgactga caggaaatgg aaccggttcg ctacagatcct gagctcaaac     540
tgctccaag ggattagcat cgggtggtgg aagtggaacc acaacgcgca ccacattgcc     600
tgcaatagtc tggagtacga ccttgacctc cagtacattc ccttgttggt tgtgtccccg     660
aagttcttta actccctcac ttctcgttc tacgacaaga agctgaactt cgacggtgtg     720
tcgaggtttt tggttcaata ccagcactgg tcgttttacc cggtcattgtg tgttgctagg     780
ctgaacatgc ttgcgcagtc gtttatactg cttttttcga ggagggagggt ggcgaaacagg     840
gtgcaggaga ttcttgact agcggttttt tggctttggt ttccgctcct gctttcttgc     900
cttcctaatt ggggtgagag aataatgttt ttgctgcga gctactcctg tacggggata     960
caacacgtgc agttcagctt gaaccatttc tcatctgacg tttacgtggg cccacccgta    1020
ggtaacgatt ggtttaagaa acagactgca gggacactca acatctctg cccggcgtgg    1080
atggattggt tccatggcgg gttgcagttt caggtcgagc accacttgtt cccgcggatg    1140
cctaggggtc agtttcgaa gatttctcct tttgtgaggg atttgtgtaa gaaacacaat    1200
ttgacttaca atattgcgtc ttttactaaa gcaaatgtgt tgacgcttga gaccctgaga    1260
aacacagcca ttgaggctcg ggacctctct aatccgatcc caaagaatat ggtgtgggag    1320
gctgttaaaa atgtcgggtg a . . . . .                               1341

```

<210> 3

<211> 1389

<212> ADN

<213> *Primula juliae*

<400> 3

10

ES 2 541 537 T3

atggaaaaa c attttcacc accacctact aacaccaatt ccaaccccat gactaagacc 60  
 atttacataa ccagctcaga acttgaaaaa cataacaagc caggtgacct atggatatca 120  
 attcacggtc aagtttacga cgtttcttcc tgggctgcgc ttcaccocggg gggcatcgct 180  
 ccctcctcg cccttgagg acatgatgtg accgacgctt tcctcgctta ccatccccct 240  
 tccacctccc gctcctccc tcccttctcc accaacctac ttctagaaaa acattccgtg 300  
 tccgagacct cttccgacta tgcgaaactt ctagacagct ttcataagat gggcatgttt 360  
 cgtgccagag gccacactgc ctacgcgacc tttgtcatta tgatacttat gttggtttcc 420  
 tctgtgactg ggggtgctttg cagtgagaat ccgtgggtgc atttggtttg tggagcggca 480  
 atggggtttg cctggatcca gtgcggatgg ataggctcatg attccggaca ttaccggata 540  
 atgactgaca ggaaatggaa ccggttcgct cagatcctga gctcaaacctg cctccaaggg 600  
 attagcatcg ggtggtggaa gtggaaccac aacgcgcacc acattgctcg caatagtctg 660  
 gagtacgacc ctgacctcca gtacattccc ttgttggttg tgtccccgaa gttctttaac 720  
 tccctcactt ctcgtttcta cgacaagaag ctgaacttcg acggtgtgtc gaggtttttg 780  
 gttcaatacc agcactggtc gttttatccg gtcattgtgtg ttgctaggct gaacatgctt 840  
 gcgcagtcgt ttatactgct tttttcaggg agggaggtgg cgaacagggg gcaggagatt 900  
 cttggactag cggttttttg gctttggttt ccgctcctgc tttcttgctt tcctaattgg 960  
 ggtgagagaa taatgttttt gctcgcgagc tactccgtta cggggataca acacgtgcag 1020  
 ttcagcttga accatttctc atctgacgtt tacgtgggcc caccocgtagg taacgattgg 1080  
 ttttaagaaac agactgcagg gacactcaac atatcgtgcc cggcgtggat ggattggttc 1140  
 catggcgggt tgcagtttca ggtcgagcac cacttgttcc cgcggatgcc taggggtcag 1200  
 tttcggaaaga tttctccttt tgtgagggat ttgtgtaaga aacacaattt gacttacaat 1260  
 attgctctt ttactaaagc aaatgtgttg acgcttgaga ccctgagaaa cacagccatt 1320  
 gaggctcggg acctctctaa tccgatccca aagaatatgg tgtgggaggc tgttaaaaaat 1380  
 gt cgggtga 1389

5 <210> 4  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> *Primula juliae*

10 <400> 4

ES 2 541 537 T3

Met Thr Lys Thr Ile Tyr Ile Thr Ser Ser Glu Leu Glu Lys His Asn  
 1 5 10 15

Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile His Gly Gln Val Tyr Asp Val  
 20 25 30

Ser Ser Trp Ala Ala Leu His Pro Gly Gly Ile Ala Pro Leu Leu Ala  
 35 40 45

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

Ser Thr Ser Arg Leu Leu Pro Pro Phe Ser Thr Asn Leu Leu Leu Glu  
 65 70 75 80

Lys His Ser Val Ser Glu Thr Ser Ser Asp Tyr Arg Lys Leu Leu Asp  
 85 90 95

