

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 542 420**

(51) Int. Cl.:

A01H 5/10 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2003 E 03738947 (5)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 1549133**

(54) Título: **Desaturadas de ácidos grasos de hongos**

(30) Prioridad:

**22.05.2002 US 382391 P
07.03.2003 US 453125 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2015

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**URSIN, VIRGINIA, M.;
VOELKER, TONI y
FROMAN, BYRON**

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 542 420 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

Desaturasas de ácidos grasos de hongos

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

5 La invención se refiere, en general, a enzimas desaturasas que modulan el número y a localización de dobles enlaces en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), procedimientos de uso de las mismas y a composiciones derivadas de las mismas. En particular, la invención se refiere a perfiles de ácidos grasos mejorados usando enzimas desaturasas y ácidos nucleicos que codifican dichas enzimas identificadas en hongos.

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 especies. Los mamíferos, por ejemplo, producen principalmente ácidos grasos saturados y monosaturados, 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"), exemplificados por ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:4, n-3), y los ácidos grasos omega-6 (también representados como ácidos grasos "n-6"), exemplificados 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 formas tales como fosfolípidos y como triacilglicéridos, respectivamente. Los PUFA son necesarios para el correcto desarrollo 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 complementación con PUFA ha demostrado reducir la tasa de reestenosis después de angioplastia. Los beneficios para la salud de ciertos ácidos grasos omega-3 alimentarios 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 de las vías urinarias. La mayoría de las evidencias de los beneficios para la salud se aplica a las grasas omega-3 de cadena larga, EPA y DHA, 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 y Hall, Londres), y los Estados Unidos (Simopoulos y col., 1999) han recomendado un consumo alimentario aumentado de estos PUFA.

25 30 35 Los PUFA también pueden usarse para tratar la diabetes (patente de EE. UU. n.º 4.826.877; Horrobin y col., 1993). Se ha demostrado un metabolismo y 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 GLA, ha demostrado prevenir y revertir el daño nervioso diabético.

40 45 Los PUFA, tales como ácido linoleico (LA, 18:2, Δ9, 12) y ácido α -linolénico (ALA18:3, Δ9, 12, 15), se consideran como ácidos grasos esenciales en la alimentación 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 fluididad a las membranas y funcionan como precursores de eicosanoides biológicamente activos tales como prostaglandinas, prostaciclinas, y leucotrienos, que regulan las funciones fisiológicas normales.

50 55 En mamíferos, la formación de LC-PUFA está limitada en velocidad por la etapa de Δ6 desaturación, que convierte LA en ácido y-linolénico (GLA, 18:3, Δ6, 9, 12) y ALA en SDA (18:4, Δ6, 9, 12, 15). Muchas afecciones fisiológicas y patológicas han demostrado reducir esta etapa metabólica, y por consiguiente, la producción de LC-PUFA. Sin embargo, evitando la Δ6 desaturación mediante complementación alimentaria con EPA o DHA pueden 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 despertado un interés en fuentes alternativas de PUFA.

Los principales PUFA de cadena larga de importancia incluyen ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6, n-3) y EPA, que se encuentran principalmente en diferentes tipos de aceite de pescado, y ácido araquidónico (ARA, 20:4, n-6),

encontrado en hongos filamentosos. 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 *Trichodesma* y *Echium*. Sin embargo, existen varias desventajas asociadas con la producción comercial de PUFA a partir de fuentes naturales. Las fuentes naturales de

5 PUFA, tales como animales y plantas, tienden a tener composiciones de aceite altamente heterogéneas. Por ejemplo, el aceite de las semillas de *Echium*, además de SDA, contiene niveles casi equivalentes del ácido graso omega-6 GLA. Los aceites obtenidos de estas fuentes, por lo tanto, pueden requerir purificación extensiva para separar uno o más PUFA deseados o para producir un aceite que esté enriquecido en uno o más PUFA.

10 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 sobre pesca. Además, incluso con evidencias abrumadoras de sus beneficios terapéuticos, las recomendaciones alimentarias respecto a los ácidos grasos omega-3 no se han tenido en cuenta. Los aceites de pescado tienen sabores y olores desagradables, que pueden ser imposibles de separar económicamente del producto deseado, y pueden convertir a dichos productos en inaceptables como complementos alimenticios. Los aceites animales, y particularmente los aceites de pescado, 15 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 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, 20 que depende principalmente de las reservas de pescado salvaje para la alimentación acuática (Naylor y col., 2000).

25 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. La tierra de cultivo disponible para la producción de cultivos oleaginosos alternativos está sometida a competición por la expansión estacional 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, 30 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.

35 Varias enzimas están implicadas en la biosíntesis de PUFA. LA, (18:2, Δ9, 12) se produce a partir de ácido oleico (OA, 18:1, Δ9) por una Δ12-desaturasa mientras que ALA (18:3) se produce a partir de LA por una Δ15-desaturasa. SDA (18:4, Δ6, 9, 12, 15) y GLA (18:3, Δ6, 9, 12) se producen a partir de LA y ALA por una Δ6-desaturasa. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, los mamíferos no pueden desaturar más allá de la posición Δ9 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 derivan de la alimentación mediante la desaturación y elongación posteriores de LA y ALA alimentaria.

40 La patente de EE. UU. n.º 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 '544 se expresa en plantas y provoca la acumulación de ALA. Sin embargo, en plantas transgénicas que expresan la Δ15-desaturasa vegetal, permanece sustancial LA sin convertir por la desaturasa. Sería ventajosa una enzima más activa que convierta más LA en ALA. La conversión aumenta de LA en ALA crearía mayores cantidades de ALA. Niveles aumentados de ALA permiten que una Δ6 desaturasa, cuando se co-expresa con un ácido nucleico que 45 codifica una Δ15 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 aumentar la producción de SDA. Sin embargo, aún son muy deseables innovaciones que permitieran una producción comercial mejorada en cultivos terrestres en tierra firme. (Véase, por ejemplo, Reed y col., 2000). Además, el uso de polinucleótidos de desaturasa derivados de 50 *Caenorhabditis elegans* (Meesapyodsuk y col., 2000) no es ideal para la producción comercial de aceites vegetales enriquecidos de semilla.

55 Se han aislado ácidos nucleicos que codifican Δ15-desaturasas de varias especies de cianobacterias y plantas, incluyendo *Arabidopsis*, soja, y perejil. Las secuencias deducidas de aminoácidos de estas desaturasas muestran un alto grado de similitud, más notable en la región de tres motivos ricos en histidina que, sin limitarse a teoría alguna, se cree que están implicados en la unión a hierro. Sin embargo, no se ha aislado ninguna Δ15-desaturasa de ninguna especie de hongo. Además, incluso habiéndose secuenciado los genomas de varias especies de hongos, y usando algoritmos sofisticados, las búsquedas utilizando ADNc de Δ15-desaturasa conocido y secuencias de aminoácidos frente a bases de datos de ADN de *Aspergillus* y *Neurospora* no han producido Δ15-desaturasas.

60 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 complementos alimenticios de modo que los sujetos puedan elegir piensos, ingredientes de piensos, alimentos e ingredientes alimenticios que se adecuen a sus hábitos dietéticos habituales. 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 solicitud de EE. UU. en trámite junto con la presente con n.º de serie 10/384.369 para "Tratamiento y Prevención de Trastornos Inflamatorios", que elevar la ingesta de ALA en la población de 1 g/día a 14 g/día mediante el uso de aceite de linaza solamente aumentaba modestamente 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 más altas de y/o enriquecidos en PUFA específicos, y composiciones y complementos alimenticios que los 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 en particular es importante porque, como se ha descrito anteriormente, existe una baja conversión de ALA en EPA. Esto es porque en este proceso de tres enzimas (que requiere Δ6, Δ12, y Δ15) la enzima inicial, Δ6-desaturasa, tiene baja actividad en seres humanos y es limitante de la velocidad. Las evidencias de que la Δ6 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).

En base a estos estudios, se observa que en cultivos oleaginosos comerciales, tales como canola, soja, maíz, girasol, cárтamo, o lino, la conversión de alguna fracción de los ácidos grasos mono y poliinsaturados que tipifican su aceite de semilla en SDA, requiere la expresión específica de semilla de múltiples enzimas desaturadas, incluyendo Δ6 y Δ12, y una enzima que tiene actividad Δ15-desaturasa. Los aceites derivados de plantas que expresan niveles elevados de Δ6, Δ12, y Δ15-desaturadas son ricos en SDA y otros ácidos grasos omega-3. Dichos aceites pueden utilizarse para producir alimentos y complementos alimenticios enriquecidos en ácidos grasos omega-3 y el consumo de dichos alimentos aumenta de forma eficaz los niveles tisulares de EPA y DHA. 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. Se ha demostrado que los sujetos pueden obtener una ingesta de omega-3 comparable a EPA y DHA de al menos 1,8 g/día sin alterar sus hábitos dietéticos utilizando alimentos que contienen aceites enriquecidos con ácidos grasos omega-3 (Naylor, supra.). Por tanto, existe una fuerte necesidad de nuevos ácidos nucleicos de Δ15-desaturadas para su uso en plantas transgénicas de cultivo para producir aceites enriquecidos en PUFA. Asimismo se necesitan nuevos aceites vegetales de semilla enriquecidos para PUFA y, en particular, ácidos grasos omega-3 tales como ácido estearylónico.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido capaz de desaturar una molécula de ácido graso en el carbono 15 (Δ15-desaturasa), en el que el polinucleótido se selecciona entre:

- (a) un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 3;
- (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2;
- (c) un polinucleótido que hibrida con una o más de la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, o un complemento de las mismas, en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42°C.

Éstos pueden usarse para transformar células o modificar la composición de ácidos grasos de una planta o el aceite producido por una planta. Una realización de la invención es una secuencia polinucleotídica aislada, que se ha aislado de una especie de hongo que tiene actividad desaturasa única. Los polinucleótidos aislados pueden aislarse de especies de hongos que pertenecen preferentemente a un filo seleccionado entre el grupo que consiste en zigomicota, basidiomicota, y ascomicota. Los polinucleótidos aislados se aíslan de *Neurospora crassa*.

En otro aspecto más, la invención proporciona un vector recombinante que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con la invención. La expresión "vector recombinante" como se usa en el presente documento, incluye cualquier segmento recombinante de ADN que se desee introducir en una célula, tejido y/u organismo huésped, e incluye específicamente 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.

En otro aspecto más, la invención proporciona células, tales como células de mamífero, plantas, insectos, levaduras y bacterias transformadas con los polinucleótidos de la presente invención. En una realización adicional, las células se transforman con vectores recombinantes que contienen promotores constitutivos y específicos de tejido además de los polinucleótidos de la presente invención. En ciertas realizaciones de la invención, dichas células pueden 5 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 6.

En otro aspecto más, la invención proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la 10 SEC ID N° 3; o un fragmento de la misma que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 15. Dichos fragmentos que desaturan una molécula de ácido graso en el carbono 15 preferentemente comprenden al menos uno de los motivos de aminoácidos:

TrpIleLeuAlaHisGluCysGlyHisGlyAlaSerPhe (WILAHECGHGASF) (SEC ID N.º:6); LeuAlaHisGluCysGlyHis (LA-HECGH) (SEC ID N.º:7); HisSerPheLeuLeu-ValProTyrPheSerTrpLys (HSFLLVPYFSWK) (SEC ID N.º:8); LeuLeuVal-ProTyrPheSer-TrpLys (LLVPYFSWK) (SEC ID N.º:9); His(His/Ala)ArgHisHisArg(Phe/Tyr)ThrThr (H(H/A)RH- 15 HR(F/Y)TT) (SEC ID N.º:10, SEC ID N.º:19, SEC ID N.º:20, o SEC ID N.º:21); TrpValHisHisTrpLeuValAlalleThrTyr-Leu(His/Gln)HisThrHis (WVHHWLVAVITY-L(H/Q)HTH) (SEC ID N.º:11); AlalleThrTyrLeu(His/Gln)HisThr (AIT- 20 YL(H/Q)HT) (SEC ID N.º:12); GlyAlaLeuAlaThrValAspArg (GALATVDR) (SEC ID N.º:13) o HisVal-ValHisHisLeuPheX-aaArgIleProPheTyr (HVVHHLFXRIPFY) (SEC ID N.º:14 o SEC ID N.º:22).

En realizaciones adicionales, el fragmento se define adicionalmente como comprendiendo todos los dichos motivos de aminoácidos.

15 Otro aspecto más de la invención proporciona un procedimiento para producir aceite de semilla que contiene ácido graso omega-3 de semillas de plantas, que comprende las etapas de (a) obtener semillas de una planta de acuerdo con la invención; y (b) extraer el aceite de dichas semillas. Ejemplos de dicha semilla de planta incluyen canola, soja, semillas de soja, semillas de colza, girasol, algodón, cacao, cacahuete, cártamo, coco, lino, palma de aceite, *Brassica napus* oleaginosa, y maíz. Los procedimientos preferidos para transformar dichas células vegetales 20 incluyen el uso de plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium*, electroporación, y bombardeo balístico de alta velocidad.

En otro aspecto más, se proporciona un procedimiento para producir una planta que comprende aceite de semilla que contiene 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 25 comprender reproducir la planta y puede comprender las etapas de: (a) transformar una célula vegetal con el vector recombinante; y (b) regenerar dicha planta a partir de la célula vegetal, en el que la planta tiene niveles alterados de ácidos grasos omega-3. En el procedimiento, la planta puede seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que consiste en *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleaginosa*, semillas de colza, girasol, cártamo, canola, maíz, semillas de soja, algodón, lino, jojoba, árbol de sebo chino, tabaco, cacao, cacahuete, plantas frutales, plantas cítricas, y plantas que 30 producen nueces y bayas. 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 6 y la planta puede tener SDA aumentado. El procedimiento también puede comprender adicionalmente introducir el vector recombinante en una pluralidad de plantas productoras de aceite y seleccionar las plantas o descendencia que hayan heredado el vector recombinante para una planta que tenga un perfil deseado de ácidos grasos omega-3.

35 En otro aspecto más, la invención proporciona un aceite de semilla de canola endógeno que tiene un contenido de SDA de aproximadamente el 8% a aproximadamente el 27% y contenido de ácido oleico de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 70%. En ciertas realizaciones, el aceite de semilla de canola puede definirse adicionalmente como comprendiendo menos del 10% de ácido ALA combinado, LA y GLA. El aceite también puede 40 comprender un contenido de SDA definido adicionalmente como de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20%, incluyendo de aproximadamente el 12% a aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 17% y de aproximadamente el 12% a aproximadamente el 17%. En realizaciones adicionales de la invención, el aceite de semilla de canola puede tener un contenido de ácido oleico definido adicionalmente como de aproximadamente el 45% a aproximadamente el 65%, incluyendo de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 65%, de aproximadamente el 50% a 45 aproximadamente el 60% y de aproximadamente el 55% a aproximadamente el 65%. En más realizaciones adicionales de la invención, el contenido de SDA se define adicionalmente como de aproximadamente el 12% a aproximadamente el 17% y el contenido de ácido oleico se define adicionalmente como de aproximadamente el 55% a aproximadamente el 65%. En una realización de la invención, un aceite de semilla de canola es de semilla de *Brassica napus* o *Brassica rapa*. En ciertas realizaciones, un aceite proporcionado tiene una proporción de ácidos grasos omega-6 a omega-3 de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:4, incluyendo de aproximadamente 1:2 a 50 aproximadamente 1:4.

En otro aspecto 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 canola proporcionado

5 por la invención al producto comestible. En ciertas realizaciones, el producto se alimento para seres humanos y/o animales. El producto comestible también puede ser pienso animal y/o complemento alimenticio. En un procedimiento, el aceite de semilla de canola puede aumentar el contenido de SDA del producto comestibles y/o puede disminuir la proporción de ácidos grasos omega-6 a omega-3 del producto comestible. El producto comestible puede carecer de SDA antes de añadir el aceite de semilla de canola.

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

15 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento no terapéutico para proporcionar SDA a un ser humano o animal, que comprende administrar el aceite de semilla de canola de la invención a dicho ser humano o animal. En el procedimiento, el aceite de semilla de canola puede administrarse en una composición comestible, incluyendo alimentos o piensos. 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 alimenticios intermedios. La composición comestible puede ser sustancialmente un líquido o un sólido. La composición comestible también puede ser un complemento alimenticio y/o nutracéutico. En el procedimiento, el aceite de semilla de canola 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.

20 La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica o veterinaria que comprende el aceite de semilla de canola de la invención.

Breve descripción de las figuras

25 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 la región codificante de la Δ15-desaturasa fúngica NcD15D en un casete pCR2.1 (pMON67004).

La FIG. 2 muestra la región codificante de la Δ15-desaturasa fúngica NcD15D en el vector de expresión de levaduras pYES 2.1 (pMON77208).

30 La FIG. 3 muestra los niveles de ALA en 200 semi-semillas (semillas cortadas a la mitad), ordenados desde el más bajo hasta el más alto de ALA.

La FIG. 4 muestra un diagrama de flujo o los mapas plasmídicos que producen los plásmidos pMON77214 y pMON77217.

La FIG. 5 muestra un dendrograma ejemplar de polipéptidos desaturasa, incluyendo Δ15-desaturasa de *N. crassa*.

35 La FIG. 6 muestra una alineación de secuencia de polipéptidos desaturasa ejemplares respecto a la Δ15-desaturasa de *N. crassa*.

La FIG. 7A-7H muestra los mapas plasmídicos de las construcciones preparadas.

Descripción detallada de la invención

40 La invención supera las limitaciones de la técnica previa proporcionando procedimientos y composiciones para la creación de plantas con contenido mejorado de PUFA. La modificación del contenido de ácidos grasos de un organismo tal como una planta presenta muchas ventajas, incluyendo nutrición mejorada y beneficios para la salud. La modificación del contenido de ácidos grasos puede usarse para conseguir niveles beneficiosos o perfiles de PUFA deseados en plantas, 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 canola endógeno que tiene SDA contenido también al mismo tiempo un contenido beneficioso de ácido oleico.

50 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 o más células vegetales. Las composiciones relacionadas con la invención incluyen nuevas secuencias polinucleotídicas aisladas, construcciones polinucleotídicas y plantas y/o partes de plantas transformadas por los polinucleótidos de la invención. El polinucleótido aislado puede codificar ácidos grasos desaturadas fúngicas y, en particular, puede codificar una Δ15-

desaturasa fúngica. Las células huésped pueden manipularse para expresar un polinucleótido que codifique uno o más polipéptidos desaturasa que catalicen la desaturación de uno o más ácidos grasos.

Algunos aspectos de la invención incluyen diversos polipéptidos desaturasa y polinucleótidos que codifican los mismos. Diversas realizaciones de la invención pueden usar combinaciones de polinucleótidos 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 esteárico en ácido oleico, ácido oleico en LA, La en ALA, o ALA en SDA, que incluye enzimas que desaturan en las posiciones 12, 15 o 6. El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-traduccional (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 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.

Los inventores han aislado y producido enzimas de origen fúngico que muestran actividad $\Delta 15$ -desaturasa. Las fuentes fúngicas incluyen, aunque sin limitación, el género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus nidulans*; el género *Botrytis*, por ejemplo, *Botrytis cinerea*; el género *Neurospora*, por ejemplo, *Neurospora crassa*; y otros hongos que muestran actividad $\Delta 15$ -desaturasa. Es de particular interés $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa*. Se determinó que la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*, expuesta en la SEC ID Nº 3 y codificada por la secuencia de nucleótidos en la SEC ID Nº 1 y la SEC ID Nº 2, tiene un peso molecular de aproximadamente 49.123,37 Dalton. La secuencia consiste en 429 aminoácidos; 32 de los cuales son fuertemente básicos (lisina, arginina); 35 de los cuales son fuertemente ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico); 170 aminoácidos hidrófobos (alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptófano, valina); y 100 aminoácidos polares (asparagina, cisteína, glutamina, serina, treonina, tirosina). La SEC ID Nº 3 tiene un punto isoeléctrico de 7,187; una carga de 1,634 a pH 7,0; una temperatura de fusión de Davis, Botsein, Roth de 89,65°C y una temperatura de Wallace de 5098,00.

Las secuencias que codifican la $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* pueden expresarse en plantas, microorganismos o animales transgénicos para realizar mayor síntesis de ALA a partir de LA, así como SDA. También pueden usarse otros polinucleótidos que son sustancialmente idénticos al polinucleótido $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*, o que codifican polipéptidos que son sustancialmente idénticos al polipéptido $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*. "Sustancialmente idéntica" se refiere a una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que muestra en orden de preferencia creciente al menos un 80%, 90% o 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*. Pueden realizarse comparaciones de polipéptidos y polinucleótidos usando software de análisis de secuencia, por ejemplo, el paquete de software Sequence Analysis del paquete GCG Wisconsin (Accelrys, San Diego, CA), MEGAlign (DNAS-tar, 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.