Ser Phe His Lys Met Gly Met Phe Arg Ala Arg Gly His Thr Ala Tyr  
 100 105 110

ES 2 541 537 T3

Ala Thr Phe Val Ile Met Ile Leu Met Leu Val Ser Ser Val Thr Gly  
115 120 125

Val Leu Cys Ser Glu Asn Pro Trp Val His Leu Val Cys Gly Ala Ala  
130 135 140

Met Gly Phe Ala Trp Ile Gln Cys Gly Trp Ile Gly His Asp Ser Gly  
145 150 155 160

His Tyr Arg Ile Met Thr Asp Arg Lys Trp Asn Arg Phe Ala Gln Ile  
165 170 175

Leu Ser Ser Asn Cys Leu Gln Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp Lys Trp  
180 185 190

Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr Asp Pro  
195 200 205

Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Leu Leu Val Val Ser Pro Lys Phe Phe Asn  
210 215 220

Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Lys Lys Leu Asn Phe Asp Gly Val  
225 230 235 240

Ser Arg Phe Leu Val Gln Tyr Gln His Trp Ser Phe Tyr Pro Val Met  
245 250 255

Cys Val Ala Arg Leu Asn Met Leu Ala Gln Ser Phe Ile Leu Leu Phe  
260 265 270

Ser Arg Arg Glu Val Ala Asn Arg Val Gln Glu Ile Leu Gly Leu Ala  
275 280 285

Val Phe Trp Leu Trp Phe Pro Leu Leu Leu Ser Cys Leu Pro Asn Trp  
290 295 300

Gly Glu Arg Ile Met Phe Leu Leu Ala Ser Tyr Ser Val Thr Gly Ile  
305 310 315 320

Gln His Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Asp Val Tyr Val  
325 330 335

Gly Pro Pro Val Gly Asn Asp Trp Phe Lys Lys Gln Thr Ala Gly Thr  
340 345 350

ES 2 541 537 T3

Leu Asn Ile Ser Cys Pro Ala Trp Met Asp Trp Phe His Gly Gly Leu  
 355 360 365

Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Pro Arg Gly Gln  
 370 375 380

Phe Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Arg Asp Leu Cys Lys Lys His Asn  
 385 390 395 400

Leu Thr Tyr Asn Ile Ala Ser Phe Thr Lys Ala Asn Val Leu Thr Leu  
 405 410 415

Glu Thr Leu Arg Asn Thr Ala Ile Glu Ala Arg Asp Leu Ser Asn Pro  
 420 425 430

Ile Pro Lys Asn Met Val Trp Glu Ala Val Lys Asn Val Gly  
 435 440 445

<210> 5  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> *Primula juliae*

5

<400> 5

Met Glu Asn Thr Phe Ser Pro Pro Pro Thr Asn Thr Asn Ser Asn Pro  
 1 5 10 15

Met Thr Lys Thr Ile Tyr Ile Thr Ser Ser Glu Leu Glu Lys His Asn  
 20 25 30

Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile His Gly Gln Val Tyr Asp Val  
 35 40 45

Ser Ser Trp Ala Ala Leu His Pro Gly Gly Ile Ala Pro Leu Leu Ala  
 50 55 60

Leu Ala Gly His Asp Val Thr Asp Ala Phe Leu Ala Tyr His Pro Pro  
 65 70 75 80

Ser Thr Ser Arg Leu Leu Pro Pro Phe Ser Thr Asn Leu Leu Leu Glu  
 85 90 95

Lys His Ser Val Ser Glu Thr Ser Ser Asp Tyr Arg Lys Leu Leu Asp  
 100 105 110

10

ES 2 541 537 T3

Ser Phe His Lys Met Gly Met Phe Arg Ala Arg Gly His Thr Ala Tyr  
115 120 125

Ala Thr Phe Val Ile Met Ile Leu Met Leu Val Ser Ser Val Thr Gly  
130 135 140

Val Leu Cys Ser Glu Asn Pro Trp Val His Leu Val Cys Gly Ala Ala  
145 150 155 160

Met Gly Phe Ala Trp Ile Gln Cys Gly Trp Ile Gly His Asp Ser Gly  
165 170 175

His Tyr Arg Ile Met Thr Asp Arg Lys Trp Asn Arg Phe Ala Gln Ile  
180 185 190

Leu Ser Ser Asn Cys Leu Gln Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp Lys Trp  
195 200 205

Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr Asp Pro  
210 215 220

Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Leu Leu Val Val Ser Pro Lys Phe Phe Asn  
225 230 235 240

Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Lys Lys Leu Asn Phe Asp Gly Val  
245 250 255

Ser Arg Phe Leu Val Gln Tyr Gln His Trp Ser Phe Tyr Pro Val Met  
260 265 270

Cys Val Ala Arg Leu Asn Met Leu Ala Gln Ser Phe Ile Leu Leu Phe  
275 280 285

Ser Arg Arg Glu Val Ala Asn Arg Val Gln Glu Ile Leu Gly Leu Ala  
290 295 300

Val Phe Trp Leu Trp Phe Pro Leu Leu Leu Ser Cys Leu Pro Asn Trp  
305 310 315 320

Gly Glu Arg Ile Met Phe Leu Leu Ala Ser Tyr Ser Val Thr Gly Ile  
325 330 335

Gln His Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Asp Val Tyr Val

ES 2 541 537 T3

	340		345		350														
	Gly	Pro	Pro	Val	Gly	Asn	Asp	Trp	Phe	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Gly	Thr			
			355					360					365						
	Leu	Asn	Ile	Ser	Cys	Pro	Ala	Trp	Met	Asp	Trp	Phe	His	Gly	Gly	Leu			
		370					375					380							
	Gln	Phe	Gln	Val	Glu	His	His	Leu	Phe	Pro	Arg	Met	Pro	Arg	Gly	Gln			
	385					390					395					400			
	Phe	Arg	Lys	Ile	Ser	Pro	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Cys	Lys	Lys	His	Asn			
					405					410					415				
	Leu	Thr	Tyr	Asn	Ile	Ala	Ser	Phe	Thr	Lys	Ala	Asn	Val	Leu	Thr	Leu			
				420					425					430					
	Glu	Thr	Leu	Arg	Asn	Thr	Ala	Ile	Glu	Ala	Arg	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro			
			435					440					445						
	Ile	Pro	Lys	Asn	Met	Val	Trp	Glu	Ala	Val	Lys	Asn	Val	Gly					
		450					455					460							

5	<210> 6 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Cebador		
	<400> 6 atmagyatyg gttggtggaa rtgg	24	
15	<210> 7 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Cebador		
	<400> 7 aatccaccrt graaccartc cat	23	
25	<210> 8 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> Cebador		
	<400> 8 cacacatgac cggataaaac gaccagt	27	

ES 2 541 537 T3

<210> 9  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 10 <400> 9  
 gggaatgtac tggaggtcag ggtcgta 27  
  
 <210> 10  
 <211> 27  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 20 <400> 10  
 cgtgcagtc agctgaacc attctc 27  
  
 <210> 11  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 30 <400> 11  
 tgcagggaca ctcaacatat cgtgccc 27  
  
 <210> 12  
 <211> 27  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 40 <400> 12  
 gtaggttgg ggagaaggga gggagga 27  
  
 <210> 13  
 <211> 27  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 50 <400> 13  
 ggaaggggga tgtaagcga ggaagc 27  
  
 <210> 14  
 <211> 33  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 65 <400> 14  
 gtcgacatgg aaaacacatt ttcaccacca cct 33



ES 2 541 537 T3

<210> 15  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 15  
 10 gtcgacatga ctaagacat ttacataacc agc 33  
 <210> 16  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20 <400> 16  
 cctgcaggtc acccgacatt ttaacagcc tccc 34  
 <210> 17  
 <211> 1290  
 25 <212> ADN  
 <213> *Neurospora crassa*  
 <400> 17  
 atggctgtca ctactaggtc acacaaagcc gccgctgcca ccgaacctga agttgtgtct 60  
 acaggagtgg atgcagtcag cgctgccgca ccaagcagta gtagctcctc atcctcccaa 120  
 aagtcagctg agcctatcga atatccagac atcaagacaa ttcgtgacgc tataccagac 180  
 cactgettta gacctcgcgt ttggatatcc atggcgctact ttattcgcga ttttgcaatg 240  
 30

ES 2 541 537 T3

gctttcggcc tcggatactt ggcatggcaa tacatccctt tgattgcaag taccocattg 300  
 agatacggag cttgggcttt gtacgggttac ctccaggac tcgtctgtac tggaaatttg 360  
 atcttggtc acgaatgagg tcacggagcc ttttctagac acacctgggt caacaacggt 420  
 atggggttga ttggctactc tttcctacta gtcccatatt ttagctggaa attttcccat 480  
 caccgtcatc ataggttcac cggacatagc gaaaaagata tggcgttcgt tccagccacg 540  
 gagcgggaca gaaatcagag aaaactagct aatctctata tggacaaaga gactgctggag 600  
 atgttcgagg atgttcctat tgtgcagttg gttaaactaa ttgctcacca actcgcgggt 660  
 tggcagatgt atctcttgtt caacgttagt gccggaaaag gctccaaaca gtgggaaacc 720  