La presente invención abarca desaturasas relacionadas del mismo organismo u otros organismos relacionados. Dichas desaturasas relacionadas incluyen variantes de las $\Delta 15$ -desaturasas desveladas que existen de forma natural dentro de la misma especie o diferentes especies de hongo. Las desaturasas relacionadas pueden identificarse por su capacidad de funcionar sustancialmente igual que las desaturasas desveladas; es decir, aún son capaces de convertir de forma eficaz LA en ALA y GLA en SDA. Las desaturasas relacionadas también pueden identificarse explorando bases de datos de secuencias para secuencias homólogas a las desaturasas desveladas, hibridación una sonda basada en las desaturasas desveladas con una biblioteca construida a partir del organismo fuente, o por RT-PCR usando ARNm del organismo fuente y cebadores basados en las desaturasas desveladas.

Ciertos aspectos de la invención incluyen variantes y fragmentos de un polipéptido $\Delta 15$ -desaturasa fúngico y los ácidos nucleicos que lo codifican que retienen actividad desaturasa. En otro aspecto de la invención, puede transferirse un vector que contenga un ácido nucleico, o fragmento del mismo, que contiene un promotor, una secuencia codificante de $\Delta 15$ -desaturasa y una región de terminación a un organismo en que las regiones promotoras

y de terminación son funcionales. Por consiguiente, se proporcionan por la presente invención organismos que producen $\Delta 15$ -desaturasa recombinante. Otro aspecto más de la presente invención proporciona $\Delta 15$ -desaturasa aislada, que puede purificarse de los organismos recombinantes por procedimientos convencionales de purificación de proteínas. (Por ejemplo, véase Ausubel y col., 1987).

5 Diversos aspectos de la invención incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican desaturasas, descritas en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden aislarse de hongos incluyendo, aunque sin limitación, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* y similares. Los genomas de estos hongos se han secuenciado todos y se ha determinado que cada uno es rico en ALA. Puede usarse una estrategia de clonación basada en cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar secuencias identificadas como ácido graso desaturasas potenciales, en base a búsquedas BLAST de la base de datos de ADN genómico de *N. crassa*, para secuencia clones individuales. Estos clones después pueden caracterizarse funcionalmente.

10 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 cassetes 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 dirigen la expresión del polinucleótido) generalmente usados incluyen un cassette de expresión que proporciona la expresión de un polinucleótido que codifica una $\Delta 15$ -desaturasa. En ciertas realizaciones, una célula huésped puede tener contenido de ácido oleico de tipo silvestre.

15 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 desaturasas fúngicas 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 $\Delta 15$ -desaturasa. Ejemplos de vectores incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmodos 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 20 procedimientos para prepararlos y usarlos en Sambrook y col. (1989); 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.

25 Los polinucleótidos que codifican desaturasas pueden colocarse bajo el control transcripcional de un promotor fuerte. 30 En algunos casos esto conduce a un aumento en la cantidad de enzima desaturasa expresada y de forma concomitante a un aumento en el ácido graso producido como resultado de la reacción catalizada por la enzima. Existe una amplia diversidad de secuencias promotoras de plantas que pueden usarse para dirigir la expresión 35 específica de tejido de polinucleótidos que codifican desaturasas en plantas transgénicas. Por ejemplo, el promotor de la napina y los promotores de la proteína de transporte de aceite se han usado previamente en la modificación de la composición de aceite de semilla mediante la expresión de una forma antisentido de una desaturasa (Knutzon y col. 1999). Asimismo, el promotor para la subunidad β de la β -conglicinina de soja ha demostrado ser altamente activo y provocar expresión específica de tejido en plantas transgénicas de especies diferentes de soja (Bray y col., 1987). Arondel y col. (1992) aumentaron la cantidad de ácido linolénico (18:3) en tejidos de plantas transgénicas de 40 *Arabidopsis* colocando el gen fad3 localizado en el retículo endoplasmático bajo el control transcripcional del promotor constitutivo fuerte de 35S del virus del mosaico de la coliflor.

45 Los especialistas en la técnica pueden determinar los 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 $\Delta 15$ -desaturasa en plantas transgénicas puede comprender una secuencia promotora específica de semilla derivada de heliantinina, napina, o glicinina unida de forma funcional a la región codificante de $\Delta 15$ -desaturasa y adicionalmente unida de forma funcional a una señal de terminación de proteína de almacenamiento en semilla o la señal de terminación de la nopalina sintasa. Como un ejemplo adicional más, un vector para su uso en la expresión de $\Delta 15$ -desaturasa en plantas puede comprender un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido unido de forma 50 funcional a la región codificante de la $\Delta 15$ -desaturasa y adicionalmente unido de forma funcional a un terminador constitutivo o específico de tejido o la señal de terminación de la nopalina sintasa.

55 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 delecciones, y específicamente sustituciones que reflejan la degeneración del código genético.

60 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. (1989), o cualquiera de la mirada 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

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 la retención de proteínas en el retículo endoplasmático o secuencias que codifican péptidos de tránsito que dirigen la $\Delta 15$ -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).

En ciertas realizaciones, los casetes de expresión pueden incluir un casete que proporciona actividad $\Delta 6$ - y/o $\Delta 15$ -desaturasa, particularmente en una célula huésped que produce o puede aceptar LA o ALA, respectivamente. La producción de ácidos grasos insaturados de tipo omega-6, tales como LA, está favorecida en un organismo huésped que es incapaz de producir ALA. La producción de ALA por el huésped puede eliminarse, reducirse y/o inhibirse inhibiendo la actividad de una $\Delta 15$ -desaturasa. Esto puede conseguirse por selección convencional, proporcionando un casete de expresión para una $\Delta 15$ -desaturasa antisentido, alterando un gen diana de $\Delta 15$ -desaturasa a través de inserción, delección, sustitución de parte o todo el gen diana, o añadiendo un inhibidor de $\Delta 15$ -desaturasa. Asimismo, la producción de LA o ALA está favorecida en un microorganismo o animal que tiene actividad $\Delta 6$ -desaturasa proporcionando un casete de expresión para un transcripto $\Delta 6$ antisentido, alterando un gen de $\Delta 6$ -desaturasa, o mediante el uso de un inhibidor de $\Delta 6$ -desaturasa.

Los polinucleótidos que codifican desaturasas deseadas pueden identificarse de una diversidad de modos. Como un ejemplo, se explora una fuente de la desaturasa deseada, por ejemplo bibliotecas de ADN genómico o ADNc de *Neurospora*, con sondas detectable enzimática o químicamente sintetizadas, que pueden prepararse a partir de ADN, ARN, o nucleótidos de origen no natural, o mezclas de los mismos. Las sondas pueden sintetizarse enzimáticamente a partir de polinucleótidos de desaturasas conocidas para procedimientos de hibridación de rigurosidad normal o reducida. Las sondas oligonucleotídicas también pueden usarse para explorar fuentes y pueden basarse en secuencias de desaturasas conocidas, incluyendo secuencias conservadas entre desaturasas conocidas, o en secuencias peptídicas obtenidas de la proteína purificada deseada. Las sondas oligonucleotídicas basadas en secuencias de aminoácidos puede degenerarse para abarcar la degeneración del código genético, o pueden desviarse en favor de los codones preferidos del organismo fuente. Los oligonucleótidos también pueden usarse como cebadores para PCR a partir de ARN transcripto de forma inversa de una fuente conocida o sospechosa; el producto de PCR puede ser el ADNc de longitud completa o puede usarse para generar una sonda para obtener el ADNc de longitud completa deseado. Como alternativa, una proteína deseada puede secuenciarse completamente y realizarse la síntesis total de un ADN que codifique ese polipéptido.

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 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 diferentes moldes tales como ADN monocatenarios. 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, para potenciar la expresión, empleando codones preferidos por el huésped. Los codones preferidos por el huésped pueden determinarse a partir de los codones de la mayor frecuencia en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en una especie de huésped particular 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 transcripto. Todo o partes del ADN también pueden sintetizarse para alterar la composición de bases a una más preferente 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.

Una vez se ha obtenido el polinucleótido que codifica un polipéptido desaturasa, se coloca en un vector con capacidad de replicación en una célula huésped, o se propaga *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.

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 5 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.

La expresión en una célula huésped puede realizarse de un modo transitorio o estable. La expresión transitoria 10 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 conseguirse 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 15 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 20 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.

Cuando se desea la expresión aumentada del polipéptido desaturasa en el organismo fuente, pueden emplearse 25 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 EE. UU. n.º 4.910.141).

Se contempla que puede introducirse más de un polinucleótido codificante de desaturasa o un polinucleótido 30 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 35 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.

Cuando es necesario para la transformación, la secuencia codificante de Δ15-desaturasa de la presente invención 40 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 45 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.

50 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'.

55 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 60

biotina-estreptavidina/avidina. Los marcadores detectables típicamente incluyen isótopos radiactivos, moléculas que producen luz de forma química o enzimática o la alteran, 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 EE. UU. n.º

- 5 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 la 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 la sonda, respectivamente, como puede hacerse con el sistema BIACore.
- 10 Pueden introducirse construcciones que comprenden el gen de interés en una célula huésped por técnicas convencionales. Por conveniencia, una 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 15 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 20 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 permitir el crecimiento en medio selectivo cuando se expresa en el huésped transformado. La selección de un huésped transformado también 25 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 30 marcadora o una marca molecular en, por ejemplo, una proteína de interés. Las células que expresan 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.

35 Es de particular interés la producción mediada por Δ15-desaturasa de PUFA en células huésped eucariotas. Las células eucariotas incluyen células vegetales, tales como aquellas de plantas de cultivo productoras de aceite, y otras células susceptibles a manipulación genética incluyendo células fúngicas. Las células pueden cultivarse o formarse como parte o todo un organismo huésped incluyendo una planta. En una realización preferida, el huésped es una célula vegetal que produce y/o puede asimilar uno o más sustratos suministrados de forma exógena para una Δ15-desaturasa, y preferentemente produce grandes cantidades de uno o más de los sustratos.

40 La célula huésped transformada se cultiva en condiciones apropiadas adaptadas para un resultado final deseado. Para células huésped que han crecido en cultivo, las condiciones típicamente se optimizan para producir la mayor producción o más económica de PUFA, que se refiere a la actividad desaturasa seleccionada. Las condiciones del medio que pueden optimizarse incluyen: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, adición de sustrato, concentración final del sustrato añadido, forma del sustrato añadido, crecimiento aeróbico o anaeróbico, temperatura de crecimiento, agente inductor, temperatura de inducción, fase de crecimiento en la inducción, fase de crecimiento en la recogida, pH, densidad, y mantenimiento de selección.

45 Otro aspecto de la presente invención proporciona plantas transgénicas o descendencia de plantas que contienen el ADN aislado de la invención. Se contemplan tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Las células vegetales se transforman con un ADN aislado que codifica Δ15-desaturasa por cualquiera de los procedimientos de transformación de plantas descritos anteriormente. La célula vegetal transformada, habitualmente 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). En una realización, la planta transgénica se selecciona entre el grupo que consiste en *Arabidopsis thaliana*, canola, soja, semilla de soja, semilla de colza, girasol, algodón, cacao, cacahuate, cártamo, coco, lino, palma de aceite, *Brassica napus* oleaginosa, maíz, jojoba, árbol de sebo chino, tabaco, plantas frutales, plantas cítricas o plantas que producen nueces y bayas. Como la descendencia de plantas transformadas hereda el polinucleótido que codifica Δ15-desaturasa, pueden usarse las semilla o esquejes de plantas transformadas para mantener la línea de la planta transgénica.

50 La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para proporcionar plantas transgénicas con un contenido aumentado de ALA y/o SDA. Este procedimiento incluye, por ejemplo, introducir ADN que codifica Δ15-desaturasa en células vegetales que carecen de o tienen niveles bajos de ALA o SDA pero contienen LA, y regenerar las plantas con contenido aumentado de ALA y/o SDA a partir de las células transgénicas. En ciertas

realizaciones de la invención, también puede introducirse un ADN que codifica una Δ6 y/o Δ12-desaturasa en las células vegetales. Dichas plantas pueden comprender también o no actividad Δ6 y/o Δ12-desaturasa endógena. En ciertas realizaciones, se contemplan como el organismo transgénico plantas de cultivo modificadas cultivadas de forma comercial incluyendo, aunque sin limitación, *Arabidopsis thaliana*, canola, soja, semilla de soja, semilla de colza, girasol, algodón, cacao, cacahuete, cártamo, coco, lino, palma de aceite, *Brassica napus* oleaginosa, maíz, jojoba, árbol de sebo chino, tabaco, plantas frutales, plantas cítricas o plantas que producen nueces y bayas.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para proporcionar plantas transgénicas que pueden contener niveles elevados de ALA y/o SDA, en el que dichos niveles elevados son mayores que los niveles encontrados en plantas no transformadas. Este procedimiento puede comprender la introducción de uno o más polinucleótidos que codifican Δ15-desaturasa en una planta que carece de o tiene niveles bajo de ALA, pero contiene LA. Pueden construirse vectores de expresión que comprenden ADN que codifica una Δ15-desaturasa, o una Δ15-desaturasa y una Δ6-desaturasa, por procedimiento de tecnología recombinante conocidos para los especialistas en la técnica (Sambrook y col., 1989). En particular, se contemplan como el organismo transgénico plantas de cultivo modificadas cultivadas de forma comercial incluyendo, aunque sin limitación, *Arabidopsis thaliana*, canola, soja, semilla de soja, semilla de colza, girasol, algodón, cacao, cacahuete, cártamo, coco, lino, palma de aceite, *Brassica napus* oleaginosa y maíz.

Para complementación alimentaria, 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, complementos nutritivos u otros productos alimenticios, y pueden encontrar uso como agentes antiinflamatorios 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, púdines, 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).

Además, las composiciones comestibles descritas en el presente documento también pueden ingerirse como un aditivo o complemento 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 alimentación 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 complementación alimentaria 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. La presente invención abarca cualquier sal farmacéuticamente aceptable; son especialmente preferidas las sales de sodio, potasio o litio. También están abarcadas 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.

Si se desea, las regiones de un polipéptido desaturasa importantes para la actividad desaturasa pueden determinarse a través de mutagénesis rutinaria seguida por la expresión de los polipéptidos mutantes resultantes y la determinación de sus actividades. Los mutantes pueden incluir sustituciones, delecciones, inserciones y mutaciones puntuales, o combinaciones de las mismas. Las sustituciones pueden hacerse en base a la

5 hidrofobicidad o hidrofilicidad conservada (Kyte y Doolittle, 1982), o en base a la capacidad de asumir estructura secundaria polipeptídica similar (Chou y Fasman, 1978). Un análisis funcional típico comienza con mutagénesis de delección para determinar los límites N- y C-terminales de la proteína necesaria para la función, y después se hacen delecciones internas, inserciones o mutaciones puntuales para determinar adicionalmente las regiones necesarias para la función. También pueden usarse otras técnicas tales como mutagénesis con casete o síntesis total. La 10 mutagénesis de delección se consigue, por ejemplo, usando exonucleasas para eliminar secuencialmente las regiones codificantes 5' o 3'. Están disponibles kits para dichas técnicas. Después de la delección, la región codificante se completa ligando oligonucleótidos que contienen codones de inicio o parada a la región codificante delecionada después de la delección 5' o 3', respectivamente. Como alternativa, se insertan oligonucleótidos que 15 codifican codones de inicio o parada en la región codificante mediante una diversidad de procedimientos incluyendo mutagénesis dirigida al sitio, PCR mutagénica o por ligamiento en ADN digerido en sitios de restricción existentes.

Las delecciones internas pueden hacerse asimismo a través de una diversidad de procedimientos incluyendo el uso 20 de sitios de restricción existentes en el ADN, por el uso de cebadores mutagénicos mediante mutagénesis dirigida al sitio o PCR mutagénica. Las inserciones se hacen a través de procedimientos tales como mutagénesis por barrido con enlazador, mutagénesis dirigida al sitio o PCR mutagénica. Las mutaciones puntuales se hacen a través de 25 técnicas tales como mutagénesis dirigida al sitio o PCR mutagénica. También puede usarse mutagénesis química para identificar regiones de un polipéptido desaturasa importantes para la actividad. Dicho análisis de estructura-función puede determinar las regiones que pueden delecionarse, las regiones que pueden tolerar inserciones, y las mutaciones puntuales que permiten que la proteína mutante funcione sustancialmente del mismo modo que la desaturasa nativa. Todas estas proteínas mutantes y las secuencias de nucleótidos que las codifican están dentro 25 del alcance de la presente invención.

Como se ha descrito anteriormente, ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a construcciones de transformación de plantas. Por ejemplo, un aspecto de la presente invención es un vector de transformación de 30 plantas que comprende uno o más genes o ADNc de desaturasa. Secuencias codificantes ejemplares para su uso con la invención incluyen el gen de Δ15-desaturasa de *Neurospora crassa* NcD15D (SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2). En ciertas realizaciones, también pueden emplearse secuencias antisentido de desaturasa con la invención. Ácidos 35 nucleicos codificantes de desaturasa ejemplares incluyen al menos 20, 40, 80, 120, 300 y puede usarse hasta la longitud completa de las secuencias de ácido nucleico de la SEC ID Nº 1 o la SEC ID Nº 2. En ciertos aspectos, un ácido nucleico puede codificar 1, 2, 3, 4, o más enzimas desaturadoras. En realizaciones particulares, un ácido nucleico puede codificar una Δ6 y una Δ15-desaturasa.

40 En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan secuencias codificantes 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., 1989; Gelvin y col., 1990). Las técnicas de la presente invención por tanto no están limitadas a ninguna secuencia de ácido nucleico particular.

45 Un uso de las secuencias proporcionadas por la invención será en la alteración de fenotipos vegetales, por ejemplo, la composición de aceite, por transformación genética con genes de desaturasa. 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.

50 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 agronómicamente 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 Δ15-desaturasa fúngica. Dicho aumento de SDA puede comprender, en ciertas realizaciones de la invención, la expresión de Δ6 y/o Δ12 desaturasa, incluyendo Δ6 y/o Δ12 desaturasas fúngicas o vegetales.

55 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. De

acuerdo con la invención, esto podría usarse para introducir diversos ácidos nucleicos codificantes de desaturasa. La introducción de dichas secuencias puede facilitarse mediante el uso de cromosomas artificiales 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).

- 5 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 deseé. 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 la presente invención también abarca plantas transgénicas que incorporan transgenes no expresados. Los componentes preferidos a incluir probablemente con los vectores usados en la presente invención son los siguientes.
- 10 15 En una realización, la presente invención utiliza ciertos promotores. Ejemplos de dichos promotores que pueden usarse con la presente invención incluyen el 35S CaMV (virus del mosaico de la coliflor), 34S FMV (virus del mosaico de la escrofularia) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.378.619), Napina (de *Brassica*), 7S (de soja), Glob y Lec (de maíz). El promotor de 35S CaMV y promotores que se regulan durante la maduración de la semilla de la planta, son de particular interés para su uso con la presente invención. Todos estos elementos 20 promotores y reguladores de la transcripción, individualmente o en combinación, se contemplan para su uso en los presentes vectores de expresión replicables y son conocidos para los especialistas en la técnica.

25 El promotor de CaMV 35S se describe, por ejemplo, por Restrepo y col. (1990). Las secuencias reguladoras genéticamente transformadas y mutadas que conducen a expresión específica de semilla también pueden emplearse para la producción de composición modificada de aceite de semilla. Dichas modificaciones de la invención aquí descritas serán obvias para los especialistas en la técnica.

30 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 una construcción de transformación de la invención. 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.

35 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 terminador 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 terminador del transcrito T7 del gen de la octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, el extremo 3' de los genes de inhibidor I o II de proteasa de patata o tomate y el terminador de CaMV 35S (tml3'). 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 deseé.

40 45 Empleando una proteína marcadora de selección o exploración, se puede proporcionar o potenciar la capacidad de identificar transformantes. Los "genes marcadores" son genes que confieren un fenotipo distinto a células que expresan la proteína marcadora y por tanto permiten que dichas células transformadas se distingan de células que no tienen el marcador. Dichos genes pueden codificar un marcador de selección o exploración, dependiendo de si el marcador confiere un rasgo que pueda "seleccionarse" por medios químicos, es decir, a través del uso de un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida o antibiótico), o si es simplemente un rasgo que puede identificarse a través de observación o ensayo, es decir, por "exploración" (por ejemplo, la proteína fluorescente verde). Por supuesto, se conocen en la técnica muchos ejemplos de proteínas marcadoras adecuadas y pueden emplearse en la práctica de la invención.

50 55 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 pueda 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 EE. UU. n.º 5.384.253), por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepller y col., 1990; patente de EE. UU. n.º 5.302.523; y patente de EE. UU. n.º 5.464.765) por transformación mediada por *Agrobacterium* (patente de EE. UU. n.º 5.591.616 y patente de EE. UU. n.º 5.563.055) y por aceleración de partículas recubiertas con ADN

(patente de EE. UU. n.º 5.550.318; patente de EE. UU. n.º 5.538.877; y patente de EE. UU. n.º 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.

5 Despues 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. 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 explorarían las células para el rasgo del gen marcador deseado.

10 Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que se han valorado como positivas en un ensayo de exploración, pueden cultivarse en medios que soporten la regeneración de las plantas. En una realización ejemplar, los medios MS y N6 pueden modificarse incluyendo sustancias adicionales tales como reguladores del crecimiento. Uno de estos reguladores del crecimiento es dicamba o 2,4-D. Sin embargo, pueden emplearse otros reguladores del crecimiento, incluyendo NAA, NAA + 2,4-D o picloram. Se ha descubierto que la mejora del medio de estos modos y similares facilita el crecimiento de células en fases específicas del desarrollo. Los tejidos pueden mantenerse en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que está disponible suficiente tejidos para empezar los esfuerzos de regeneración de la planta, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido es adecuada para la regeneración, típicamente al menos 2 semanas, entonces se transfieren a medio propicio para la maduración de los embrioides. Los cultivos se transfieren cada 2 semanas en este medio. El desarrollo de brotes señalizará el momento para la transferencia a medio que carezca de reguladores del crecimiento.

25 Para confirmar la presencia del ADN exógeno o "transgén(es)" en las plantas en regeneración, puede realizarse una diversidad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular", tales como transferencia de Southern y Northern y PCR™; ensayos "bioquímicos", tales como detección de la presencia de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencias de Western) o por función enzimática; ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces; y también, por análisis del fenotipo de la planta regenerada completa.

30 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 Δ6, Δ12, y/o Δ15-desaturasa(s) en una única planta. De este modo, puede regularse positivamente de forma eficaz la Δ15-desaturasa. Creando plantas homocigóticas para una actividad Δ15-desaturasa y/u otra actividad desaturasa (por ejemplo, actividad Δ6 y/o Δ12-desaturasa) pueden aumentarse metabolitos beneficiosos en la planta.

35 Como se ha expuesto anteriormente, puede introducirse un gen de desaturasa seleccionado en una variedad de planta particular por cruce, sin la necesidad de transformar nunca directamente una planta de esa variedad dada. Por lo tanto, la presente invención también no solamente abarca 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" indica los descendientes de cualquier generación de una planta precursora preparada de acuerdo con la presente invención, en la que 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.

45 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.

50 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

Cepas y condiciones de cultivo

Se obtuvieron *Neurospora crassa* coincidente de tipo A y *Aspergillus nidulans* de tipo silvestre Glasgow del Fungal Genetics Stock Center. Los cultivos se cultivaron en medio de Vogel N. (Case y col., *Neurospora Newsletter*, 8:25-26, 1965). Los cultivos líquidos se inocularon con ascosporas y se cultivaron durante tres días a ~15°C con agitación a 100 RPM. Se recogió el micelio por filtración en un embudo Buchner a través de papel Whatman número 1 y se almacenó a 80°C para el aislamiento del ARN o se liofilizó directamente para la determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada fue INVSc1, una cepa diploide que es auxotrófica para histidina, leucina, triptófano, y uracilo (Invitrogen). Las células se mantuvieron en medio YPD a 30°C.

Ejemplo 2

Aislamiento de ARN fúngico

Se aisló el ARN total del micelio fúngico de las 3 cepas descritas en el Ejemplo 1 usando el procedimiento de guanidinio-fenol-cloroformo ácido de Chomczynski y Sacchi, (1987, Tri-Reagent, SIGMA). Este procedimiento proporciona 500 mg de micelio que se tritura en nitrógeno líquido y después se añade a 7 ml de Tri-Reagent. Se añadió cloroformo para separar la fase acuosa de la fase orgánica. El ARN se precipitó con isopropanol, después se lavó con etanol al 70% antes de resuspenderse en agua desionizada.

Ejemplo 3

Clonación de las secuencias de Δ12 y Δ15-desaturasa de *N. crassa*

En base a las comparaciones de secuencia con las secuencias genómicas de *N. crassa*, se diseñaron cebadores específicos de gen para amplificar las regiones codificantes de longitud completa de la putativa Δ12-desaturasa (Nc111F2 y Nc111R3) y la putativa Δ15-desaturasa (Nc94F6 y Nc94R8). Los cebadores directos se diseñaron para incluir tres nucleótidos 5' del sitio de inicio Met

Nc111F2: 5'-AAGATGGCGTCCGTCTCCTCTGCCCTTCCC-3' (SEC ID Nº 15)

Nc111R3: 5'-TTAGTTGGTTTGGGGAGCTTGGCAGGCTT-3' (SEC ID Nº 16)

Nc94F6: 5'-GC GGCCGCAACATGACGGTACCCACCCGAGCCA-3' (SEC ID Nº 17). El sitio NotI añadido al extremo 5' del oligonucleótido está en cursiva.

Nc94R8: 5'-CCTGCAGGTTACTGGGTGCTCTGAACGGTGTGCG-3' (SEC ID Nº 18). El sitio Sse83871 añadido al extremo 5' del oligonucleótido está en cursiva.

El ADNc para *N. crassa* se preparó usando el kit de amplificación de ADNc Marathon (Clontech Laboratories). Estos cebadores se usaron con ADNc listo para 3'-RACE para amplificar desaturasas putativas usando un sistema de PCR Gene Amp 9700 (PE Applied Biosystems) con las condiciones de ciclo recomendadas. El producto de PCR generado con los oligonucleótidos Nc94F6 y Nc94R8 se ligó en pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se llamó pMON67004 (FIG. 1). Se secuenció el ADNc y se descubrió que había tres "cajas His", un elemento conservado entre las desaturasas unidas a membrana, presentes en las posiciones de aminoácido 124-128, 160-164, y 359-363.

Cuando se comparan con otras Δ12 y Δ15-desaturasas unidas a membrana, se descubrió que el motivo de caja histidina "HXXHH" final también estaba intacto. Las correspondientes secuencias nucleotídica y polipeptídica para la Δ15-desaturasa (NcD15D) se dan en la SEC ID Nº 2 y la SEC ID Nº 3, respectivamente, y el clon genómico se da en la SEC ID Nº 1. Se digirió pMON67004 con EcoR1 y se ligó en el sitio EcoR1 del vector de expresión en levaduras pYES2/CT para generar pMON77208 (FIG. 2). Para los vectores de transformación de plantas, se digirió pMON67004 con EcoRI, seguido por una reacción de relleno, y después se cortó por Sse83871. El fragmento génico se ligó en el vector binario, pMON73270, que se digirió por NotI, seguido por una reacción de relleno, y después por Sse83871. Esto dio lugar al vector pMON77214 (FIG. 4) en que el gen de Δ15-desaturasa, NcD15D, estaba bajo la regulación del promotor específico de semilla de Napina. El fragmento de ADN digerido con EcoRI/Sse83871 también

se ligó en el vector binario, pMON73273, dando lugar a pMON77217 (FIG. 4), en que NcD15D estaba bajo la regulación del promotor constitutivo de 35S.

5 El producto de PCR generado con los oligonucleótidos Nc111F2 y Nc111R3 se ligó directamente en pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) para generar pMON67005 (FIG.7A). Se secuenció el ADNC y se descubrió que había tres "cajas His" presentes en las posiciones de aminoácido 158-162, 194-198, y 394-398. Cuando se comparan con otras Δ12 y Δ15-desaturasas unidas a membrana, se descubrió que el motivo de caja histidina "HXXHH" final también estaba intacto. Las correspondientes secuencias nucleotídica y polipeptídica para la putativa Δ12-desaturasa (NcD12D) se dan en la SEC ID Nº 39 y la SEC ID Nº 40, respectivamente.

Ejemplo 4

10 Transformación y expresión en levaduras

Se introdujeron las construcciones pMON67005 y pMON77208 en la cepa huésped *S. cerevisiae* INVSc1 (auxotrófica para uracilo) usando el protocolo PEG/Li Ac como se describe en el manual de Invitrogen para pYES2.1/V5-His-TOPO. Los transformantes se seleccionaron en placas preparadas de medio mínimo SC menos uracilo con glucosa al 2%. Las colonias de transformantes se usaron para inocular 5 ml de medio mínimo SC menos uracilo y glucosa al 2 % y se cultivaron durante una noche a 30°C. Para la inducción, se sedimentaron las células de levadura en fase estacionaria y se resuspendieron en medio mínimo SC menos uracilo complementado con galactosa al 2% y se cultivaron durante 3 días a 15°C. Cuando se proporcionaron ácidos grasos exógenos a los cultivos, se añadieron 0,01% de LA (Δ9,12-18:2) con el emulsionante Tergitol al 0,1%. Los cultivos se cultivaron durante 3 días a 15°C, y posteriormente se recogieron por centrifugación. Los sedimentos celulares se lavaron una vez con tampón TE estéril pH 7,5, para retirar el medio, y se liofilizaron durante 24 h. La cepa huésped transformada con el vector que contenía el gen LacZ se usó como control negativo en todos los experimentos.

25 Para el análisis de ácidos grasos, la extracción de los lípidos de la levadura siguió los procedimientos descritos previamente. En resumen, se extrajeron los sedimentos celulares liofilizados con 15 ml de metanol y 30 ml de cloroformo que contenía 100 µg de tridecanoína. Después de la extracción, los lípidos de la levadura se saponificaron primero, y se metilaron los ácidos grasos liberados. Después se analizó la distribución de los ésteres metílicos de ácido graso por cromatografía de gases (CG) usando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 II Plus (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipado con un detector de ionización por llama y una columna capilar de sílice condensada (Supelomega; 50 m x 0,25 mm, d.i., Supelco, Bellefonte, PA).

30 En la levadura transformada con el vector de expresión que contiene LacZ como control, no se midió LA o ALA (18:3) en líneas cultivadas en ausencia de LA añadido. En la levadura transformada con un vector de expresión que contiene NcD15D o BnD15D, en ausencia de LA añadido, no se acumuló ALA. En la levadura transformada con un vector de expresión que contiene NcD12D, sin LA añadido, se acumuló LA hasta el 22% de los ácidos grasos, indicativo de actividad D12D. Cuando se añadió LA a la línea de levadura que expresa NcD15D, el ALA comprometió el 1% de los ácidos grasos. En la línea de levadura que expresa la Δ15-desaturasa de *Brassica napus* (BnD15D), el ALA comprometió el 0,2% de los ácidos grasos después de la adición de LA. En el control de LacZ, no se detectó ALA después de la adición de LA.

TABLA 1 Datos de expresión en levaduras

| Construcción | Identidad | Sustrato FA añadido | % de ácidos grasos en levaduras | | | | | |
|--------------|-----------|---------------------|---------------------------------|-------|------|-------|-------|------|
| | | | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 |
| pMON77208 | NcD15D | ninguno | 13,96 | 48,33 | 5,06 | 29,07 | 0,02 | 0,02 |
| pMON67003 | BnD15D | ninguno | 13,22 | 48,15 | 5,18 | 29,82 | 0,00 | 0,00 |
| PMON67005 | NcD12D | ninguno | 15,24 | 47,95 | 5,18 | 10,3 | 22,3 | 0 |
| LacZ | LacZ | ninguno | 14,01 | 49,61 | 5,27 | 27,29 | 0,02 | 0,01 |
| pMON77208 | NcD15D | 18:2 | 18,34 | 25,98 | 5,94 | 16,09 | 30,30 | 1,04 |
| pMON67003 | BnD15D | 18:2 | 18,45 | 26,19 | 5,91 | 16,26 | 30,61 | 0,20 |
| LacZ | LacZ | 18:2 | 19,26 | 18,87 | 6,00 | 10,82 | 42,47 | 0,01 |

Ejemplo 5**Transformación de *Arabidopsis* con NcD15D**

5 Este ejemplos describe la transformación y regeneración de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan una secuencia codificante heteróloga de Δ15-desaturasa. Se cultivaron plantas de *Arabidopsis* sembrando semillas en macetas de 10,16 centímetros que contenían agua por ósmosis inversa (ROW) y MetroMix 200 saturado (The SCOTTS Co., Columbus, OH). Las plantas se transformaron por vernalización colocando las macetas en cajoneras, cubiertas con una cúpula de humedad, en una cámara de crecimiento a 4-7°C, con 8 horas de luz/día durante 4-7 días. Las cajoneras se transfirieron a una cámara de crecimiento a 22°C, 55% de humedad relativa, y 16 horas de luz/día a una intensidad promedio de 160-200 ~Mol/s*m². Después de la germinación, la cúpula se levantó y se deslizó hacia atrás 2,54 cm para permitir la circulación suave de aire sin desecación. La cúpula de humedad se retiró cuando se hubieron formado las verdaderas hojas. Las plantas se regaron en la parte inferior, según lo necesario, con ROW hasta 2-3 semanas después de la germinación. Las plantas se regaron en la parte inferior, según lo necesario, con solución PLANTEX 18-18-15 (Plantex Corporation Ottawa, Canadá) a 50 ppm de N₂. Las macetas se redujeron de modo que permaneciera 1 planta por maceta a las 2-3 semanas después de la germinación. Una vez las plantas comenzaron a florecer, se recortó la inflorescencia principal para alentar el crecimiento de tallos axilares de floración.

20 Se introdujeron los vectores de transformación pMON77214 y pMON77217 en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* ABI usando metodología bien conocida en la técnica. Se obtuvieron plantas transgénicas de *A. thaliana* como se describe por Bent y col. (1994) o Bechtold y col. (1993). En resumen, se cultivaron cultivos de *Agrobacterium* que contenían los vectores binarios pMPON77214 o pMON77217, durante una noche en LB (bacto-triptona al 10%, extracto de levadura al 5%, y NaCl al 10% con kanamicina (75 mg/l), cloranfenicol (25 mg/l), y espeictinomicina (100 mg/l)). El cultivo bacteriano se centrifugó y se resuspendió en sacarosa al 5% + Silwet-77 al 0,05%. La parte aérea de plantas completas de *A. thaliana* (~5-7 semanas de edad) se sumergió en la solución resultante durante 2-3 segundos. El exceso de solución se retiró transfiriendo las plantas a toallas de papel. Las plantas sumergidas se colocaron de lado en una cajonera cubierta y se transfirieron a una cámara de crecimiento a 19°C. Después de 16 a 24 horas, se retiró la cúpula y las plantas se pusieron derechas. Cuando las plantas alcanzaron la madurez, se privaron de agua durante 2-7 días antes de recoger las semillas. La semilla recogida se pasó a través de un tamiz de malla de acero inoxidable.

25 Para seleccionar los transformantes, la semilla se colocó en medio agar que contenía 50 mg/l de glifosato. Los plantones verdes se rescataron y trasplantaron en macetas de 10,16 cm y se cultivaron en las condiciones descritas anteriormente. Se recogieron las hojas para el análisis de ácidos grasos cuando la roseta estuvo en fase de 4 hojas. Después de la liofilización, se analizaron los ácidos grasos de las hojas como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 6**Expresión funcional de clones de *N. crassa***

30 Para evaluar la especificidad funcional del clon de *N. crassa* D15D, se clonó la región codificante de pMON67004 en un vector de expresión de plantas en que el promotor constitutivo de 35S dirige la expresión del transgén. La

5 construcción resultante, pMON77217, se transformó en *A. thaliana* y se analizaron las hojas de plantas T2 transformadas para la composición de ácidos grasos. En líneas no transformadas, aproximadamente el 20% de los ácidos grasos eran LA, y aproximadamente el 48% ALA. En dos eventos independientes de transformación de *A. thaliana*, los niveles de LA estaban reducidos hasta aproximadamente el 3% y el 5%, y los niveles de ALA estaban aumentados hasta el 65% y el 63%, respectivamente, lo que indica actividad $\Delta 15$ -desaturasa *in planta*. Estos datos se resumen en la Tabla 2. Los controles se denominan como CONT.

TABLA 2 Contenido de ácidos grasos de hojas de *Arabidopsis*

| EVENTO | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 (LA) | 18:3(ALA) |
|---------|------|------|------|------|-----------|-----------|
| CONT 1 | 14,9 | 0,8 | 1,4 | 4,8 | 19,7 | 48,2 |
| CONT 2 | 15,3 | 0,9 | 1,4 | 5,1 | 20,5 | 49,2 |
| CONT 3 | 14,5 | 0,9 | 1,4 | 5,1 | 19,6 | 49,5 |
| ATG174 | 15,6 | 1,0 | 1,6 | 4,6 | 15,4 | 51,9 |
| AT G717 | 15,3 | 0,7 | 1,4 | 4,2 | 17,9 | 52,1 |
| AT G716 | 14,9 | 0,6 | 1,6 | 3,1 | 15,8 | 55,1 |
| ATG718 | 15,3 | 0,8 | 1,8 | 4,0 | 5,4 | 63,7 |
| AT G709 | 17,0 | 0,9 | 1,9 | 4,3 | 3,5 | 64,0 |

10 15 Para evaluar la especificidad funcional del clón de *N. crassa* D15D para dirigir la producción de ALA en semillas, se clonó la región codificante de pMON67004 en un vector de expresión específico de semilla en que el promotor de Napina dirige la expresión del transgén. La construcción resultante, pMON77217, se transformó en *A. thaliana* y se analizaron las semillas de plantas T2 transformadas para la composición de ácidos grasos. En líneas no transformadas, aproximadamente el 26% de los lípidos de las semillas estaban presentes como LA, y aproximadamente el 18% como ALA. En dos eventos independientes de transformación de *A. thaliana*, los niveles de ácido LA estaban reducidos hasta aproximadamente el 14% y el 13%, y los niveles de ácido ALA estaban aumentados hasta el 26% y el 30%, respectivamente, lo que indica actividad $\Delta 15$ -desaturasa en las semillas. Los datos se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3 Contenido de ácidos grasos de semillas de *Arabidopsis*

| EVENTO | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 (LA) | 18:3 (ALA) |
|---------|------|------|------|-------|-----------|------------|
| Control | 6,86 | 0,39 | 2,94 | 14,7 | 27,95 | 17,75 |
| Control | 7,11 | 0,37 | 3,33 | 15,22 | 26,48 | 18,11 |
| G709 | 7,1 | 0,37 | 3,13 | 13,16 | 24,58 | 20,85 |
| G711 | 7,08 | 0,37 | 3,16 | 13,49 | 24,24 | 21,07 |
| G705 | 7,75 | 0,38 | 3,09 | 12,62 | 19,26 | 26,3 |
| G707 | 8,12 | 0,36 | 2,98 | 14,2 | 15,71 | 29,74 |

20 Estos resultados indican que la proteína codificada por el ADNc de *Neurospora* NcD15D es una $\Delta 15$ -desaturasa funcional en plantas y puede dirigir la síntesis de ALA en hojas y en semillas.

Ejemplo 7

Actividad de la $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* en canola

25 Se transformaron líneas con la construcción pMON77214, que contiene la $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora* dirigida por el promotor de Napina. Se transformaron ambas variedades de canola Quantum y Ebony y se incluyeron

controles para las dos variedades. Los datos mostrados en la Tabla 4 es el porcentaje de 18:2 (LA) y 18:3 (ALA) en combinaciones de 20 semillas de plantas R₀.