 ggcaaagggtg gaatgggatg gctccgcgtg agccatttcg aaccaagttc agccgttttc 780  
 agaaacagcg aagcaattta catagctcta agcgatctcg gacttatgat tatgggatac 840  
 attctctacc aggcagecca agttggttga tggcaaatgg ttggtctctt gtattttcaa 900  
 cagtacttct gggttcacca ttggctcgtt gccatcactt accttcatca cacacacgaa 960  
 gaagttcacc actttgatgc agattcttgg acatttgta aggggtccct cgctaccgtg 1020  
 gacagagact tcggtttcat cggcaagcac ctcttcata acatcattga ccatcatggt 1080  
 gttcatcacc tcttcccaag aatcccttct tactacgctg aagaagctac caattcaata 1140  
 agacctatgc tcggacctct ttaccacaga gatgaccgtt ctttcatggg gcaactctgg 1200  
 tacaacttca cacactgcaa atgggttgtc cctgatctc aagtgccagg tgctctaact 1260  
 tgggctcaca ccgttcagag tactcagtaa 1290

<210> 18

<211> 1209

<212> ADN

<213> *Aspergillus nidulans*

<400> 18

atggccgcaa ccgcgaccac tctcgtgaa atagaaaaga agaaggaaga gattacacta 60  
 cagacaatca agaatgccat accaaagcac tgttttaacc gtagtttgc tatttcaagt 120  
 gcctacgtcg tcagagacct cctctacgca tcagttttgt tctattttgc acttcatatt 180  
 gatacgetct tctcatocca gctccttagg atcttggcat ggacagctta cggtttcatg 240  
 caaggctgcg tgggaacggg tatatggata ttggcacatg aatgccgaca cggagctttt 300  
 agcccttacc aaacctggaa cgacgttgtt ggttggacc ttcattctct tctcatggtc 360  
 ccttacttct cttggaaaat aaccacgca aggcaccaca gatatacga caataccgag 420  
 agggacacag ccttcgttcc ctggaccgag aaggaatacg acaccagacc tcgttacttc 480

5

10

ES 2 541 537 T3

cctgcatggt tcgagatggt tgaagacaca ccagtgata acttgatttc attgctogcc 540  
 catcagatcg ccggctggca aatgtacctc tgcttctacg tctcagccgg agccaaaagt 600  
 aagcctgttc cacaaggcaa gcagtcgga tggtttgag gtcaacaatc tgcatcacac 660  
 tttgaccag gaagctctct atggaccgaa aaccagcgc atctaatoac aatctccgac 720  
 cttggactcc ttctogtggc cgccggaat tggacttgg ctcaacaagt tgggttctca 780  
 agaatggtgc tcatctacgt cgtcccctac ttttgggtcc accactggt agtcgccatc 840  
 acgtacctcc accaactca cccatccata ccacactaca ccgactctac ctggacatcc 900  
 actaaaggag cactctcaac agtggatogt gacttcggat ttataggaag gcacttcttt 960  
 caccacatca ttgatcacca cgtcgttcat cacttggtca ataggatacc attctatcac 1020  
 gcagaggaag ctactaacgc aataatacca gttctcggtg atatgtacca tagagaagaa 1080  
 accggattcc tctggagtct tatggaaact tataaaaact gtcgctttgt tggcgtggag 1140  
 aacgatgtgg gtaaggaggg agttctccat tgggttttcg aagaaaagaa aggcgctaaa 1200  
 gctgaatag 1209

<210> 19  
 <211> 1290  
 <212> ADN  
 <213> *Neurospora crassa*

5

<400> 19

atgacggtea ccaccgcag ccacaaggcc gcggccgcca ccgagcccga ggtgtcagc 60  
 accggcgttg acgcctctc tgctgctgct ccctctctct cctcctctct ttcagccaa 120  
 aagtcggccg agcccatcga ataccgcgac atcaagacca tccgcgacgc catccccgac 180  
 cactgcttec gcccgcgct ctggatctcc atggcctact tcatccgca cttcgccatg 240  
 gcctttggcc tcggctacct cgctggcag tacatcccc tgatcgctc caccocgctc 300  
 cgctacggcg cctgggctct gtacggctac ctccagggtc tcgtctgcac gggcatctgg 360  
 attctggcgc acgagtgcgg ccaaggcgc ttctcgaggc acacgtggtt caacaacgctc 420  
 atggggtgga ttggccactc ctctctcttg gtccctact tcagctggaa gttcagccac 480  
 catcgccacc atcgctcac cggccacatg gagaaggaca tggcgtttgt gcctgccacc 540  
 gaggctgatc gcaaccagag gaagctggcc aacttgata tggacaagga gacggccgag 600  
 atgtttgagg atgtgcccat tgtccagctc gtcaagctca tcgcccacca gctggccggc 660  
 tggcagatgt acctctctt caacgtctc gccggtaagg gcagcaagca gtgggagact 720  
 ggcaagggcg gcatgggctg gttgaggggt agccactttg agcctctctc tgctgtgttc 780

10

ES 2 541 537 T3

cgcaactccg aggccatcta cattgccctg tccgatcttg gtctcatgat catgggctat 840  
atcctctacc aggcgcgca ggttggtggc tggcagatgg taggtctgct gtacttccag 900  