TABLA 4 Porcentaje de PUFA en combinaciones de 20 semillas de plantas R₀.

| CEPA ID | 18:2 (LA) | 18:3 (ALA) |
|----------|-----------|------------|
| EBONY | 19,78 | 5,94 |
| EBONY | 18,13 | 7,51 |
| EBONY | 19,46 | 7,56 |
| QUANTUM | 22,51 | 11,09 |
| QUANTUM | 23,39 | 11,17 |
| EBONY | 19,11 | 11,49 |
| QUANTUM | 23,05 | 12,03 |
| QUANTUM | 21,04 | 12,27 |
| BN_G1289 | 12,48 | 12,53 |
| BN_G1248 | 12,55 | 13,31 |
| BN_G1275 | 12,67 | 13,45 |
| BN_G1256 | 9,33 | 13,7 |
| BN_G1251 | 12,3 | 13,89 |
| BN_G1311 | 10,07 | 14,08 |
| BN_G1282 | 11,41 | 14,69 |
| BN_G1321 | 8,98 | 14,83 |
| BN_G1317 | 11,17 | 14,84 |
| BN_G1283 | 10,54 | 15,05 |
| BN_G1281 | 11,66 | 15,24 |
| BN_G1272 | 8,12 | 15,71 |
| BN_G1312 | 10,36 | 15,9 |
| BN_G1249 | 15,65 | 16,09 |
| BN_G1270 | 10,46 | 16,48 |
| BN_G1271 | 9,45 | 16,48 |
| BN_G1322 | 9,57 | 16,61 |
| BN_G1347 | 7,18 | 17,15 |
| BN_G1353 | 9,84 | 17,17 |
| BN_G1348 | 15,69 | 17,27 |
| BN_G1323 | 7,33 | 17,52 |
| BN_G1287 | 5,95 | 17,53 |

(continuación)

| CEPA ID | 18:2 (LA) | 18:3 (ALA) |
|----------|-----------|------------|
| BN_G1318 | 11 | 17,96 |
| BN_G1389 | 13,72 | 18 |
| BN_G1295 | 10,46 | 18,03 |
| BN_G1319 | 7,53 | 18,44 |
| BN_G1286 | 7,88 | 19,11 |
| BN_G1316 | 5,67 | 19,32 |
| BN_G1355 | 9,86 | 19,38 |
| BN_G1400 | 14,17 | 19,4 |
| BN_G1354 | 6,4 | 19,72 |
| BN_G1285 | 8,97 | 19,77 |
| BN_G1392 | 8,71 | 19,84 |
| BN_G1385 | 9,53 | 19,89 |
| BN_G1288 | 7,88 | 20,04 |
| BN_G1386 | 14,81 | 20,16 |
| BN_G1250 | 3,78 | 20,28 |
| BN_G1393 | 10,49 | 20,55 |
| BN_G1280 | 5,81 | 20,63 |
| BN_G1315 | 8,82 | 20,76 |
| BN_G1329 | 8,21 | 20,77 |
| BN_G1328 | 3,71 | 21,09 |
| BN_G1279 | 5,47 | 21,18 |
| BN_G1387 | 11,1 | 21,32 |
| BN_G1284 | 4,28 | 21,33 |
| BN_G1447 | 7,7 | 21,76 |
| BN_G1401 | 4,97 | 21,82 |
| BN_G1298 | 9,7 | 21,99 |
| BN_G1297 | 7,4 | 22,15 |
| BN_G1350 | 5,41 | 23,5 |
| BN_G1405 | 7,86 | 23,73 |
| BN_G1390 | 7,74 | 24,52 |
| BN_G1351 | 9,05 | 24,78 |
| BN_G1398 | 6,24 | 24,82 |
| BN_G1296 | 4,05 | 25,04 |
| BN_G1394 | 7,43 | 27,34 |
| BN_G1395 | 9,8 | 30,17 |

La producción de ALA a niveles mayores del ~12% de ácidos grasos en las semillas en estas líneas fue indicativa de la actividad Δ 15-desaturasa heteróloga. El mayor nivel de ALA observado a partir de esta transformación fue en la línea BN_G1395, que contiene un 30,17% de ALA.

5 Para varias de las líneas que expresan pMON77214, se determinaron los ácidos grasos en semillas individuales y las líneas se avanzaron a la siguiente generación. Como se esperaba, los niveles de ALA aumentaron hasta casi 2 veces los de las semillas individuales respecto a las combinaciones, indicativo de homocigosidad para los transgenes en segregantes individuales dentro de cada silicua. En la línea BN_1296, la semilla R1 combinada contenía el 25,04% de ALA. En la semilla individual superior de esta línea (BN_G1296-14), se observó el 48,2% de ALA. Los niveles de ALA en 200 semi-semillas, ordenados desde el más bajo hasta el más alto de ALA, se muestran en la FIG. 3.

Ejemplo 8

Clonación de la secuencia de Δ 15-desaturasa de *A. nidulans* y las secuencias de Δ 12 y Δ 15-desaturasa de *B. cinerea*

15 En base a las comparaciones de secuencia con la secuencia genómica de *A. nidulans*, se diseñaron cebadores específicos de gen para amplificar las regiones codificantes de longitud completa de la putativa Δ 15-desaturasa (AnD15-F1 y AnD15-R1). El cebador directo se diseñó para incluir tres nucleótidos 5' del sitio de inicio Met.

AnD15-F1: 5'-AATATGGCTGCAACTGCAACAAACCC-3' (SEQ ID NO:23)

AnD15-R1: 5'-TTCCGCTTGGCACCCCTCTTC-3' (SEQ ID NO:24)

20 Los cebadores oligonucleotídicos BcD12F1 y BcD12R1 se diseñaron a partir de una secuencia genómica parcial (clon gDNA parcial propiedad de Monsanto encontrado con BLASTALL) para amplificar las regiones codificantes de longitud completa de Δ 12-desaturasa de *B. cinerea*. El cebador degenerado D15D-R9 se diseñó para amplificar cualquier Δ 15-desaturasa putativa de *B. cinerea* en una reacción 5'-RACE. El oligonucleótido BCD15-F1 se diseñó para una reacción 3' RACE del producto de PCR generado a partir del oligonucleótido D15D-R9. Los oligonucleótidos BcD15F3 y BcD15R1 F se diseñaron para amplificar la región codificante de longitud completa de una Δ 15-desaturasa putativa de *B. cinerea*.

BcD12F1: 5'-GTCGACACCATGGCCTCTACCACTGCTCTC-3', 5' end contains Sall - 3' SEC ID Nº 25

BcD12R1: 5'-CTGCAGTGCCTTGAGCTTCATTGGTGGTGTA-3', 5' end contains PstI SEC ID Nº 26

D15D-R9: 5'- GCCRTGNCCRCAYTCRTGNNGNAGDAT-3' SEC ID Nº 27

25 BcD15-F1: 5'-ACGATGACTCTCGATTACACAAGTCACCCG-3' SEC ID Nº 28

BcD15F3: 5'- GTCGACACGATGACTCTCGATTACACAAGTCACC-3', 5' end contains Sall SEC ID Nº 29

BcD15R1: 5'- CTGCAGAATGCTTGAGCTATCAGCAGATCCCAA-3', 5' end contains PstI SEC ID Nº 30

30 El ADNc para *A. nidulans* y *B. cinerea* se prepararon usando el kit GeneRacer (Invitrogen). Estos cebadores se usaron con ADNc listo para 3'-RACE para amplificar desaturasas putativas usando un sistema de PCR Gene Amp 9700 (PE APPLIED BIOSYSTEMS) con las condiciones de ciclo recomendadas. El producto de PCR que codifica la Δ 15-desaturasa de *A. nidulans* se generó con los oligonucleótidos AnD15-F1 y AnD15-R1, se ligó en pYES2.1-TOPO (Invitrogen) y se llamó pMON67010 (FIG. 7B). Se secuenció el ADNc y se descubrió que había tres "cajas His", un elemento conservado entre las desaturasas unidas a membrana, presentes en las posiciones de aminoácido 93-97, 129-133, y 327-331. Las correspondientes secuencias nucleotídica y polipeptídica para la putativa Δ 15-desaturasa (AnD15D) se dan en la SEC ID Nº 4 y la SEC ID Nº 5, respectivamente.

35 Se amplificó un ADNc que codifica la Δ 12-desaturasa de *B. cinerea* por PCR con los oligonucleótidos BcD12F1 y BcD12R1 y posteriormente se ligó directamente en pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) para generar pMON67022 (FIG. 7D). Se secuenció el ADNc y se descubrió que había tres "cajas His", un elemento conservado entre las desaturasas unidas a membrana, presentes en las posiciones de aminoácido 155-159, 191-195, y 390-394. Las secuencias nucleotídica y polipeptídica correspondientes para la putativa Δ 12-desaturasa (BcD12D) se dan en la SEC ID Nº 31 y la SEC ID Nº32, respectivamente.

40 Para clonar una Δ 15-desaturasa de *B. cinerea* se generó un oligonucleótido degenerado basado en una alineación de secuencia de aminoácidos de las Δ 12 y Δ 15-desaturasas de *N. crassa*, y *Aspergillus* sp. Se realizó una reacción 5'-RACE usando un kit GeneRacer (Invitrogen, Carlsbad CA) siguiendo las condiciones recomendadas por el

5 fabricante. Después de la síntesis del ADNc, se amplificó el extremo 5' de un ADNc de una putativa Δ15-desaturasa por PCR usando el oligonucleótido degenerado D15D-R9 y se ligó en pCR2.1-TOPO. El fragmento resultante de 742 pb se secuenció y determinó por alineación de aminoácidos deducidos que es similar a las otras Δ15-desaturasas fúngicas. Se usó una reacción 3'-RACE para amplificar 664 pb del extremo 3' de la putativa Δ15-desaturasa de *B.*

10 *cinerea* usando el oligonucleótido BcD15-F1 y se ligó en pCR2.1-TOPO. Los oligonucleótidos BcD15F3 y BcD15R1 se diseñaron a partir de la secuencia compuesta de los productos de 5' y 3'- RACE, y se usaron para amplificar un ADNc de una putativa Δ15-desaturasa de *B. cinerea* de longitud completa por reacción 3'-RACE y se ligó en pYES2.1-TOPO. El plásmido resultante se llamó pMON67021 (FIG. 7C). Las correspondientes secuencias nucleotídica y polipeptídica para la putativa Δ15-desaturasa (BcD15D) se dan en la SEC ID Nº 33 y la SEC ID Nº 34, respectivamente.

15 Para evaluar la actividad Δ15-desaturasa de la putativa AnD15D en el ensayo de expresión en levaduras, a la levadura que expresa la putativa Δ15-desaturasa se suministró el sustrato para esta enzima, es decir, LA, y se cuantificó la producción de ALA. Estos datos, en que se comparó la producción de ALA por la Δ15-desaturasa de *N. crassa*, pMON67023, con la de la Δ15-desaturasa de *A. nidulans*, se muestran en la Tabla 5. pMON67023 (FIG. 7E) se construyó del siguiente modo:

Nc94F2: 5'-AACATGACGGTCACCACCGCAGCCACAAG-3' SEC ID Nº 35

Nc94R2: 5'-CTGGGTGCTCTGAACGGTGTGCGCCCAAAT-3' SEC ID Nº 36

Se usaron los cebadores Nc94F2 y Nc94R2 para amplificar la región codificante de NcD15D sin un codón de parada. El fragmento resultante se ligó en pYES2.1-TOPO para generar una fusión en fase entre la región codificante de NcD15D y el epítopo V5 y la región 6-His contenidos en el vector de expresión pYES2.1.

20

TABLA 5 Producción de ALA por Δ15-desaturasa de *Neurospora crassa* y Δ15-desaturasa de *Aspergillus nidulans*

| Construcción | Gen | Sustrato añadido | LA (añadido como sustrato) | ALA |
|--------------|--------|------------------|----------------------------|-------|
| pMON67010 | AnD15D | LA | 28,43 | 20,32 |
| pMON67010 | AnD15D | LA | 24,66 | 19,65 |
| pMON67023 | NcD15D | LA | 47,98 | 10,94 |
| pMON67023 | NcD15D | LA | 47,52 | 9,24 |

Estos resultados indican que en este sistema de expresión, la desaturasa de *A. nidulans* es aproximadamente 2 veces más activa que NcD15D.

Tabla 6 Análisis de la utilización de sustrato de AnD15D en levaduras

| Construcción | Gen | Sustrato añadido | GLA | ALA | SDA |
|--------------|--------|------------------|------|-------|------|
| pMON67010 | AnD15D | - | 0 | 0,54 | 0 |
| pMON67010 | AnD15D | LA | 0 | 16,45 | 0 |
| pMON67010 | AnD15D | GLA | 9,19 | 0,27 | 8,82 |
| pMON67010 | AnD15D | LA+GLA | 9,46 | 5,99 | 5,35 |
| pMON67010 | AnD15D | - | 0 | 0,64 | 0 |
| pMON67010 | AnD15D | LA | 0 | 14,96 | 0 |
| pMON67010 | AnD15D | GLA | 8,36 | 0,27 | 8,63 |
| pMON67010 | AnD15D | LA+GLA | 8,1 | 6,31 | 5,48 |

Estos resultados indican que en este sistema de expresión, la D15D de *A. nidulans* es capaz de desaturar tanto LA como GLA.

Ejemplo 9

Optimización de codones de las $\Delta 15$ -desaturasas de *A. nidulans* y *N. crassa* para soja

- 5 Se construyó una tabla de uso de codones a partir de 8 proteínas específicas de semilla muy expresadas de soja (conglicinina, glicinina, globulina) y 17 proteínas específicas de semilla muy expresadas de canola (cuciferina, napina, oleosina). Las secuencias de ácido nucleico de NcD15D y AnD15D, junto con la tabla de uso de codones descrita anteriormente, se enviaron a Blue Heron Biotechnology Inc., (Bothell, Wa), que después utilizaron un algoritmo patentado para generar las secuencias finales de codones optimizados con la más baja energía libre para 10 formar estructuras secundarias de ARN. La secuencia de codones optimizados de NcD15D se sintetizó por Blue Heron Biotechnology Inc., y se llamó NcD15Dnno (SEC ID N° 37). La secuencia de codones optimizados de AnD15D se sintetizó por Midland (Midland, TX), y se llamó AnD15Dnno (SEC ID N° 38).

Ejemplo 10

Actividad de la $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora* en combinación con las $\Delta 6$ y $\Delta 12$ -desaturasas de *Mortierella alpina*

- 15 Se evaluó la actividad de la $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora* en combinación con las $\Delta 6$ y $\Delta 12$ -desaturasas de *Mortierella alpina* transformando canola con la construcción pMON77216 (FIG. 7G), que contiene las tres 20 desaturasas bajo el control del promotor de la Napina. En varias líneas obtenidas, sin embargo, se descubrió que la $\Delta 12$ -desaturasa se había delecionado parcialmente. Se determinó el contenido de ácidos grasos de combinaciones de 10 semillas de plantas R0 individuales. Los niveles de ácido esteárico (18:0) (SA), ácido oleico (18:1)(OA), LA, ALA, SDA y GLA se muestran en la siguiente Tabla 6. La línea de control fue Ebony. Las semillas combinadas de una mayoría de los eventos transgénicos producidos contenían SDA medible y en 8 eventos el SDA se acumuló hasta más del 10% de los ácidos grasos.

TABLA 6 Resultados de porcentaje de área relativa (porcentaje en peso aprox.) de semillas R1 combinadas

| Evento ID | Ácido graso (porcentaje en peso) | | | | | |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| | SA | OA | LA | GLA | ALA | SDA |
| Control | 1,43 | 66,47 | 16,85 | 0 | 8,7 | 0 |
| Control | 1,43 | 60,27 | 19,65 | 0,52 | 11,94 | 0,07 |
| Control | 1,63 | 64,93 | 17,07 | 0,54 | 9,68 | 0,11 |
| BN_G1116 | 1,66 | 49,77 | 25,58 | 7,16 | 8,33 | 0,7 |
| BN_G1117 | 1,59 | 41,96 | 33,82 | 4,09 | 10,58 | 0,71 |
| BN_G1118 | 1,78 | 47,16 | 25,91 | 10,44 | 7,66 | 0,89 |
| BN_G1119 | 1,97 | 47,88 | 24,81 | 11,54 | 7,09 | 0,91 |
| BN_G1120 | 1,43 | 44,98 | 27,22 | 8,43 | 10,19 | 0,97 |
| BN_G1121 | 1,56 | 43,29 | 26,56 | 13,58 | 7,42 | 1,08 |
| BN_G1122 | 1,74 | 38,92 | 30,67 | 12,01 | 8,53 | 1,11 |
| BN_G1123 | 1,4 | 56,41 | 19,49 | 3,13 | 11,7 | 1,19 |
| BN_G1124 | 1,91 | 49,21 | 24,06 | 4,42 | 11,66 | 1,59 |
| BN_G1125 | 2,32 | 41,71 | 22,05 | 18,62 | 7,12 | 1,61 |
| BN_G1126 | 1,69 | 65,41 | 11,8 | 7,79 | 4,93 | 1,69 |
| BN_G1127 | 2,03 | 37,12 | 20,39 | 25,19 | 6,07 | 1,73 |
| BN_G1128 | 1,78 | 39,25 | 22,36 | 20,9 | 7,4 | 1,9 |
| BN_G1129 | 1,74 | 31,83 | 27,51 | 21,83 | 8,77 | 2,04 |
| BN_G1130 | 2,23 | 31,55 | 22,8 | 29,28 | 5,39 | 2,05 |
| BN_G1131 | 1,84 | 46,36 | 22,06 | 6,47 | 14,99 | 2,08 |
| BN_G1132 | 2,14 | 32,57 | 25,79 | 23,37 | 7,48 | 2,16 |
| BN_G1133 | 1,92 | 36,46 | 25,41 | 19,25 | 8,3 | 2,2 |
| BN_G1124 | 1,66 | 43,74 | 22,34 | 6,57 | 17,25 | 2,45 |
| BN_G1135 | 1,53 | 43,95 | 22,08 | 6,86 | 16,79 | 2,6 |
| BN_G1136 | 2,08 | 35,91 | 27,18 | 7,23 | 18,86 | 2,71 |
| BN_G1137 | 1,77 | 40,53 | 23,41 | 9,63 | 15,83 | 2,73 |
| BN_G1138 | 1,89 | 42,24 | 21,84 | 7 | 18,34 | 2,77 |
| BN_G1139 | 2,17 | 51,7 | 17,44 | 8,07 | 11,56 | 3,02 |
| BN_G1140 | 2,31 | 43,1 | 21,72 | 8,25 | 15,12 | 3,04 |
| BN_G1141 | 1,49 | 40,03 | 22,99 | 5,93 | 19,6 | 3,06 |
| BN_G1143 | 1,7 | 41,86 | 22,61 | 7,97 | 16,57 | 3,18 |

(continuación)

| Evento ID | Ácido graso (porcentaje en peso) | | | | | |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | SA | OA | LA | GLA | ALA | SDA |
| BN_G1144 | 1,66 | 40,28 | 22,74 | 8,3 | 17,09 | 3,27 |
| BN_G1145 | 1,87 | 38,9 | 22,98 | 8,72 | 17,88 | 3,56 |
| BN_G1146 | 1,87 | 34,99 | 24,42 | 8,54 | 21 | 3,67 |
| BN_G1147 | 2,34 | 35,19 | 23,37 | 8,63 | 20,12 | 3,86 |
| BN_G1148 | 1,85 | 29,28 | 29,24 | 12,95 | 16,18 | 3,95 |
| BN_G1149 | 1,63 | 37,03 | 22,9 | 9,66 | 20,16 | 4,29 |
| BN_G1150 | 2,72 | 35,99 | 20,19 | 10,53 | 19,67 | 4,47 |
| BN_G1151 | 1,62 | 32,92 | 23,19 | 9,25 | 21,68 | 4,88 |
| BN_G1152 | 2,4 | 30,12 | 25,47 | 14,34 | 15,85 | 4,93 |
| BN_G1153 | 2,45 | 35,53 | 22,92 | 11,87 | 15,36 | 4,93 |
| BN_G1154 | 2,31 | 26,49 | 19,78 | 6,29 | 31,62 | 5,06 |
| BN_G1155 | 1,84 | 34,83 | 21,08 | 11,55 | 18,46 | 5,36 |
| BN_G1156 | 1,73 | 55,09 | 8,75 | 2,81 | 20,2 | 5,39 |
| BN_G1157 | 1,87 | 34,84 | 21,19 | 10,88 | 19,14 | 5,41 |
| BN_G1158 | 2,98 | 29,18 | 22,71 | 17,48 | 14,23 | 5,9 |
| BN_G1159 | 2,17 | 36,41 | 18,63 | 10,27 | 20,3 | 5,98 |
| BN_G1160 | 1,85 | 40,01 | 17,37 | 13,86 | 13,79 | 6,11 |
| BN_G1161 | 1,94 | 29,5 | 25,74 | 9,15 | 20,3 | 6,12 |
| BN_G1162 | 1,74 | 33,78 | 20,98 | 12,79 | 16,98 | 6,24 |
| BN_G1163 | 1,84 | 34,83 | 21,13 | 10,28 | 18,76 | 6,27 |
| BN_G1164 | 1,96 | 37,43 | 17,03 | 5,79 | 24,34 | 6,45 |
| BN_G1165 | 1,86 | 36,5 | 18,9 | 11,28 | 18,7 | 6,68 |
| BN_G1166 | 1,95 | 29,59 | 24,52 | 13,72 | 18,95 | 6,69 |
| BN_G1167 | 2,62 | 25,92 | 22,63 | 15,39 | 19,76 | 6,69 |
| BN_G1168 | 2,78 | 48,4 | 12,78 | 6,28 | 17,57 | 6,71 |
| BN_G1169 | 2,92 | 37,66 | 17,21 | 13,51 | 14,14 | 7,22 |
| BN_G1170 | 2,57 | 26,3 | 22,62 | 11,07 | 22,43 | 7,25 |
| BN_G1171 | 2,24 | 24,1 | 20,08 | 28,31 | 10,8 | 7,53 |
| BN_G1172 | 2,79 | 26,16 | 20,37 | 13,4 | 21,15 | 7,8 |
| BN_G1173 | 1,88 | 28,4 | 20,84 | 21,11 | 13,55 | 7,93 |
| BN_G1174 | 2,36 | 24,04 | 17,6 | 28,46 | 10,82 | 8,13 |
| BN_G1175 | 3,43 | 24,83 | 20,39 | 21,68 | 15,5 | 8,23 |
| BN_G1176 | 2,06 | 30,09 | 18,23 | 13,06 | 20,9 | 8,23 |
| BN_G1177 | 1,74 | 64,72 | 7,85 | 2,46 | 8,1 | 8,29 |
| BN_G1178 | 1,62 | 25,75 | 19,49 | 9,12 | 27,3 | 8,6 |
| BN_G1179 | 1,72 | 30,98 | 19,19 | 11,78 | 20,65 | 8,95 |
| BN_G1180 | 2,55 | 21,39 | 19,93 | 26,55 | 12,19 | 9,07 |
| BN_G1181 | 2,53 | 21,81 | 21,21 | 15,3 | 22,58 | 9,16 |
| BN_G1182 | 1,75 | 24,68 | 20 | 14,66 | 22,4 | 9,36 |
| BN_G1183 | 2,42 | 31,08 | 16,43 | 15,08 | 17,5 | 9,48 |
| BN_G1184 | 2,2 | 26,92 | 17,92 | 17,43 | 18,69 | 10 |
| BN_G1185 | 2,58 | 63,63 | 4,49 | 5,11 | 6,18 | 10,29 |
| BN_G1186 | 1,13 | 55,27 | 9,21 | 4,08 | 12,73 | 10,29 |
| BN_G1187 | 2,22 | 37,22 | 14,97 | 13,19 | 16,2 | 10,46 |
| BN_G1188 | 2,5 | 26,64 | 18,05 | 19,8 | 14,58 | 10,83 |
| BN_G1189 | 2,41 | 26,12 | 18,44 | 16,81 | 19,27 | 11,01 |
| BN_G1190 | 2,29 | 36,61 | 12,21 | 14,29 | 14,68 | 13,31 |
| BN_G1191 | 2,31 | 18,94 | 12,95 | 18,11 | 22,1 | 17,95 |

Los datos de ácidos grasos de semillas individuales del evento BN_G1824, incluyendo tanto homocigotos como heterocigotos, se muestran a continuación en la Tabla 7. En un caso, se observaron un 18,6 % de SDA, un 17,8% de ALA, un 11,2% de LA, un 24% de ácido oleico y un 18,8% de GLA . Este evento se menciona como un evento de alto SDA/alto GLA. En otra semilla de este evento, se observaron un 16,8% de SDA, un 7% de ALA, un 2% de LA, un 62,1% de ácido oleico y un 3,1% de GLA. Este evento se menciona como una línea de alto SDA/bajo GLA. Los datos moleculares indicaron que, en las líneas de alto SDA/bajo GLA, la secuencia que codifica Δ12 no era funcional. En particular, se indicó que las líneas de alto SDA/bajo GLA estaban compuestas por una única copia de

un inserto de ADN T parcial único que ha perdido todo el ADN del inserto entre el límite izquierdo y las 51 pares de bases terminales de la región codificante de la Δ12-desaturasa de *Mortierella alpina* (por ejemplo, las últimas 51 pb de la SEC ID Nº 41). Es notable que en la línea de alto SDA/bajo GLA el ácido oleico está a niveles casi de tipo silvestre mientras que en las líneas de alto SDA/alto GLA, el ácido oleico se reduce en aproximadamente 2,5 veces con respecto al tipo silvestre. Las líneas que presentan el genotipo de alto SDA/alto oleico están resaltadas con gris.

TABLA 7 Resultados de porcentaje de área relativa (porcentaje en peso aprox.) de semillas R1 individuales de BN_G1190

| Línea N.º | Composición de ácidos grasos (porcentaje en peso) | | | | | |
|--------------|---|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | SA | OA | LA | GLA | ALA | SDA |
| 1 | 1,29 | 64,94 | 19,96 | 0 | 9,07 | 0 |
| 2 | 1,53 | 65,62 | 16,5 | 0 | 10,01 | 0 |
| 3 | 1,4 | 61,38 | 20,02 | 0 | 11,78 | 0,02 |
| 4 | 1,78 | 65,09 | 17,67 | 0,02 | 9,22 | 0,15 |
| 5 | 1,53 | 60,94 | 7,8 | 3,55 | 14,13 | 5,23 |
| 6 | 2,01 | 61,95 | 7,1 | 4,2 | 12,34 | 5,79 |
| 7 | 1,8 | 59,54 | 5,5 | 4,47 | 12,81 | 9-2 |
| 8 | 2,16 | 25,6 | 17,86 | 19,69 | 18,91 | 9,28 |
| 9 | 1,9 | 61,92 | 4,71 | 3,25 | 12,71 | 9,34 |
| 10 | 4,79 | 22,52 | 14,36 | 29,86 | 9,84 | 10,29 |
| 11 | 2,81 | 61,55 | 3,92 | 2,79 | 11,89 | 10,46 |
| 12 | 2,07 | 61,13 | 4,36 | 4,37 | 10,9 | 10,47 |
| 13 | 1,57 | 59,75 | 4,27 | 3,3 | 13,01 | 11 |
| 14 | 1,89 | 63,95 | 3,54 | 2,88 | 10,29 | 11,09 |
| 15 | 1,95 | 62,9 | 4 | 3,53 | 10,35 | 11,29 |
| 16 | 2,04 | 60,91 | 4,2 | 3,2 | 12,16 | 11,37 |
| 17 | 2,37 | 49,02 | 7,68 | 12,6 | 9,45 | 11,48 |
| 18 | 1,88 | 62,52 | 3,41 | 4,25 | 9,09 | 11,79 |
| 19 | 2,4 | 25,65 | 16,6 | 17,6 | 18,36 | 12,03 |
| 20 | 3,31 | 25,5 | 16,45 | 16,69 | 18,76 | 12,12 |
| 21 | 5,64 | 20,98 | 12,57 | 29,74 | 10,03 | 12,17 |
| 22 | 2,51 | 24,55 | 15,7 | 17,28 | 19,83 | 12,23 |
| 23 | 2,62 | 25,54 | 15,55 | 18,14 | 18,87 | 12,45 |
| 24 | 3,35 | 22,96 | 14,87 | 23,38 | 14,62 | 12,98 |
| 25 | 2,2 | 24,61 | 15,99 | 17,98 | 18,5 | 13,61 |
| 26 | 1,62 | 58,5 | 3,48 | 3,09 | 12,36 | 13,66 |
| 27 | 3,77 | 24,48 | 14,69 | 18,4 | 16,75 | 13,85 |
| 28 | 2,51 | 23,72 | 15,35 | 16,53 | 19,8 | 14,24 |
| 29 | 2,46 | 24,04 | 13,81 | 18,61 | 19,94 | 14,31 |
| 30 | 2,44 | 23,63 | 14,82 | 20,44 | 16,85 | 14,35 |
| 31 | 1,85 | 64,75 | 1,94 | 2,85 | 7,01 | 14,55 |
| 32 | 2,04 | 19,45 | 14,32 | 15,63 | 25,95 | 14,73 |
| 33 | 2,24 | 23,34 | 14,79 | 18,9 | 18,22 | 14,84 |
| 34 | 3,55 | 23,16 | 12,92 | 21,86 | 15,59 | 15,12 |
| 35 | 3,17 | 24,94 | 12,74 | 18,41 | 16,98 | 15,26 |
| 36 | 2,36 | 21,79 | 14,57 | 23,35 | 13,99 | 15,38 |
| 37 | 2,55 | 23,14 | 14,94 | 19,56 | 17,3 | 15,39 |
| 38 | 2,53 | 23,44 | 14,99 | 16,32 | 19,84 | 15,46 |
| 39 | 2,09 | 58,1 | 2,87 | 3,21 | 11,23 | 15,52 |
| 40 | 2,22 | 61,6 | 2,44 | 3-32 | 8,34 | 15,58 |
| 41 | 4,1 | 23,71 | 13,78 | 17,72 | 18,09 | 15,63 |
| 42 | 2,34 | 22,81 | 13,35 | 19,72 | 19,09 | 15,67 |
| 43 | 3,71 | 21,49 | 13,43 | 22,95 | 14,94 | 15,98 |
| 44 | 4,05 | 23,04 | 13,77 | 20,1 | 15,43 | 16,18 |
| 45 | 2,57 | 24,02 | 12,05 | 19,87 | 17,05 | 16,46 |
| 46 | 2,09 | 62,09 | 1,98 | 3,08 | 7,06 | 16,75 |
| 47 | 3,17 | 21,82 | 13,7 | 16,23 | 21,06 | 16,82 |
| 48 | 4,07 | 22,52 | 12,25 | 19,85 | 16,27 | 16,86 |
| 49 | 2,46 | 22,48 | 12,5 | 20,28 | 17,02 | 17,66 |
| 50 | 2,78 | 24,11 | 11,17 | 18,82 | 17,75 | 18,59 |

5 Para evaluar adicionalmente la actividad de la Δ 15-desaturasa de *Neurospora crassa* en combinación con las Δ 6 y Δ 12-desaturasas de *M. alpina*, se volvieron a transformar líneas homocigóticas para la construcción pCGN5544 (que contiene las Δ 6 y Δ 12-desaturasas de *M. alpina*), que contenía hasta un 35% de GLA en los aceites de semilla, con la construcción pMON77214 que contenía NcD15D. Se analizaron combinaciones de veinte semillas de 11 plantas R₀. El LA, ALA, SDA y GLA en estas líneas se muestran en la Tabla 8.

| TABLA 8 Resultados del análisis de porcentaje de área relativa (porcentaje en peso seco) de las semillas R₁ combinadas | | | | |
|--|-----------|------------|------------|------------|
| Línea | LA | ALA | SDA | GLA |
| Control Ebony | 16,05 | 8,7 | 0 | 0 |
| Control Ebony | 17,46 | 9,05 | 0 | 0 |
| BN_1569 | 21,19 | 11 | 0,11 | 30,1 |
| BN_1561 | 25,35 | 14,7 | 1,57 | 6,03 |
| BN_1566 | 29,26 | 14,03 | 1,75 | 9,04 |
| BN_1564 | 17,92 | 26,51 | 2,33 | 4,5 |
| BN_1644 | 24,25 | 16,1 | 4,05 | 16,64 |
| BN_1527 | 22 | 15,97 | 4,17 | 10,44 |
| BN_1563 | 20,13 | 17,26 | 4,52 | 12,11 |
| BN_1609 | 22,46 | 23,76 | 5,22 | 11,39 |
| BN_1622 | 9,1 | 15,77 | 6,33 | 5,23 |
| BN_1680 | 21,47 | 19,19 | 11,19 | 19,07 |
| BN_1624 | 12,95 | 22,1 | 17,95 | 18,11 |

Ejemplo 11

- 10 **Actividad de la Δ 15-desaturasa de *Neurospora crassa* en combinación con la Δ 6-desaturasa de *Mortierella alpina***
- 15 Se evaluó la actividad de la Δ 15-desaturasa de *Neurospora crassa* en combinación con la Δ 6-desaturasa de *Mortierella alpina* transformando canola con la construcción pMON77215 (FIG. 7F), que contiene las dos desaturasas bajo el control del promotor de la Napina. Este vector se construyó dirigiendo pCGN5536 (patente de EE. UU. n.º 6.459.018 B1), que contiene el promotor de Napina dirigiendo la expresión de la Δ 6-desaturasa de *M. alpina* (MaD6D), con NotI y después ligando el fragmento del cassette de expresión en el sitio Not I del vector binario, pMON70660, para formar pMON77212. El plásmido pMON77215 se construyó dirigiendo pMON77214 con Pmel y Ascl y después ligando el fragmento del cassette de expresión de Napina-NcD15D resultante en los sitios Swal y Ascl de pMON77212, para dar una construcción que contenía tanto MaD6D como NcD15D.
- 20 Se determinó el contenido de ácidos grasos de combinaciones de 10 transformantes de canola R₀ individuales. Los niveles de SA, OA, LA, ALA, SDA y GLA se muestran en la siguiente Tabla 9. La línea de control fue Ebony (SP30052). Las semillas combinadas de una mayoría de los eventos transgénicos producidos contenían SDA medible y en el 25% de los eventos (10 de 40) el SDA se acumuló hasta más del 10% de los ácidos grasos.

TABLA 9 Resultados de porcentaje de área relativa (porcentaje en peso aprox.) de semillas R1 combinadas de pMON77215

| Evento ID | Ácido graso (porcentaje en peso) | | | | | |
|---------------|----------------------------------|-------|--------|------|-------|-------|
| | SA | OA | LA | GLA | ALA | SDA |
| Control Ebony | 1,43 | 66,47 | 16,85 | 0 | 8,7 | 0 |
| BN_G2463 | 1,98 | 63,51 | 17,96 | 0,13 | 9,9 | 0,1 |
| BN_G2444 | 1,62 | 60,61 | 19,58 | 0,13 | 11,38 | 0,36 |
| BN_G2443 | 1,47 | 59,39 | 17,8 | 3,42 | 10,2 | 1,1 |
| BN_G1700 | 1,69 | 65,41 | 11,8 | 7,79 | 4,93 | 1,69 |
| BN_G2082 | 1,84 | 59,51 | 16,72 | 4,45 | 10,16 | 1,73 |
| BN_G2316 | 2,19 | 66,1 | 11.4S9 | 7,17 | 4,24 | 2,24 |
| BN_G2083 | 1,89 | 61,57 | 12,61 | 7,29 | 7,02 | 2,28 |
| BN_G2413 | 1,97 | 64,12 | 9,74 | 1,58 | 11,09 | 4,63 |
| BN_G2317 | 2,74 | 66,72 | 6,92 | 0,44 | 10,42 | 5,13 |
| BN_G2412 | 2,31 | 61,63 | 8,48 | 1,66 | 13,6 | 5,21 |
| BN_G2315 | 2,91 | 64,38 | 10,22 | 0,91 | 6,07 | 5,28 |
| BN_G2028 | 1,91 | 61,48 | 10,25 | 2,2 | 11,59 | 5,59 |
| BN_G2357 | 2,51 | 64,17 | 8,28 | 0,85 | 10,42 | 5,62 |
| BN_G2027 | 2,13 | 53,72 | 12,39 | 2,6 | 15,72 | 5,78 |
| BN_G2360 | 2,51 | 62,75 | 9,47 | 4,89 | 7,17 | 5,84 |
| BN_G2390 | 3,2 | 63,66 | 8,44 | 0,5 | 10,2 | 5,88 |
| BN_G2029 | 1,78 | 61,89 | 10,41 | 1,44 | 11,12 | 6,35 |
| BN_G2414 | 2,07 | 57,13 | 11 | 2,36 | 14,07 | 6,44 |
| BN_G2416 | 2,26 | 65,01 | 7,17 | 0,83 | 11,86 | 6,45 |
| BN_G2250 | 2,19 | 61,99 | 8,8 | 1,93 | 9,72 | 6,6 |
| BN_G1698 | 1,82 | 68,26 | 6,4 | 3,76 | 6,55 | 6,65 |
| BN_G2356 | 2,82 | 62,46 | 11,52 | 1,75 | 6,99 | 6,84 |
| BN_G1937 | 2 | 56,02 | 10,92 | 2,24 | 12,6 | 7,81 |
| BN_G2319 | 1,99 | 58,47 | 9,63 | 5,86 | 9,05 | 7,91 |
| BN_G1699 | 1,74 | 64,72 | 7,85 | 2,46 | 8,1 | 8,29 |
| BN_G2359 | 2,96 | 64,17 | 7,09 | 2,05 | 7,67 | 8,88 |
| BN_G2460 | 2,54 | 62,4 | 5,33 | 1,43 | 11,43 | 9,63 |
| BN_G2409 | 3,27 | 57,85 | 9,71 | 3,97 | 7,44 | 9,87 |
| BN_G2318 | 2,54 | 61,04 | 7,6 | 2,37 | 8,43 | 9,99 |
| BN_G2358 | 2,76 | 62,33 | 5,88 | 2,06 | 8,72 | 10,08 |
| BN_G1697 | 2,58 | 63,63 | 4,49 | 5,11 | 6,18 | 10,29 |
| BN_G1803 | 1,13 | 55,27 | 9,21 | 4,08 | 12,73 | 10,29 |
| BN_G2391 | 2,83 | 58,33 | 11,45 | 2,42 | 6,6 | 10,57 |
| BN_G1859 | 2,33 | 52,66 | 9,71 | 2,98 | 12,19 | 11,03 |
| BN_G2389 | 2,54 | 59,21 | 6,97 | 3,88 | 8,07 | 11,84 |
| BN_G1860 | 2,22 | 51,02 | 9,49 | 4,62 | 10,5 | 13,44 |
| BN_G2410 | 3,24 | 55,96 | 7,03 | 3,1 | 8,88 | 13,82 |
| BN_G2445 | 2,77 | 57,67 | 6,21 | 2,78 | 9,62 | 14,14 |
| BN_G2361 | 2,31 | 56,5 | 8,86 | 3,77 | 6,48 | 14,78 |

Los datos de ácidos grasos de semillas individuales del evento BN_G1860, incluyendo tanto homocigotos como heterocigotos, se muestran a continuación en la Tabla 10. En un caso, se observaron hasta un 19% de SDA, un 10% de ALA, un 7% de LA, un 48% de ácido oleico y un 5% de GLA.