cagtacttct gggttcacca ttggttggtc gccatcaett acctccacca caccacgag 960  
gaagtcacc actttgacgc cgactcgtgg accttcgtca agggcgctct cgccaccgtc 1020  
gaccgcgatt ttggcttcat tggcaagcac ctcttcaca acattatcga ccaccacgtc 1080  
gtccaccact tgttcctcgc catccccttc tactacgccc aagaagccac caactcgate 1140  
cgccccatgc tgggccccct ctaccaccgc gaagaccgct ccttcatggg ccagctgtgg 1200  
tacaacttca cccactgcaa gtgggtcgtt ccggaccccc aggtccccgg cgcgcttatt 1260  
tgggcgcaca ccgttcagag caccacgtaa 1290

<210> 20  
<211> 1290  
<212> ADN  
<213> *Neurospora crassa*

5

<400> 20

atggcgggtca ccaccgcgag ccacaaggcc ggggcgcgca ccgagccccga ggttgtcagc 60  
accggcggttg acgccgtctc tgetgctgct cctcctcct cctcctcctc ttccagccaa 120  
aagtgcggcg agcccatcga ataccccgac atcaagacca tccgcgacgc catccccgac 180  
cactgcttcc gcccgcgct ctggatctcc atggcctact tcatccgoga cttegccatg 240  
gcctttggcc tggctacct cgctggcag tacatcccc tgatcgctc caccgcgctc 300  
cgctacggcg cctgggctct gtacggctac ctccagggtc tegtctgcac gggcatctgg 360  
attctggcgc acgagtgcgg ccacggcgcc ttctcgaggc acacgtgggt caacaacgtc 420  
atggggtgga ttggccactc ctctctcttg gtcccttact tcagctggaa gttcagccac 480  
catcgccacc atcgcttcac cggccacatg gagaaggaca tggcgtttgt gcctgccacc 540  
gaggctgato gcaaccagag gaagctggcc aacttgtaca tggacaagga gacggccgag 600  
atgtttgagg atgtgccat tgtccagctc gtcaagctca tcgccacca gctggccggc 660  
tggcagatgt acctcctctt caacgtctcc gccggtaagg gcagcaagca gtgggagact 720  
ggcaagggcg gcatgggctg gttgaggggt agccactttg agccttctc tgetgtgttc 780  
cgcaactccg aggccatcta cattgccctg tccgatcttg gtctcatgat catgggctac 840  
atcctctacc aggcgcgca ggttggtggc tggcagatgg tgggtctgct gtacttccag 900  
cagtacttct gggttcacca ttggttggtc gccatcaett acctccaoca caccacgag 960  
gaagtcacc actttgacgc cgactcgtgg accttcgtca agggcgctct cgccaccgtc 1020

10

ES 2 541 537 T3

gaccgcgatt ttggcttcat tggcaagcac ctcttccaca acattatcga ccaccacgtc 1080  
 gtccaccact tgttccctcg catccccttc tactacgccg aagaagccac caactcgatc 1140  
 cgccccatgc tgggccccct ctaccaccgc gacgaccgct ccttcatggg ccagctgtgg 1200  
 tacaacttca cccactgcaa gtgggtcggt ccggaccccc aggtccccgg egcgcttatt 1260  
 tgggcgcaca ccgttcagag caccocagtaa 1290

<210> 21  
 <211> 2391  
 <212> ADN  
 <213> *Mortierella alpina*

5

<400> 21

caggatcggc ggcagcggtg gcaggagcca aggagcaggc tccagacgct gcttaggaac 60  
 cggggaccgg ggagtgcctc caccctgagc tctcagctcc ggaggcgtca tggcagagta 120  
 cggaactctc cttcaggacc tgaccaacaa catcaccttc gaagatctgg aacagctcaa 180  
 gtcagcctgc aaggaggaca tccccagtga gaagagtgag gagatcacca caggcagcgc 240  
 ctggtttagc ttcttgagga gccacaacaa gctggacaaa gacaacctct cctacataga 300  
 gcacatcttt gagatatctc gccgtcctga cctcctcact atgggtggtg actacagaac 360  
 ccgtgtgctg aagatctctg aggaggagga gctggacacc aagctaacce gtattcccag 420  
 tgccaagaag tacaagaca ttatccggca gccctctgaa gaagaaatca tcaaatggc 480  
 tccccacca aagaaggcct gaacaagggg gaggaagagg aggaagggtg gatcttcatc 540  
 agaccactcc cttccccatc ctcaatggga ggggctaggg caacccccctg ctccgtacct 600  
 atttactaac ttggctctaa cccttactat gcgcgtgtgt gtcgggtgtgc gcaogctctg 660  
 gctgtctgtc tgtctagctc atctagttcc tctcctcat gaggggattg gaggcaaggg 720  
 agggggagct taattcccc cactataggg ggagggtggac gctttttcta tgtaaacaga 780  
 aattggcaca ttctcctcc ttctcccctt tctcctcctc tccccca tctttatgga 840  
 agcagaaagg acctgcattt tcttactctg aggagctatg gtgaagatga ggtatgggag 900  
 agatgggtgt atctaaagaa aaccagtggg gaaggaaggt aaagaggcca ctcaacctcc 960  
 acctggtaag ggacaaagaa aagccaggac tcagtgtttg tatctctatg ctggactggg 1020  
 tagaagccag cttcccgtg ttcccctagg ctgaggtcct gagtgccaat gggccctcct 1080  
 tatgcccttg ttatgggctc gggatgcgga tgagccagaa atcttaatga gaagaccact 1140  
 cgatcctttc ctgggtccaa agatcaaacc ccaatggaga agccagcatt tactgtcccc 1200  
 caaccttctg ctctggagag acgatgccgg gaccatgcac tactgagcct gagctagggg 1260

10

ES 2 541 537 T3

cgcaggcaga gacaggccca cttcctgctc ctcagtttct aaatacagac tgttggataa 1320  
 actgacctgg agcctagga gattggggga tgagatcctt aggttttaac cccaacctgc 1380  
 ccacaaccta cagagtattg taggcaacct ttocactctc cagtttagaa ttctccaagc 1440  
 aagtagttaa ttacagtgtt tcctttgcac tgaccaccac cctgattcaa tccaggaagg 1500  
 gactggtaac ctttctcatt tgggtttgtg gatgccacac agccaagtca ctagagtgca 1560  
 gtgagtgaac ccagcctcct ccctgtccca agatgccctt ccccatcttg accgtgctaa 1620  
 ctgtgtgtac atatatattc tacatatatg tatattaaac ccgcactgcc atgtctgccc 1680  
 ttttttgtgg ttttagcat taacttattg tctaggccag agcgggagtg ggaggggatg 1740  
 ccacagaaag gaagtggcag agccaaattg ttacagagtc caaacagaaa acacatttca 1800  
 actaaccaca acaaatgtta catttacatg tgagctaaga gacaatttag agaaagatga 1860  
 aggtaggtgc ttttaggatg tgggagcaaa acttcacagg gaggggagga atggctgtca 1920  
 gaagaggggt cttgaagcca gactgactag agcacccctca gttcctagct gagcccagat 1980  
 tgcccatctc ctctggccac tgctgcagac acctgcctta actctcacac ctggaagact 2040  
 ccagttttgc cttaaaggtc cttcctaaat ctccctagtc ttgcctggca tctcctttaa 2100  
 gacaagaaat cttgtacaa ctgggtggga gaaaggaact ctgggtaaca tccttccttc 2160  
 tggggtgttc catgggagca ggagtgcagac ggcgcttccc ttatggaaga gggaggagac 2220  
 aggggtgcttc tcagaagctt ctctgtaagg caaaaaccaa actttaaaca gactaacctg 2280  
 ccctaataata ctacccccct cgtgctgctg tgaggttgct cctagcctgt gctcctctgt 2340  
 ctgcagcgtg cacagccttg ttctaaccct ggaataaagg tgactgactc t 2391

<210> 22  
 <211> 522  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (200)...(511)  
 <223> N = A, C, G o T

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 22

ttacagtaca gtcaatcacc tttattccag ggtagaaca aggccgtgca cactgcagac 60

# ES 2 541 537 T3

aggagcacag gatggggaca atctcacagc cgtacagggt gggagggcag gttagtcttt 120  
ttaggttatt ttggccttac agagagattt ctgactctg ctggaaatga cctgtctcc 180  
cttctcccat ctccccctc ctctcctcan agaaggctcc tattccttcc tcctcttccc 240  
cctctcgctc tcgctcgctc tcacgcacat tctcacatca cgtaatcctg accggaagga 300  
cagtcgtgct cagctcccc ctccaattc tacaagtgcc tctcggtcct ggagggagaa 360  
gcagacaggg ctggggcacc tcggggaggt cctttaaggc aaaactgngg agtactccag 420  
gtgtccgtgt taaggcagggt gtccccanca ntggccaaaa gggacggctg ggetgggctg 480  
gctgggcgtg caaggttgtt ccnggcccg ngtttcttc tt 522

## REIVINDICACIONES

1. Una planta de maíz transgénica o semilla de maíz transgénica que comprende una construcción recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una  $\Delta 15$  desaturasa de *Neurospora crassa* mutagenizada para aumentar su expresión en una monocotiledónea, tal como maíz, y una secuencia polinucleotídica que codifica una  $\Delta 6$  desaturasa de *Primula julia* modificada para su expresión en plantas monocotiledóneas, comprendiendo dicha planta de maíz y semilla de maíz un aceite de semilla de maíz endógeno que tiene un contenido de ácido estearidónico (18:4 n-3) del 25 al 33%.
2. La planta de maíz transgénica o semilla de maíz transgénica de la reivindicación 1, en la que la planta de maíz es una planta endogámica o una planta híbrida, y la semilla de maíz es una semilla endogámica o una semilla híbrida.
3. Un aceite de semilla de maíz endógeno que se puede obtener de una semilla de maíz de la reivindicación 1 y que tiene un contenido de ácido estearidónico (18:4 n-3) del 25 al 33%.