TABLA 10 Resultados de porcentaje de área relativa (porcentaje en peso aprox.) de semillas R1 individuales de pMON77215 de BN_G1860

| Evento ID | SA | OA | LA | GLA | ALA | SDA |
|--------------|------|-------|-------|------|-------|-------|
| BN_G1860-1 | 1,57 | 65,11 | 16,5 | 0 | 10,47 | 0,01 |
| BN_G 1860-2 | 1,4 | 57,32 | 19,05 | 0 | 15,3 | 0,02 |
| BN_G 1860-3 | 1,74 | 60,16 | 19,44 | 0 | 11,95 | 0,03 |
| BN_G 1860-4 | 1,77 | 56,85 | 8,11 | 6,79 | 9,11 | 9,96 |
| BN_G 1860-5 | 2,37 | 57,88 | 5,26 | 2,94 | 12,72 | 11,48 |
| BN_G 1860-6 | 1,72 | 60,18 | 5,03 | 2,87 | 11,42 | 11,71 |
| BN_G 1860-7 | 2,53 | 55,86 | 9,31 | 6,08 | 5,96 | 12,23 |
| BN_G 1860-8 | 2,21 | 56,83 | 7,48 | 5,93 | 8,52 | 12,38 |
| BN_G 1860-9 | 2,12 | 60,21 | 4,83 | 2,8 | 10,13 | 12,43 |
| BN_G1860-10 | 3,12 | 56,6 | 10,33 | 4,54 | 4,5 | 12,48 |
| BN_G1860-11 | 2,2 | 53,64 | 12,32 | 5,54 | 4,73 | 12,88 |
| BN_G1860-12 | 2,25 | 55,58 | 10,53 | 5,07 | 5,42 | 13,53 |
| BN_G1860-13 | 2,03 | 57,57 | 7,08 | 4,19 | 8,15 | 13,69 |
| BN_G1860-14 | 1,76 | 54,42 | 7,16 | 6,43 | 8,99 | 13,77 |
| BN_G1860-15 | 2,77 | 57,4 | 8,5 | 4,17 | 5,73 | 13,78 |
| BN_G1860-16 | 1,43 | 55,39 | 9,93 | 5,62 | 6,38 | 13,82 |
| BN_G1860-17 | 2,91 | 53,02 | 10,79 | 4,34 | 5,89 | 13,92 |
| BN_G1860-18 | 1,92 | 60,27 | 3,72 | 1,96 | 10,7 | 13,92 |
| BN_G1860-19 | 1,85 | 59,6 | 4,72 | 2,56 | 9,85 | 14,16 |
| BN_G 1860-20 | 2,45 | 58,84 | 6,51 | 3,66 | 6,88 | 14,22 |
| BN_G 1860-21 | 1,88 | 57,95 | 5 | 2,85 | 10,56 | 14,42 |
| BN_G 1860-22 | 1,91 | 55,15 | 6,02 | 5,3 | 9,2 | 14,75 |
| BN_G 1860-23 | 3,01 | 59,08 | 5,36 | 2,88 | 7,33 | 14,85 |
| BN_G 1860-24 | 2,94 | 56,48 | 6,78 | 3,95 | 7,83 | 14,86 |
| BN_G 1860-25 | 2,34 | 53,88 | 8,64 | 4,49 | 6,42 | 14,94 |
| BN_G 1860-26 | 2,75 | 52,92 | 7,04 | 4,38 | 9,4 | 14,96 |
| BN_G 1860-27 | 1,7 | 57,28 | 4,41 | 2,99 | 10,74 | 15,05 |
| BN_G 1860-28 | 2,3 | 53,15 | 9,42 | 5,79 | 6,53 | 15,29 |
| BN_G 1860-29 | 2,9 | 54,49 | 6,2 | 3,73 | 7,92 | 15,38 |
| BN_G 1860-30 | 1,8 | 58,02 | 4 | 2,41 | 10,67 | 15,42 |
| BN_G1860-31 | 2,67 | 54,97 | 7,32 | 4,68 | 7,92 | 15,44 |
| BN_G1860-32 | 2,31 | 56,01 | 5,09 | 4,34 | 9,93 | 15,47 |
| BN_G1860-33 | 2,18 | 55,92 | 8,83 | 4,06 | 5,46 | 15,54 |
| BN_G1860-34 | 2,38 | 54,85 | 8,52 | 4,01 | 5,76 | 15,56 |
| BN_G1860-35 | 1,99 | 58,89 | 4,14 | 2,09 | 9,74 | 15,58 |
| BN_G1860-36 | 2,87 | 55,91 | 6,55 | 2,8 | 7,37 | 15,66 |
| BN_G1860-37 | 2,35 | 53,18 | 8,89 | 4,73 | 6,45 | 15,71 |
| BN_G1860-38 | 3,15 | 51,6 | 10,29 | 4,85 | 5,68 | 15,78 |
| BN_G1860-39 | 2,31 | 55,68 | 6,08 | 4,52 | 7,81 | 15,92 |
| BN_G1860-40 | 3,26 | 54,62 | 6,54 | 3,55 | 7,53 | 16,19 |
| BN_G1860-41 | 2,09 | 56,03 | 6,27 | 4,04 | 7,56 | 16,35 |
| BN_G1860-42 | 2,33 | 53,62 | 6,48 | 5,35 | 7,97 | 16,62 |
| BN_G1860-43 | 2,37 | 57,86 | 5,24 | 2,81 | 7,32 | 16,77 |
| BN_G1860-44 | 2,04 | 51,3 | 11,41 | 5,03 | 5,09 | 16,94 |
| BN_G1860-45 | 2,1 | 53,32 | 8,75 | 4,04 | 6,44 | 17,12 |
| BN_G1860-46 | 2,14 | 53,01 | 6,85 | 4,3 | 7,82 | 17,16 |
| BN_G1860-47 | 2,42 | 50,96 | 7,83 | 4,13 | 7,91 | 17,44 |
| BN_G1860-48 | 1,94 | 49,97 | 10,64 | 4,78 | 5,74 | 17,84 |
| BN_G1860-49 | 1,46 | 55,32 | 4,57 | 2,67 | 9,98 | 18 |
| BN_G1860-50 | 2,41 | 47,66 | 6,83 | 5,46 | 9,91 | 19,23 |

Ejemplo 12

Optimización de codones de la secuencia de la $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa* para maíz

Se construyó una tabla de uso de codones a partir de 9 genes específicos de semilla muy expresados de maíz (seis zeínas y tres oleosinas). Usando esta tabla, se mutaron dos codones de NcD15D usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA) y la secuencia resultante se llamó NcFAD3m (SEC ID Nº 42). Los codones cambiados fueron del siguiente modo: 1) para crear un sitio de inicio de la traducción más preferido, una alanina en la SEC ID Nº 2 se sustituye con una treonina cambiando la primera base del segundo codón (posición 4 en la SEC ID Nº 42) de ACG a GCG; y 2) para eliminar un codón raro, se cambia un codón de valina de GTA a GTG en la posición 882 (SEC ID Nº 42).

Ejemplo 13

Equivalencia de EPA

Una medida de la calidad del aceite de semilla para su valor sobre la salud es la equivalencia de EPA. El valor refleja la tasa de conversión metabólica en EPA. Esto se calcula sumando el % de ALA dividido por 14 y el % de SDA dividido por 4. Las composiciones de aceite de canola obtenidas por los inventores tenían una alta equivalencia de EPA, que indica excelentes características para conseguir los beneficios para la salud asociados con niveles aumentados de EPA en seres humanos y animales. A continuación se da un ejemplo del análisis por comparación de aceite de canola convencional respecto a un ejemplo de una composición típica de aceite de alto SDA del 10% de ALA y el 15% de SDA. El aceite de canola de variedades convencionales tiene aproximadamente el 12% de ALA y el 0% de SDA y por tanto tiene una equivalencia de EPA de $12/14 + 0/4 = 0,8$. En contraste, el ejemplo de composición de aceite de alto SDA tiene una equivalencia de EPA de $10/14 + 15/4 = 4,4$. Los valores relativos se muestran a continuación. Los valores son por % en peso, no en una base de proporciones. La enorme diferencia muestra la importancia de producir SDA en aceite de canola.

TABLA 11 Comparación de equivalencia de EPA

| Aceite vegetal | Omega-3 total (% de ácidos grasos) | Proporción n-6: n-3 (% de ácidos grasos) | Equivalencia de EPA relativa (% en peso de ALA + SDA) |
|----------------|------------------------------------|--|---|
| Canola | 12 | 2,6:1 | 0,8 |
| Canola SDA | 50 | 1:5 | 4,4 |

Referencias

- Patentes de EE. UU. 4.535.060; 4.666.701; 4.758.592; 4.826.877; 4.910.141; 5.011.770; 5.116.871; 5.302.523; 5.322.783; 5.378.619; 5.384.253; 5.464.765; 5.508.184; 5.508.468; 5.538.877; 5.538.880; 5.545.818; 5.550.318; 5.563.055; 5.591.616; 5.610.042; y 5.952.544
- Abdullah y col., Biotechnology, 4:1087, 1986.
- Arondel, Science, 258(5086):1353-1355, 1992.
- Ausubel y col., En: Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Assoc., NY, 1987.
- Barton y col., Cell, 32:1033, 1983.
- Bates, Mol. Biotechnol., 2(2):135-45, 1994.
- Battraw y Hall, Theor. App. Genet., 82(2):161-168, 1991.
- Bechtold y col., CR. Acad. Sci. Life Sci., 316:1194-1199, 1993.
- Becker y Guarente, Methods Enzymol., 194:182-187, 1991.
- Bent y col., Science, 265:1856-1860, 1994.
- Bent y col. (1994), Science 265:1856-1860
- Bevan y col., Nucleic Acids Res., 11(2):369-385, 1983.
- Bevan, Nucleic Acids Res., 12:8111, 1984.
- Bhattacharjee, An, Gupta, J. Plant Bioch. Biotech., 6(2):69-73. 1997.
- Bouchez y col., EMBO Journal, 8(13):4197-4204, 1989.

- Bower y col., J. Plant, 2:409-416. 1992.
- Bray, 1987
- Brenner y col., Adv. Exp. Med. Biol., 83:85-101, 1976.
- Buchanan-Wollaston y col., Plant Cell Reports, 11:627-631. 1992
- 5 Busing y Benbow, Mol. Gen. Genet., 243(1):71-81, 1994.
- Bustos y col., J. Bacteriol., 174:7525-7533, 1991.
- Callis y col., Genes Dev., 1:1183-1200, 1987.
- Casa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(23):11212-11216, 1993.
- Case y col., *Neurospora* Newsletter, 8:25-26, 1965.
- 10 Chandler y col., The Plant Cell, 1:1175-1183, 1989.
- Chomczynski y Sacchi, Anal. Biochem., 162(1):156-159, 1987.
- Chou y Fasman, Adv. Enzymol., 47:45-148, 1978.
- Christou y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(12):3962-3966, 1987.
- Conkling y col., Plant Physiol., 93:1203-1211, 1990.
- 15 Crozier, Lipids, 24:460, 1989.
- De Block y col., Plant Physiol., 91:694-701, 1989.
- De Block y col., The EMBO Journal, 6(9):2513-2518, 1987.
- De Deckerer, Eur. J. Clin. Nutr., 52:749, 1998.
- DeBlock y col., J. EMBO, 2:2143, 1984.
- 20 Dellaporta y col., En: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988.
- DE 3642 829
- D'Halluin y col., Plant Cell, 4(12):1495-1505, 1992.
- Ebert y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:5745-5749, 1987
- 25 Ellis y col., EMBOJournal, 6(11):3203-3208, 1987.
- Documento EP 154.204
- Fraley y col., BiolTechnology, 3:629-635, 1985.
- Fromm y col., Nature 319:791-793, 1986
- Fromm y col., Nature, 319:791-793, 1986.
- 30 Gallie y col., The Plant Cell, 1:301-311, 1989.
- Gelvin y col., En: Plant Molecular Biology Manual, 1990.
- Ghosh-Biswas y col., J Biotechnol., 32(1):1-10, 1994.
- Goeddel, En: Methods in Enzymology, Perbal (Ed.), Academic Press, John Wiley and Sons, 185, 1988.
- Hagio, Blowers, Earle, Plant Cell Rep., 10(5):260-264, 1991.
- 35 Hamilton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(18):9975-9979, 1996.
- Haseloff y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(6):2122-2127, 1997.
- He y col., Plant Cell Reports, 14 (2-3):192-196, 1994.

- Hengsens y col., *Plant Mol. Biol.*, 22(6):1101-1127, 1993.
- Hiei y col., *Plant. Mol. Biol.*, 35(1-2):205-218, 1997.
- Hinchee y col., *Bio/technol.*, 6:915-922, 1988.
- Horrobin y col., *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(Supl.):732S-737S, 1993.
- 5 Horsch y col., *Science*, 223:496, 1984.
- Horsch y col., *Science*, 227:1229, 1985.
- Hou y Lin, *Plant Physiology*, 111:166, 1996.
- Huang, *Biochem. Biophys. Acta*, 1082:319, 1991.
- Hudspeth y Grula, *Plant Mol. Biol.*, 12:579-589, 1989.
- 10 Ikuta y col., *Bio/technol.*, 8:241-242, 1990.
- Ishidaya y col., *Nat. Biotechnol.*, 14(6):745-750, 1996.
- IUPAC-IUB, *Nucl. Acid Res.*, 13:3021-3030, 1985.
- James y col., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75:234, 1997.
- James y col., *Semin. Arthritis Rheum.*, 28:85, 2000.
- 15 Kaepller y col., *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Kaepller y col., *Theor. Appl. Genet.*, 84(5-6):560-566, 1992.
- Katz y col., *J. Gen. Microbiol.*, 129:2703-2714, 1983.
- Klee y col., *Bio-Technology*, 3(7):637-642, 1985.
- Klein y col., *Nature*, 327:70, 1987.
- 20 Knittel y col., *Plant Cell Reports*, 14(2-3):81-86, 1994.
- Knutzon y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(7):2624-2628, 1992.
- Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.
- Lawton y col., *Plant Mol. Biol.* 9:315-324, 1987.
- Lazzeri, *Methods Mol. Biol.*, 49:95-106, 1995.
- 25 Lee y col., *Environ. Mol. Mutagen.*, 13(1):54-59, 1989.
- Lorz y col., *Mol Gen Genet*, 199:178-182, 1985.
- Manzioris y col., *Am. J. Clin. Nutr.*, 59:1304, 1994.
- Marcotte y col., *Nature*, 335:454, 1988.
- McCabe, Martinell, *Bio-Technology*, 11(5):596-598, 1993.
- 30 McCormac y col., *Euphytica*, 99(1):17-25, 1998.
- Meesapyodsuk y col., *Biochemistry*, 39(39):11948-11954, 2000.
- Michaelis y col., *Ann. Rev. Microbiol.*, 36:425, 1982.
- Murakami y col., *Mol. Gen. Genet.*, 205:42-50, 1986.
- Nagatani y col., *Biotech. Tech.*, 11(7):471-473, 1997.
- 35 Naylor y col., *Nature*, 405:1017, 2000.
- Odell y col., *Nature*, 313:810-812, 1985.
- Ogawa y col., *Sci. Rep.*, 13:42-48, 1973.

- Omirulleh y col., *Plant Mol. Biol.*, 21 (3):415-28, 1993.
- Ow y col., *Science*, 234:856-859, 1986.
- Documentos WO 9217598; WO 94/09699; WO 95/06128; WO 96/33155; WO 97/4103; y WO 97/41228.
- Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-77, 1985.
- 5 Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Prasher y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126(3):1259-1268, 1985.
- Reed y col., *Plant Physiol.*, 122:715-720, 2000.
- Reichel y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (12) págs. 5888-5893. 1996
- Restrepo y col., *Plant Cell*, 2:987, 1990.
- 10 Rhodes y col., *Methods Mol. Biol.*, 55:121-131, 1995.
- Ritala y col., *Plant Mol. Biol.*, 24(2):317-325, 1994.
- Rogers y col., *Methods Enzymol.*, 153:253-277, 1987.
- Sambrook y col., En: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sheen y col., *Plant Journal*, 8(5):777-784, 1995.
- 15 Simopoulos y col., *Am. Coll. Nutr.*, 18:487, 1999.
- Singsit y col., *Transgenic Res.*, 6(2):169-176, 1997.
- Spencer y col., *Plant Molecular Biology*, 18:201-210, 1992.
- Stalker y col., *Science*, 242:419-422, 1988.
- Sullivan y col., *Mol. Gen. Genet.*, 215(3):431-440, 1989.
- 20 Sutcliffe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3737-3741, 1978.
- Thillet y col., *J. Biol. Chem.*, 263:12500-12508, 1988.
- Thompson y col., *Euphytica*, 85(1-3):75-80, 1995.
- Thompson y col., *The EMBO Journal*, 6(9):2519-2523, 1987.
- Tian y col., *Plant Cell Rep.*, 16:267-271, 1997.
- 25 Tingay y col., *Plant J.*, 11(6):1369-1376, 1997.
- Tomes y col., *Plant Mol. Biol.*, 14(2):261-268, 1990.
- Torbet y col., *Crop Science*, 38(1):226-231, 1998.
- Torbet y col., *Plant Cell Reports*, 14(10):635-640, 1995.
- Toriyama y col., *Theor Appl. Genet.*, 73:16, 1986.
- 30 Tsukada y col., *Plant Cell Physiol.*, 30(4):599-604, 1989.
- Twell y col., *Plant Physiol.*, 91:1270-1274, 1989.
- Uchimiya y col., *Mol. Gen. Genet.*, 204:204, 1986.
- Van den Broeck y col., *Nature*, 313:358, 1985.
- Van Eck, Blowers; Earle, *Plant Cell Reports*, 14(5):299-304, 1995.
- 35 Vasil y col., *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
- Vasil y col., *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
- Walker y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6624-6628, 1987.

- Wang y col., *Molec. Cell. Biol.*, 12(8):3399-3406, 1992.
- Wolk y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1561-1565, 1984.
- Yamada y col., *Plant Cell Rep.*, 4:85, 1986.
- Yamazaki y col., *Biochem. Biophys. Acta*, 1123:18, 1992.
- 5 Yang y Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- Zheng y Edwards, *J. Gen. Viol*, 71:1865-1868, 1990.
- Zhou y col., *Plant Cell Reports*, 12(11):612-616, 1993.
- Zukowsky y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1101-1105, 1983.
- Sheen y col., *Plant Journal*, 8(5):777-784, 1995.
- 10 Simopoulos y col., *Am. Coll. Nutr.*, 18:487, 1999.
- Singsit y col., *Transgenic Res.*, 6(2):169-176, 1997.
- Spencer y col., *Plant Molecular Biology*, 18:201-210, 1992.
- Stalker y col., *Science*, 242:419-422, 1988.
- Sullivan y col., *Mol. Gen. Genet.*, 215(3):431-440, 1989.
- 15 Sutcliffe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3737-3741, 1978.
- Thillet y col., *J. Biol. Chem.*, 263:12500-12508, 1988.
- Thompson y col., *Euphytica*, 85(1-3):75-80, 1995.
- Thompson y col., *The EMBO Journal*, 6(9):2519-2523, 1987.
- Tian y col., *Plant Cell Rep.*, 16:267-271, 1997.
- 20 Tingay y col., *Plant J.*, 11(6):1369-1376, 1997.
- Tomes y col., *Plant Mol. Biol.*, 14(2):261-268, 1990.
- Torbet y col., *Crop Science*, 38(1):226-231, 1998.
- Torbet y col., *Plant Cell Reports*, 14(10):635-640, 1995.
- Toriyama y col., *Theor Appl. Genet.*, 73:16, 1986.
- 25 Tsukada y col., *Plant Cell Physiol.*, 30(4):599-604, 1989.
- Twell y col., *Plant Physiol.*, 91:1270-1274, 1989.
- Uchimiya y col., *Mol. Gen. Genet.*, 204:204, 1986.
- Van den Broeck y col., *Nature*, 313:358, 1985.
- Van Eck, Blowers; Earle, *Plant Cell Reports*, 14(5):299-304, 1995.
- 30 Vasil y col., *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
- Vasil y col., *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
- Walker y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6624-6628, 1987.
- Wang y col., *Molec. Cell. BioL*, 12(8):3399-3406, 1992.
- Wolk y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1561-1565, 1984.
- 35 Yamada y col., *Plant Cell Rep.*, 4:85, 1986.
- Yamazaki y col., *Biochem. Biophys. Acta*, 1123:18, 1992.
- Yang y Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.

Zheng y Edwards, J. Gen. Virol., 71:1865-1868, 1990.

Zhou y col., Plant Cell Reports, 12(11):612-616, 1993.