4. El aceite de semilla de maíz de la reivindicación 3, en el que
- (i) el contenido de ácido estearidónico es seleccionado entre el 25% al 32% y del 25% al 30%; o
  - (ii) el aceite de semilla de maíz se define como comprendiendo ácido gamma-linolénico en un contenido seleccionado entre: menos del 7,5%, menos del 5% y menos del 3%; o
  - (iii) la proporción de ácido estearidónico a ácido gamma-linolénico es seleccionada entre: de 1:1 a 10:1, de 2:1 a 10:1, de 3:1 a 5:1 y al menos 3:1; o
  - (iv) la proporción de ácidos grasos omega-3 a omega-6 en el aceite es seleccionada entre: de 0,5%:1 al 10:1, de 5:1 a 10:1, y al menos 5:1.
5. Un procedimiento de producción de aceite de semilla, que comprende cultivar la planta de maíz de la reivindicación 1 en condiciones de cultivo de plantas hasta que la planta produzca dicho aceite de semilla.
6. Un procedimiento para aumentar el valor nutritivo de un producto comestible para consumo humano o animal no humano, que comprende añadir el aceite de semilla de maíz de la reivindicación 3 al producto comestible.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el producto comestible es seleccionado entre alimentos para seres humanos, piensos para animales y un suplemento alimenticio.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el aceite de semilla de maíz aumenta el contenido de ácido estearidónico del producto comestible.
9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el aceite de semilla de maíz aumenta la proporción de ácidos grasos omega-3 a omega-6 del producto comestible.
10. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el producto comestible carece de ácido estearidónico antes de añadir el aceite de semilla de maíz.
11. Un procedimiento de fabricación de alimentos y/o piensos, que comprende añadir el aceite de semilla de maíz de la reivindicación 3 a los ingredientes de partida para producir el alimento y/o pienso.
12. Alimentos o piensos fabricados por el procedimiento de la reivindicación 11.
13. Una composición para proporcionar ácido estearidónico a un ser humano o animal no humano, comprendiendo dicha composición el aceite de semilla de maíz de la reivindicación 3.
14. La composición de la reivindicación 13, que es una composición comestible, preferentemente
- (i) la composición comestible es alimento o pienso, más preferentemente el alimento comprende bebidas, alimentos de infusión, salsas, condimentos, aliños de ensalada, zumos de frutas, jarabes, postres, glaseados y rellenos, productos congelados blandos, productos de confitería o alimento de hidratación intermedia, o es alimento o pienso para un animal de compañía; o
  - (ii) la composición comestible es sustancialmente un líquido o un sólido; o
  - (iii) la composición comestible es un suplemento alimenticio y/o un nutracéutico.
15. La composición de la reivindicación 13, que
- (i) es adecuada para ser administrada a un ser humano; o
  - (ii) es adecuada para ser administrada a un animal no humano, preferentemente a ganado o aves de corral.



Figura 1.

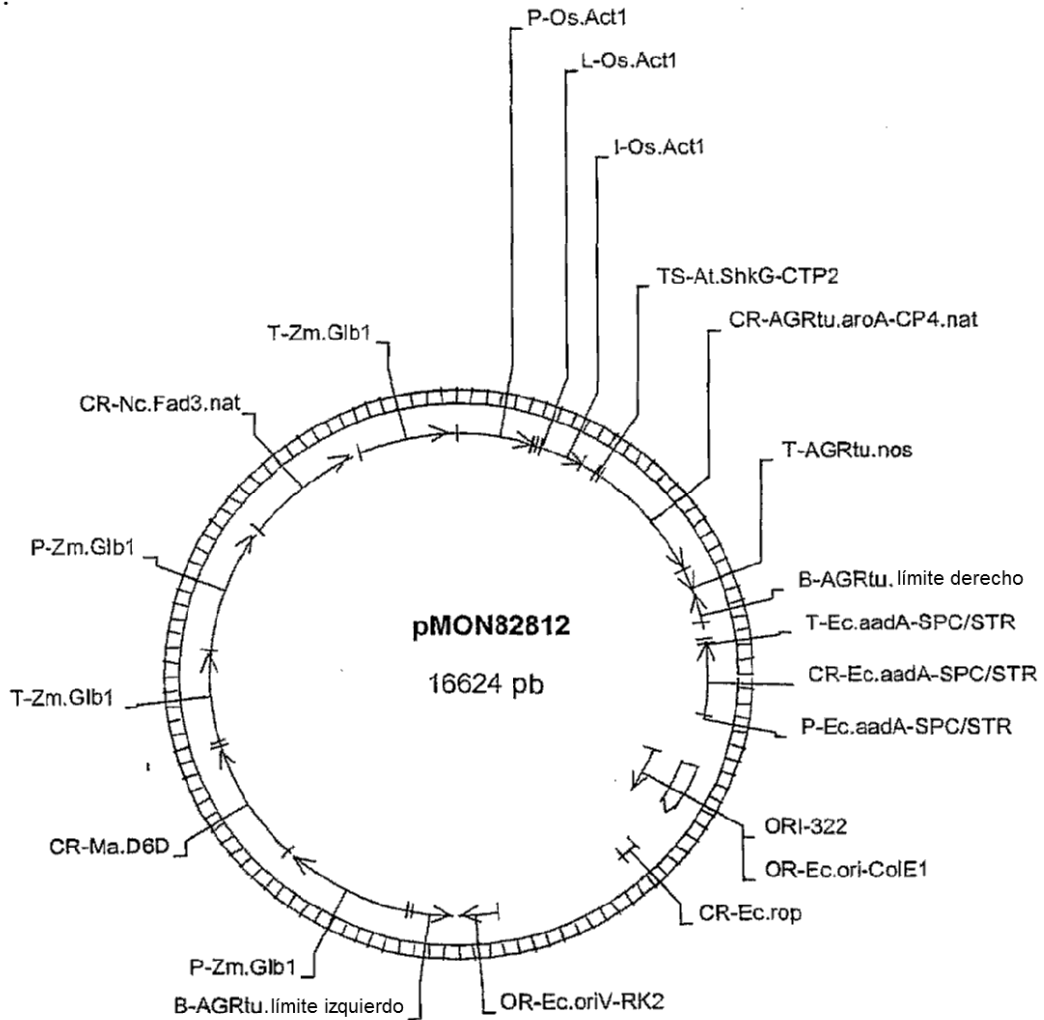


Figura 2.

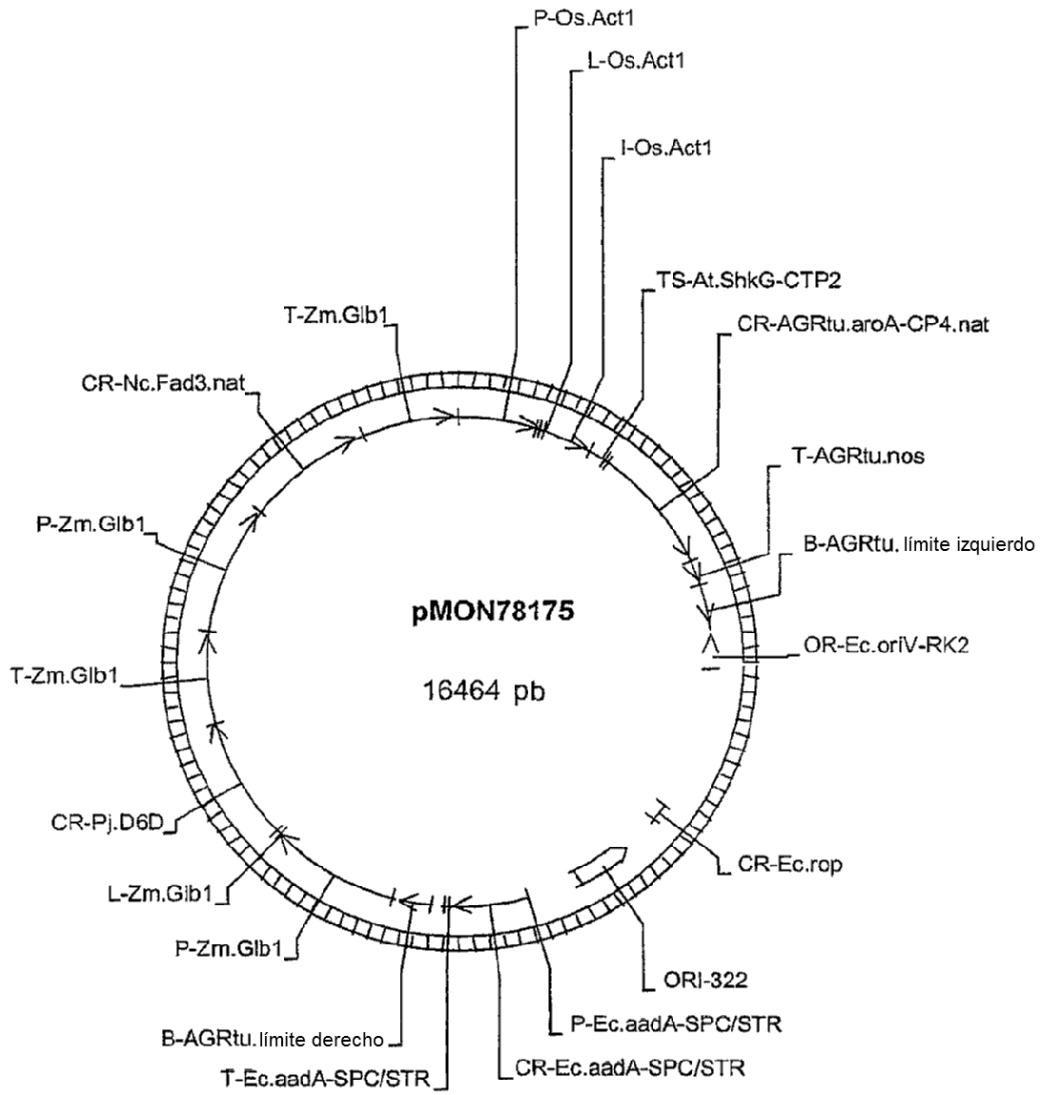


Figura 3.