Zukowsky y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:1101-1105, 1983.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> URSIN, VIRGINIA
VOELKER, TONI
FROMAN, BRYON
<120> DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE HONGOS
<130> MONS:021WO
10 <140> DESCONOCIDO
<141> 21/05/2003
<150> 60/453.125
<151> 07/03/2003
<150> 60/382.391
15 <151> 22/05/2002
<160> 43
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 2125
20 <212> ADN
<213> *Neurospora crassa*
<400> 1

gagcctcttc gtttcctcc catcaccaat ttcttttct gaaagaggtg tgcgactgt 60
 gagttgaacc tcaggtcttc ttccacacta cctctaccct cctcttccta ccctttct 120
 tcacttcttgc gatatcctca agaaatatca ccacacccaa caaacatgac ggtcaccacc 180
 cgccggcaca aggccgcggc cgccaccgag cccgaggtt tcagcaccgg cggtgacgccc 240
 gtctctgcttgc ctgctccctc ctcccttcctc tcctcttcca gccaaaagtc ggccgagccc 300
 atcgaataacc ccgacatcaa gaccatccgc gacgcccattcc cgaccactg ctccgccc 360
 cgcgctcttgc tctccatggc ctacttcattc cgcgacttgc ccatggcctt tggcctcgcc 420
 tacctcgccct ggcagttacat cccctgtatc gcctccaccc cgctccgcta cgccgccc 480
 gctctgtacg gctacctcca gggtctcgatc tgacacggca tctggattct ggcgcacgag 540
 tgcggccacg ggcgccttcctc gaggcacacg tggttcaaca acgtcatggg gtggattggc 600
 cactccttc tcttggtccc ttacttcagc tggaaagtca gccaccatcg ccaccatcg 660
 ttcaccggcc acatggagaa ggacatggcg tttgtgcctt ccaccggaggc tgatcgcaac 720
 cagaggaaagc tggccaaactt gtacatggac aaggagacgg cgagatgtt tgaggatgtg 780
 cccattgtcc agctcgatcaa gtcacatcgcc caccagctgg ccggctggca gatgtaccc 840
 ctcctcaacg tctccgcggg taagggcagc aagcagtggg agactggcaa gggccggcatg 900
 ggctgggtga gggtagcca ctggtagcct tcctctgtt tggtccgcaaa ctccggaggcc 960
 atctacatttgc ccctgtccca tcttggtctc atgatcatgg gctatatcctt ctaccaggcc 1020
 ggcgcagggtt tggctggca gatgttagt ctgtgtact tccagcagta cttctgggtt 1080
 caccattggt tggtaagtt gtctctcgcc catttcgcct ctgtctgggt tggtttgtga 1140
 tctttgttggaa attagcgcac taactctcgcc tccctctcaaa aacagtgcac atcaattacc 1200
 tccaccacac ccacgaggaa gtccaccact ttgacgcgcga ctctgtggacc ttctgtcaagg 1260
 ggcgccttcgc caccgtcgac cgcgattttgc gcttcattgg caagcacctc ttccacaaca 1320
 ttatcgacca ccacgtcgcc caccacttgc tccctgttgc cttcagatca gatatccctg 1380
 ctattttctc attaaaaacc atccctcaaa tgcccttcgc taacgccccca aatcctgcac 1440
 agtcgcaccc ctttctacta cgccgaagaa gccaccaact cgatccggcc catgtcgcc 1500
 ccccttacc accgcgacga ccgccttcctc atggggccagc tgggttacaa cttcacccac 1560
 tgcaagtggg tggctccggc ccccccaggatc ccggccgcgc ttatggggc gcacaccgtt 1620
 cagagcaccc agtaagcagt tctttctgc ttccctggggc actctgagga ggctacccatc 1680
 ctaccttaggt actcgactgtc tggctgtgc cctgggttag tgctacctac ttctgttagct 1740
 ctaaccggta ccagaagaac gatgttggaa aaaaggaggg agaaaagactg gaagaaaagg 1800
 aaaacaaaaga aatctcaact cttcttcatttgc attgtatggat ctgtgccacg ttctgttgg 1860
 ttccggcgtt caaaaggcgt acataacggcgt caccattgaa aggtctggat aactcggtac 1920
 ctggaaatttc acatcaaaca agttagatagac gagagagaga gtctggtaga atagaggtat 1980
 ggttagatctg gaagcttattt gacttacttag agctatagat agacaaaagag gatagagcga 2040

gggtagttgtgt gtgttagaggt agagatgcat catagaaggg agggcatgca tgcacatgattt 2100
 aagaaccaaaa agaatgatacc ccacc 2125

<210> 2

<211> 1290

<212> ADN

5 <213> *Neurospora crassa*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1290)

<400> 2

ES 2 542 420 T3

| | |
|---|-----|
| atg acg gtc acc acc cgc agc cac aag gcc gcg gcc gcc acc gag ccc | 48 |
| Met Thr Val Thr Thr Arg Ser His Lys Ala Ala Ala Ala Thr Glu Pro | |
| 1 5 10 15 | |
| gag gtt gtc agc acc ggc gtt gac gcc gtc tct gct gct gct ccc tcc | 96 |
| Glu Val Val Ser Thr Gly Val Asp Ala Val Ser Ala Ala Ala Pro Ser | |
| 20 25 30 | |
| tcc tcc tcc tcc tct tcc agc caa aag tcg gcc gag ccc atc gaa tac | 144 |
| Ser Ser Ser Ser Ser Gln Lys Ser Ala Glu Pro Ile Glu Tyr | |
| 35 40 45 | |
| ccc gac atc aag acc atc cgc gac gcc atc ccc gac cac tgc ttc cgc | 192 |
| Pro Asp Ile Lys Thr Ile Arg Asp Ala Ile Pro Asp His Cys Phe Arg | |
| 50 55 60 | |
| ccg cgc gtc tgg atc tcc atg gcc tac ttc atc cgc gac ttc gcc atg | 240 |
| Pro Arg Val Trp Ile Ser Met Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Phe Ala Met | |
| 65 70 75 80 | |
| gcc ttt ggc ctc ggc tac ctc gcc tgg cag tac atc ccc ctg atc gcc | 288 |
| Ala Phe Gly Leu Gly Tyr Leu Ala Trp Gln Tyr Ile Pro Leu Ile Ala | |
| 85 90 95 | |
| tcc acc ccg ctc cgc tac ggc gcc tgg gct ctg tac ggc tac ctc cag | 336 |
| Ser Thr Pro Leu Arg Tyr Gly Ala Trp Ala Leu Tyr Gly Tyr Leu Gln | |
| 100 105 110 | |
| ggt ctc gtc tgc acg ggc atc tgg att ctg gcg cac gag tgc ggc cac | 384 |
| Gly Leu Val Cys Thr Gly Ile Trp Ile Leu Ala His Glu Cys Gly His | |
| 115 120 125 | |
| ggc gcc ttc tcg agg cac acg tgg ttc aac aac gtc atg ggg tgg att | 432 |
| Gly Ala Phe Ser Arg His Thr Trp Phe Asn Asn Val Met Gly Trp Ile | |
| 130 135 140 | |
| ggc cac tcc ttc ctc ttg gtc cct tac ttc agc tgg aag ttc agc cac | 480 |
| Gly His Ser Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His | |
| 145 150 155 160 | |
| cat cgc cac cat cgc ttc acc ggc cac atg gag aag gag atg gcg ttt | 528 |
| His Arg His Arg Phe Thr Gly His Met Glu Lys Asp Met Ala Phe | |
| 165 170 175 | |
| gtg cct gcc acc gag gct gat cgc aac cag agg aag ctg gcc aac ttg | 576 |
| Val Pro Ala Thr Glu Ala Asp Arg Asn Gln Arg Lys Leu Ala Asn Leu | |
| 180 185 190 | |
| tac atg gac aag gag acg gcc gag atg ttt gag gat gtg ccc att gtc | 624 |

ES 2 542 420 T3

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| Tyr Met Asp Lys Glu Thr Ala Glu Met Phe Glu Asp Val Pro Ile Val | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| cag ctc gtc aag ctc atc gcc cac cag ctg gcc ggc tgg cag atg tac | | | 672 |
| Gln Leu Val Lys Leu Ile Ala His Gln Leu Ala Gly Trp Gln Met Tyr | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| ctc ctc ttc aac gtc tcc gcc ggt aag ggc agc aag cag tgg gag act | | | 720 |
| Leu Leu Phe Asn Val Ser Ala Gly Lys Gly Ser Lys Gln Trp Glu Thr | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| ggc aag ggc ggc atg ggc tgg ttg agg gtt agc cac ttt gag cct tcc | | | 768 |
| Gly Lys Gly Met Gly Trp Leu Arg Val Ser His Phe Glu Pro Ser | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| tct gct gtg ttc cgc aac tcc gag gcc atc tac att gcc ctg tcc gat | | | 816 |
| Ser Ala Val Phe Arg Asn Ser Glu Ala Ile Tyr Ile Ala Leu Ser Asp | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| ctt ggt ctc atg atc atg ggc tat atc ctc tac cag gcc gcg cag gtt | | | 864 |
| Leu Gly Leu Met Ile Met Gly Tyr Ile Leu Tyr Gln Ala Ala Gln Val | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| gtt ggc tgg cag atg gta ggt ctg ctg tac ttc cag cag tac ttc tgg | | | 912 |
| Val Gly Trp Gln Met Val Gly Leu Leu Tyr Phe Gln Gln Tyr Phe Trp | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| gtt cac cat tgg ttg gtc gcc atc act tac ctc cac cac acc cac gag | | | 960 |
| Val His His Trp Leu Val Ala Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Glu | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| gaa gtc cac cac ttt gac gcc gac tcg tgg acc ttc gtc aag ggc gct | | | 1008 |
| Glu Val His His Phe Asp Ala Asp Ser Trp Thr Phe Val Lys Gly Ala | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| ctc gcc acc gtc gac cgc gat ttt ggc ttc att ggc aag cac ctc ttc | | | 1056 |
| Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Phe Gly Phe Ile Gly Lys His Leu Phe | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| cac aac att atc gac cac cac gtc gtc cac cac ttg ttc cct cgc atc | | | 1104 |
| His Asn Ile Ile Asp His His Val Val His His Leu Phe Pro Arg Ile | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| ccc ttc tac tac gcc gaa gaa gcc acc aac tcg atc cgc ccc atg ctc | | | 1152 |
| Pro Phe Tyr Tyr Ala Glu Glu Ala Thr Asn Ser Ile Arg Pro Met Leu | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| ggc ccc ctc tac cac cgc gac gac cgc tcc ttc atg ggc cag ctg tgg | | | 1200 |
| Gly Pro Leu Tyr His Arg Asp Asp Arg Ser Phe Met Gly Gln Leu Trp | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| tac aac ttc acc cac tgc aag tgg gtc gtt ccg gac ccc cag gtc ccc | | | 1248 |
| Tyr Asn Phe Thr His Cys Lys Trp Val Val Pro Asp Pro Gln Val Pro | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| ggc gcg ctt att tgg gcg cac acc gtt cag agc acc cag taa | | | 1290 |
| Gly Ala Leu Ile Trp Ala His Thr Val Gln Ser Thr Gln | | | |
| 420 | 425 | 430 | |

<211> 429

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Val | Thr | Thr | Arg | Ser | His | Lys | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Thr | Glu | Pro |
| 1 | | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | | 15 | |
| Glu | Val | Val | Ser | Thr | Gly | Val | Asp | Ala | Val | Ser | Ala | Ala | Ala | Pro | Ser | | |
| | | | | | 20 | | | | 25 | | | | | | | 30 | |
| Ser | Gln | Lys | Ser | Ala | Glu | Pro | Ile | Glu | Tyr | | |
| | | | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | |
| Pro | Asp | Ile | Lys | Thr | Ile | Arg | Asp | Ala | Ile | Pro | Asp | His | Cys | Phe | Arg | | |
| | | | | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | |
| Pro | Arg | Val | Trp | Ile | Ser | Met | Ala | Tyr | Phe | Ile | Arg | Asp | Phe | Ala | Met | | |
| | | | | | 65 | | | | 70 | | | | | | 80 | | |
| Ala | Phe | Gly | Leu | Gly | Tyr | Leu | Ala | Trp | Gln | Tyr | Ile | Pro | Leu | Ile | Ala | | |
| | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | | |
| Ser | Thr | Pro | Leu | Arg | Tyr | Gly | Ala | Trp | Ala | Leu | Tyr | Gly | Tyr | Leu | Gln | | |
| | | | | | 100 | | | | 105 | | | | | | 110 | | |
| Gly | Leu | Val | Cys | Thr | Gly | Ile | Trp | Ile | Leu | Ala | His | Glu | Cys | Gly | His | | |
| | | | | | 115 | | | | 120 | | | | | | 125 | | |
| Gly | Ala | Phe | Ser | Arg | His | Thr | Trp | Phe | Asn | Asn | Val | Met | Gly | Trp | Ile | | |
| | | | | | 130 | | | | 135 | | | | | | 140 | | |
| Gly | His | Ser | Phe | Leu | Leu | Val | Pro | Tyr | Phe | Ser | Trp | Lys | Phe | Ser | His | | |
| | | | | | 145 | | | | 150 | | | | | | 160 | | |
| His | Arg | His | His | Arg | Phe | Thr | Gly | His | Met | Glu | Lys | Asp | Met | Ala | Phe | | |
| | | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | | |
| Val | Pro | Ala | Thr | Glu | Ala | Asp | Arg | Asn | Gln | Arg | Lys | Leu | Ala | Asn | Leu | | |
| | | | | | 180 | | | | 185 | | | | | | 190 | | |
| Tyr | Met | Asp | Lys | Glu | Thr | Ala | Glu | Met | Phe | Glu | Asp | Val | Pro | Ile | Val | | |
| | | | | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | |
| Gln | Leu | Val | Lys | Leu | Ile | Ala | His | Gln | Leu | Ala | Gly | Trp | Gln | Met | Tyr | | |
| | | | | | 210 | | | | 215 | | | | | | 220 | | |
| Leu | Leu | Phe | Asn | Val | Ser | Ala | Gly | Lys | Gly | Ser | Lys | Gln | Trp | Glu | Thr | | |
| | | | | | 225 | | | | 230 | | | | | | 240 | | |
| Gly | Lys | Gly | Gly | Met | Gly | Trp | Leu | Arg | Val | Ser | His | Phe | Glu | Pro | Ser | | |
| | | | | | 245 | | | | 250 | | | | | | 255 | | |
| Ser | Ala | Val | Phe | Arg | Asn | Ser | Glu | Ala | Ile | Tyr | Ile | Ala | Leu | Ser | Asp | | |
| | | | | | 260 | | | | 265 | | | | | | 270 | | |
| Leu | Gly | Leu | Met | Ile | Met | Gly | Tyr | Ile | Leu | Tyr | Gln | Ala | Ala | Gln | Val | | |
| | | | | | 275 | | | | 280 | | | | | | 285 | | |
| Val | Gly | Trp | Gln | Met | Val | Gly | Leu | Leu | Tyr | Phe | Gln | Gln | Tyr | Phe | Trp | | |
| | | | | | 290 | | | | 295 | | | | | | 300 | | |
| Val | His | His | Trp | Leu | Val | Ala | Ile | Thr | Tyr | Leu | His | His | Thr | His | Glu | | |
| | | | | | 305 | | | | 310 | | | | | | 320 | | |
| Glu | Val | His | His | Phe | Asp | Ala | Asp | Ser | Trp | Thr | Phe | Val | Lys | Gly | Ala | | |
| | | | | | 325 | | | | 330 | | | | | | 335 | | |
| Leu | Ala | Thr | Val | Asp | Arg | Asp | Phe | Gly | Phe | Ile | Gly | Lys | His | Leu | Phe | | |
| | | | | | 340 | | | | 345 | | | | | | 350 | | |
| His | Asn | Ile | Ile | Asp | His | His | Val | Val | His | His | Leu | Phe | Pro | Arg | Ile | | |
| | | | | | 355 | | | | 360 | | | | | | 365 | | |
| Pro | Phe | Tyr | Tyr | Ala | Glu | Glu | Ala | Thr | Asn | Ser | Ile | Arg | Pro | Met | Leu | | |
| | | | | | 370 | | | | 375 | | | | | | 380 | | |
| Gly | Pro | Leu | Tyr | His | Arg | Asp | Asp | Arg | Ser | Phe | Met | Gly | Gln | Leu | Trp | | |
| | | | | | 385 | | | | 390 | | | | | | 400 | | |
| Tyr | Asn | Phe | Thr | His | Cys | Lys | Trp | Val | Val | Pro | Asp | Pro | Gln | Val | Pro | | |
| | | | | | 405 | | | | 410 | | | | | | 415 | | |
| Gly | Ala | Leu | Ile | Trp | Ala | His | Thr | Val | Gln | Ser | Thr | Gln | | | | | |
| | | | | | 420 | | | | 425 | | | | | | | | |

<210> 4
<211> 1206
<212> ADN
<213> *Aspergillus nidulans*
5 <220>
<221> CDS
<222> (1).. (1206).
<400> 4

ES 2 542 420 T3

| | |
|---|-----|
| atg gct gca act gca aca acc cta gca gag att gaa aag aaa aaa gaa | 48 |
| Met Ala Ala Thr Ala Thr Thr Leu Ala Glu Ile Glu Lys Lys Lys Glu | |
| 1 5 10 15 | |
| gaa ata act ctg cag aca atc aaa aat gcg att ccc aaa cac tgc ttc | 96 |
| Glu Ile Thr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Ala Ile Pro Lys His Cys Phe | |
| 20 25 30 | |
| aac cgc tct ctc ctc att tcc tct gcc tac gtc gtc cgc gat ctc ctc | 144 |
| Asn Arg Ser Leu Leu Ile Ser Ser Ala Tyr Val Val Arg Asp Leu Leu | |
| 35 40 45 | |
| tac gcc tcc gtc ctc ttc tac ttt gcc ctg cac att gac acc ctc ttt | 192 |
| Tyr Ala Ser Val Leu Phe Tyr Phe Ala Leu His Ile Asp Thr Leu Phe | |
| 50 55 60 | |
| tcc tcg caa ctc ctc cgc atc ctc gcc tgg acc gcc tac ggt ttc atg | 240 |
| Ser Ser Gln Leu Leu Arg Ile Leu Ala Trp Thr Ala Tyr Gly Phe Met | |
| 65 70 75 80 | |
| caa ggc tgc gtc ggc acc gga atc tgg atc ctc gca cac gaa tgc ggc | 288 |
| Gln Gly Cys Val Gly Thr Gly Ile Trp Ile Leu Ala His Glu Cys Gly | |
| 85 90 95 | |
| cat gga gct ttc tcc cca tac caa acg tgg aac gat gtc gtc gga tgg | 336 |
| His Gly Ala Phe Ser Pro Tyr Gln Thr Trp Asn Asp Val Val Gly Trp | |
| 100 105 110 | |
| aca ttg cac tcc ctc ctg atg gtc ccg tat ttc acg tgg aag atc acg | 384 |
| Thr Leu His Ser Leu Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Ile Thr | |
| 115 120 125 | |
| cac gct cga cac cac cgg tac aca aac aac aca gag cga gat aca gca | 432 |
| His Ala Arg His His Arg Tyr Thr Asn Asn Thr Glu Arg Asp Thr Ala | |
| 130 135 140 | |
| ttt gtc ccc tgg aca gag aag gaa tac gac act cgc ccg cgc tac ttc | 480 |
| Phe Val Pro Trp Thr Glu Lys Glu Tyr Asp Thr Arg Pro Arg Tyr Phe | |
| 145 150 155 160 | |
| cct gcc tgg ttt gag atg ttt gag gac acg ccc gtc tac aac ctt att | 528 |
| Pro Ala Trp Phe Glu Met Phe Glu Asp Thr Pro Val Tyr Asn Leu Ile | |
| 165 170 175 | |
| agc cta ctg gcg cat cag atc gca gga tgg cag atg tat ctc tgt ttt | 576 |
| Ser Leu Leu Ala His Gln Ile Ala Gly Trp Gln Met Tyr Leu Cys Phe | |
| 180 185 190 | |
| tac gtt agc gcc ggc gca aag agt aag cct gta ccg cag gga aaa cag | 624 |
| Tyr Val Ser Ala Gly Ala Lys Ser Lys Pro Val Pro Gln Gly Lys Gln | |
| 195 200 205 | |
| agc ggg tgg ttt gga ggc cag cag agc gcc agc cac ttt gat ccg ggc | 672 |
| Ser Gly Trp Phe Gly Gly Gln Gln Ser Ala Ser His Phe Asp Pro Gly | |
| 210 215 220 | |

ES 2 542 420 T3

| | |
|---|------|
| agt tcg ctg tgg acg gaa aac cag cgg cat ctg att gcg att tcg gac | 720 |
| Ser Ser Leu Trp Thr Glu Asn Gln Arg His Leu Ile Ala Ile Ser Asp | |
| 225 230 235 240 | |
| ctg ggg ttg ctg ctt gtt gcg gcg gca aat tgg tac ctt gcg cag caa | 768 |
| Leu Gly Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Asn Trp Tyr Leu Ala Gln Gln | |
| 245 250 255 | |
| gtg ggc gtg ctc cgc atg gtg ctg atc tat gtt gtg ccg tac ttc tgg | 816 |
| Val Gly Val Leu Arg Met Val Leu Ile Tyr Val Val Pro Tyr Phe Trp | |
| 260 265 270 | |
| gtg cac cat tgg ctt gtg gcg atc acg tac ctc cac cac aca cac ccc | 864 |
| Val His His Trp Leu Val Ala Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Pro | |
| 275 280 285 | |
| tcg atc ccg cac tac act gat agc acc tgg acg ttc acc aaa ggc gct | 912 |
| Ser Ile Pro His Tyr Thr Asp Ser Thr Trp Thr Phe Thr Lys Gly Ala | |
| 290 295 300 | |
| ctg tcc acc gtc gac cgc gac ttc ggt ttc atc ggg cgg cat ttc ttc | 960 |
| Leu Ser Thr Val Asp Arg Asp Phe Gly Phe Ile Gly Arg His Phe Phe | |
| 305 310 315 320 | |
| cac cat atc att gac cac cat gtc gtg cat cac ttg ttt aac cgg atc | 1008 |
| His His Ile Ile Asp His His Val Val His His Leu Phe Asn Arg Ile | |
| 325 330 335 | |
| ccg ttc tac cat gcc gag gag gcg act aat gcc att att ccc gta ctc | 1056 |
| Pro Phe Tyr His Ala Glu Glu Ala Thr Asn Ala Ile Ile Pro Val Leu | |
| 340 345 350 | |
| ggg gac atg tat cat cgc gaa gag acc ggc ttc ttg tgg agt tta atg | 1104 |
| Gly Asp Met Tyr His Arg Glu Glu Thr Gly Phe Leu Trp Ser Leu Met | |
| 355 360 365 | |
| gag acg tac aag aac tgt cgg ttt gta ggc gtt gaa aat gat gtt gga | 1152 |
| Glu Thr Tyr Lys Asn Cys Arg Phe Val Gly Val Glu Asn Asp Val Gly | |
| 370 375 380 | |
| aag gag ggc gtt ttg cat tgg gtt ttt gag gag aag aag ggt gcc aaa | 1200 |
| Lys Glu Gly Val Leu His Trp Val Phe Glu Glu Lys Lys Gly Ala Lys | |
| 385 390 395 400 | |
| gcg gaa | 1206 |
| Ala | |

<210> 5

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Aspergillus nidulans

<400> 5

Met Ala Ala Thr Ala Thr Thr Leu Ala Glu Ile Glu Lys Lys Lys Glu
 1 5 10 15
 Glu Ile Thr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Ala Ile Pro Lys His Cys Phe
 20 25 30
 Asn Arg Ser Leu Leu Ile Ser Ser Ala Tyr Val Val Arg Asp Leu Leu
 35 40 45
 Tyr Ala Ser Val Leu Phe Tyr Phe Ala Leu His Ile Asp Thr Leu Phe
 50 55 60
 Ser Ser Gln Leu Leu Arg Ile Leu Ala Trp Thr Ala Tyr Gly Phe Met

 65 70 75 80
 Gln Gly Cys Val Gly Thr Gly Ile Trp Ile Leu Ala His Glu Cys Gly
 85 90 95
 His Gly Ala Phe Ser Pro Tyr Gln Thr Trp Asn Asp Val Val Gly Trp
 100 105 110
 Thr Leu His Ser Leu Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Ile Thr
 115 120 125
 His Ala Arg His His Arg Tyr Thr Asn Asn Thr Glu Arg Asp Thr Ala
 130 135 140
 Phe Val Pro Trp Thr Glu Lys Glu Tyr Asp Thr Arg Pro Arg Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Ala Trp Phe Glu Met Phe Glu Asp Thr Pro Val Tyr Asn Leu Ile
 165 170 175
 Ser Leu Leu Ala His Gln Ile Ala Gly Trp Gln Met Tyr Leu Cys Phe
 180 185 190
 Tyr Val Ser Ala Gly Ala Lys Ser Lys Pro Val Pro Gln Gly Lys Gln
 195 200 205
 Ser Gly Trp Phe Gly Gly Gln Gln Ser Ala Ser His Phe Asp Pro Gly
 210 215 220
 Ser Ser Leu Trp Thr Glu Asn Gln Arg His Leu Ile Ala Ile Ser Asp
 225 230 235 240
 Leu Gly Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Asn Trp Tyr Leu Ala Gln Gln
 245 250 255
 Val Gly Val Leu Arg Met Val Leu Ile Tyr Val Val Pro Tyr Phe Trp
 260 265 270
 Val His His Trp Leu Val Ala Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Pro
 275 280 285
 Ser Ile Pro His Tyr Thr Asp Ser Thr Trp Thr Phe Thr Lys Gly Ala
 290 295 300
 Leu Ser Thr Val Asp Arg Asp Phe Gly Phe Ile Gly Arg His Phe Phe
 305 310 315 320
 His His Ile Ile Asp His His Val Val His His Leu Phe Asn Arg Ile
 325 330 335
 Pro Phe Tyr His Ala Glu Glu Ala Thr Asn Ala Ile Ile Pro Val Leu
 340 345 350
 Gly Asp Met Tyr His Arg Glu Glu Thr Gly Phe Leu Trp Ser Leu Met
 355 360 365
 Glu Thr Tyr Lys Asn Cys Arg Phe Val Gly Val Glu Asn Asp Val Gly
 370 375 380
 Lys Glu Gly Val Leu His Trp Val Phe Glu Glu Lys Lys Gly Ala Lys
 385 390 395 400
 Ala

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6

Trp Ile Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Ser Phe
1 5 10

5 <210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 7

Leu Ala His Glu Cys Gly His
1 5

<210> 8

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 8

His Ser Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys
1 5 10

20

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 9

Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys
1 5

<210> 10

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 10

His His Arg His His Arg Phe Thr Thr
1 5

5 <210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 11

Trp Val His His Trp Leu Val Ala Ile Thr Tyr Leu His His Thr His

1

5

10

15

<210> 12

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 12

Ala Ile Thr Tyr Leu His Gln His Thr
1 5

20

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 13

Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg
1 5

<210> 14

30 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <100> 14

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Val | Val | His | His | Leu | Phe | Xaa | Arg | Ile | Pro | Phe | Tyr |
| 1 | | | | | 5 | | | | | | 10 | |

5 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 15
 aagatggcgt ccgtctcc tc tgccctccc 30
 <210> 16

15 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 16
 ttatgggtt ttggggagct tggcaggctt g 31
 <210> 17
 <211> 34
 <212> ADN

25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 17
 gcggccgcaa catgacggtc accacccgca gccaa 34

30 <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 18

cctgcagggtt actgggtgct ctgaacggtg tgcg 34

<210> 19

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 19

His His Arg His His Arg Tyr Thr Thr
1 5

10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 20

His Ala Arg His His Arg Phe Thr Thr
1 5

<210> 21

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 21

His Ala Arg His His Arg Tyr Thr Thr
1 5

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 22

| | | | |
|---|---|----|----|
| Trp Val His His Trp Leu Val Ala Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |

<210> 23 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 23
 aatatggctg caactgcaac aaccc 25
 <210> 24
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 15 <400> 24
 ttccgcttg gcacccttct tc 22
 <210> 25
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 25
 gtcgacacca tggcctctac cactgctctc 30
 25 <210> 26
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 26
 ctgcagtgcc ttgagctca ttggtggtgt a 31
 <210> 27
 <211> 27
 35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (7).. (12).
 <223> N = A, C, G, o T/U
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 10 <400> 27
 gccrtgnccr caycrtgng cnagdat 27
 <210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 28
 acgatgactc tcgattacac aagtcacccg 30
 20 <210> 29
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 29
 gtgcacacga tgactctgaa ttacacaagt cacc 34
 <210> 30
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 30
 35 ctgcagaatg cttgagctat cagcagatcc caa 33
 <210> 31 <211> 1428 <212> DNA <213> Botrytis cinerea

ES 2 542 420 T3

<400> 31

```
atggcctcta ccactgctc cccaaagcgc accggccgttc aaagaacggt gacctcctcc 60
actgccaat cagctccctc gacagctgcc ggttccccca atgatacccc aagacaatcc 120
ccctcgta cttctctgtc atctatgtca tctcttaggcg aagatgttaa gagcaccaag 180
ccatatggca aactcatcga tacttacgga aacgaatttgc agcttccaga ttataccgtc 240
aatgacatcc gtaacgcaat tccaaagcat tggttacgagc gatctggagt aaggggtttg 300
gcttatgttgc ctcgcgatat tgccagcttgc gccaccacat tcttccctt caacaaatac 360
cttacaccag aaaacgttcc ctcaactyca ggcgcgcgtg tgctgtggc tttatacacc 420
gttggcagg gtttgggg tactggtctc tgggttcttgc ctcatgagtg tggccatcaa 480
tctttctcga cttcaaaggat cttgaacgat acaactggat ggatctgcca ctctgctt 540
ctcgccccat acttttcatg gaagatctct cacggcaagc atcacaaagc tactggcaac 600
atggagcgtg atatggttt cgttccaaag acccgtcaag attatgctac ccgcgtcggc 660
aagttcgttc atgagcttca cgagctcacc gaggagactc caatcgcaac tcttattcac 720
tccatcgac aacaacttgc tggctggcct ttgtacttat tcatgaacgt caccggtcac 780
aacaaccatg agcgtcaaca tgagggtcgt ggaaagggttta aggtcaacag tttctggacc 840
gtcagtcact tcaaccaggc cagtccttctt tatgaagcttta aggtatgcctt 900
ttgagtgatc tcggtatcgc catcaccggcc gctgtcccttta tcatgcttagt caagacatac 960
ggattttaca acatggctat ctggacttcc attccatacc tctgggtaaa ccactggctt 1020
gttgctatca ctttcctcca acacaccggc ccaactttt ctcactactc tggcgagac 1080
tggaaactatg ttcgtggagc cgccagcaacc atcgatcgatg aattcggattt catcgacgc 1140
actcttccttc acggatcatcg cggacccac gttcttcacc actacgtcag caccatttc 1200
ttctaccacg ccgatggggc taccggggcc atcaaggcttta tcatgggtcg tcaactacaga 1260
gccgatgttc gaggcggatc ctttggattt ttgaagagct tgggtccag cgctcggttgg 1320
tgccagtggttgg tccgagccatc tgagggtgttta gaagggtgagg gcaagaaggtt attcttc 1380
cgtaaccggca atggactcgg tacaccacca atgaagctca aggcataa 1428
```

<210> 32

<211> 475

5 <212> PRT

<213> Botrytis cinerea

<400> 32

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Thr | Thr | Ala | Leu | Pro | Lys | Arg | Thr | Ala | Val | Gln | Arg | Thr |
| 1 | | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | 15 |
| Val | Thr | Ser | Ser | Thr | Ala | Glu | Ser | Ala | Pro | Ser | Thr | Ala | Ala | Gly | Ser |
| | | | | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | |
| Pro | Asn | Asp | Thr | Pro | Arg | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Thr | Ser | Leu | Ser | Ser |
| | | | | | 35 | | | 40 | | | | | | 45 | |
| Met | Ser | Ser | Leu | Gly | Glu | Asp | Val | Lys | Ser | Thr | Lys | Pro | Tyr | Gly | Lys |
| | | | 50 | | | | 55 | | | | 60 | | | | |

ES 2 542 420 T3

Leu Ile Asp Thr Tyr Gly Asn Glu Phe Glu Leu Pro Asp Tyr Thr Val
 65 70 75 80
 Asn Asp Ile Arg Asn Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser Gly
 85 90 95
 Val Arg Gly Leu Ala Tyr Val Ala Arg Asp Ile Ala Ser Leu Ala Thr
 100 105 110
 Thr Phe Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Leu Thr Pro Glu Asn Val Pro Ser
 115 120 125
 Thr Xaa Ala Arg Ala Val Leu Trp Ala Leu Tyr Thr Val Val Gln Gly
 130 135 140
 Leu Phe Gly Thr Gly Leu Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gln
 145 150 155 160
 Ser Phe Ser Thr Ser Lys Val Leu Asn Asp Thr Thr Gly Trp Ile Cys
 165 170 175
 His Ser Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Ile Ser His Gly
 180 185 190
 Lys His His Lys Ala Thr Gly Asn Met Glu Arg Asp Met Val Phe Val
 195 200 205
 Pro Lys Thr Arg Gln Asp Tyr Ala Thr Arg Val Gly Lys Phe Val His
 210 215 220
 Glu Leu His Glu Leu Thr Glu Glu Thr Pro Ile Ala Thr Leu Ile His
 225 230 235 240
 Ser Ile Gly Gln Gln Leu Ala Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Phe Met Asn
 245 250 255
 Val Thr Gly His Asn Asn His Glu Arg Gln His Glu Gly Arg Gly Lys
 260 265 270
 Gly Lys Val Asn Ser Phe Trp Thr Val Ser His Phe Asn Pro Ala Ser
 275 280 285
 Pro Leu Tyr Glu Ala Lys Asp Ala Lys Leu Ile Leu Leu Ser Asp Leu
 290 295 300
 Gly Ile Ala Ile Thr Ala Ala Val Leu Ile Met Leu Ser Lys Thr Tyr
 305 310 315 320
 Gly Phe Tyr Asn Met Ala Ile Trp Tyr Phe Ile Pro Tyr Leu Trp Val
 325 330 335
 Asn His Trp Leu Val Ala Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp Pro Thr
 340 345 350
 Leu Pro His Tyr Ser Gly Glu Ser Trp Asn Tyr Val Arg Gly Ala Ala
 355 360 365
 Ala Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Phe Ile Gly Arg Thr Leu Leu His
 370 375 380
 Gly Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Val Ser Thr Ile Pro
 385 390 395 400

ES 2 542 420 T3

Phe Tyr His Ala Asp Glu Ala Thr Glu Ala Ile Lys Pro Ile Met Gly
 405 410 415

Arg His Tyr Arg Ala Asp Val Arg Gly Gly Ser Leu Gly Phe Leu Lys
 420 425 430

Ser Leu Trp Ser Ser Ala Arg Trp Cys Gln Trp Val Glu Pro Ser Glu
 435 440 445

Gly Ala Glu Gly Glu Gly Lys Lys Val Phe Phe Phe Arg Asn Arg Asn
 450 455 460

Gly Leu Gly Thr Pro Pro Met Lys Leu Lys Ala
 465 470 475

<210> 33

<211> 1293

<212> ADN

5 <213> Botrytis cinerea

<400> 33

atgactctcg attacacaag tcaccggcg gagctggca aaggagggga ggtccctaca 60
 aaccctaaag tgactgtcaa ggatttgcgc aatgcgattc ctgagcactg cttcaagcca 120
 tcttacaagc tttcattttg gtacctttc agagacctat ttgttgctac aataacggtg 180
 gttgttagcat atttatatat acctcgaatc gagactaacg tgcttcgtta tgcgggttgg 240
 gctacttatg gagttattca aggactaacg gctactggca tctgggtact tggccatgag 300
 tgtggacact ctgcattctc cccgtccgac attttgaatg atactctggg ctggattctg 360
 cattctgctc tcctcacgac ctacttctcc tggcaatcta gccatcgacg ccatcatata 420
 tatgcaaatc atttggtaaa agaccacaac tacgtgcaccc taccaaagga ttagtatgcc 480
 gcgctttat ctgtttagt tagtcgacta gaagagctt ctgaggattc tcccattttac 540
 acattactac gcatagtagc acaacatctc ttcgggtttt cattgtacct tacagcgaac 600
 atcactgcat ctcaagggttc actgaatcag gctcaatcca aaaatattct aggcaacagt 660
 cacttctcac cagcaagcac actatttcgt cccgaggaat cacatctcat tattcttcg 720
 gatattggca ttggccttgt cgtgtttggc ctttggtagt ctagccaaat atttggtgga 780
 tccatgattt cattgttgc tcttcaacct tatctctggg tcaaccactg gattgtcgct 840
 atcacctatc tgcacatcatac acaccctgtat gtacccaaat acgaaccgga agcatggaca 900
 tttcttaaaag gtgcacttgc aacagttgtat cgggagctgg ggtgggtggg aaagcacatg 960
 ctacacaaca ttggcgaggccatgtt caccacccat tttcacgtat ccctcaaatat 1020
 cacgctgagg aagcgaccaa ggcttattatg ccattgtcga aaagctctt ccgttagtgc 1080
 aagaagcgaa acttttggat gtgtatgtgg gagtctttt ctaagtgcac gtacgtgttt 1140
 ccatatgacg ttaaggctaa gctagaagat cgtacaatgg tctacaagggg tggtccaaacg 1200
 ccaacactcg agatctttat gaggaaagaaa ggatgggtca aggaggtgaa tcagagtaaa 1260
 cagttggat ctgctgatag ctcaagcatt tga 1293

<210> 34

<211> 430

10 <212> PRT

<213> Botrytis cinerea

<400> 34

ES 2 542 420 T3

Met Thr Leu Asp Tyr Thr Ser His Pro Ala Glu Leu Val Lys Gly Gly
1 5 10 15

Glu Val Pro Thr Asn Pro Lys Val Thr Val Lys Asp Leu Arg Asn Ala
20 25 30

Ile Pro Glu His Cys Phe Lys Pro Ser Tyr Lys Leu Ser Phe Trp Tyr
35 40 45

ES 2 542 420 T3

Leu Phe Arg Asp Leu Phe Val Ala Thr Ile Thr Val Val Val Ala Tyr
 50 55 60
 Leu Tyr Ile Pro Arg Ile Glu Thr Asn Val Leu Arg Tyr Ala Ala Trp
 65 70 75 80
 Ala Thr Tyr Gly Val Ile Gln Gly Leu Thr Ala Thr Gly Ile Trp Val
 85 90 95
 Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala Phe Ser Pro Ser Asp Ile Leu
 100 105 110
 Asn Asp Thr Leu Gly Trp Ile Leu His Ser Ala Leu Leu Thr Pro Tyr
 115 120 125
 Phe Ser Trp Gln Ser Ser His Arg Arg His His Ile Tyr Ala Asn His
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp His Asn Tyr Val Pro Leu Pro Lys Asp Glu Tyr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Leu Ser Val Asp Val Ser Arg Leu Glu Glu Leu Thr Glu Asp
 165 170 175
 Ser Pro Ile Tyr Thr Leu Leu Arg Ile Val Ala Gln His Leu Phe Gly
 180 185 190
 Phe Pro Leu Tyr Leu Thr Ala Asn Ile Thr Ala Ser Gln Gly Ser Leu
 195 200 205
 Asn Gln Ala Gln Ser Lys Asn Ile Leu Gly Asn Ser His Phe Ser Pro
 210 215 220
 Ala Ser Thr Leu Phe Arg Pro Glu Glu Ser His Leu Ile Ile Leu Ser
 225 230 235 240
 Asp Ile Gly Ile Gly Leu Val Val Phe Gly Leu Trp Tyr Ala Ser Gln
 245 250 255
 Ile Phe Gly Gly Ser Met Ile Ala Leu Leu Tyr Leu Gln Pro Tyr Leu
 260 265 270
 Trp Val Asn His Trp Ile Val Ala Ile Thr Tyr Leu His His Thr His
 275 280 285
 Pro Asp Val Pro Lys Tyr Glu Pro Glu Ala Trp Thr Phe Leu Lys Gly
 290 295 300
 Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Glu Leu Gly Trp Val Gly Lys His Met
 305 310 315 320
 Leu His Asn Ile Ala Glu Phe His Val Ile His His Leu Phe Ser Arg
 325 330 335
 Ile Pro Gln Tyr His Ala Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Met Pro Leu
 340 345 350
 Leu Lys Ser Ser Tyr Arg Ser Asp Lys Lys Arg Asn Phe Trp Met Cys
 355 360 365
 Met Trp Glu Ser Phe Thr Lys Cys Gln Tyr Val Val Pro Tyr Asp Val
 370 375 380

Lys Ala Lys Leu Glu Asp Arg Thr Met Val Tyr Lys Gly Gly Pro Thr
 385 390 395 400

Pro Thr Ser Glu Ile Phe Met Arg Lys Lys Gly Trp Val Lys Glu Val
 405 410 415

Asn Gln Ser Lys Gln Leu Gly Ser Ala Asp Ser Ser Ser Ile
 420 425 430

<210> 35

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 35

aacatgacgg tcaccacccg cagccacaag 30

10 <210> 36

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 36

ctgggtgctc tgaacggtgt gcgccaaat 30

<210> 37

<211> 1290

20 <212> ADN

<213> Neurospora crassa

<400> 37

atggctgtca ctactaggc acacaaagcc gccgctgcca ccaaacctga agttgtgtct 60
 acaggaggatgg atgcagtcag cgctgccc ccaaggacta gtagctcctc atcctccaa 120
 aagtcaagctg agcctatcga atatccagac atcaagacaa ttctgtacgc tataccagac 180
 cactgcttta gacctcgctt ttggatatcc atggcgactt ttatcgca ttttgcata 240
 gctttcgcc tcggatactt ggcattggcaa tacatccctt tgattgcaag taccggattt 300
 agatacggag cttgggctt gtacggttac ctccaggac tcgtctgtac tggaaatttgg 360
 atcttggctc acgaatcgcc tcacggagcc ttcttagac acacctgggtt caacaacgtt 420
 atgggttggaa ttgggtcactc ttctctacta gtcccatatt ttagctggaa attttccat 480
 caccgtcatac atagggttac cggacatatg gaaaaagata tggcggtcg tccagccacg 540
 gaggccgaca gaaatcagag aaaactagct aatctctata tggacaaaga gactgcggag 600
 atgttcgagg atgttcctat tgtcagttt gttaaactaa ttgctcacca actcgccggt 660
 tggcagatgt atctcttgc caacgtttagt gccggaaaag gctccaaaca gtggaaaacc 720
 ggcaaaagggtg gaatgggatg gctccgcgtg agccatttcg aaccaagttc agccgtttc 780
 agaaacacgca aagcaattta catacgctca agcgatctcg gacttatgtat tatggata 840
 attctctacc aggcagccca agttgttggaa tggcaatgg ttggctctt gtattttcaa 900
 cagtacttctt ggggtcacca ttggctcggtt gccatcaactt accttcatca cacacacgaa 960
 gaagttcacc actttgtatgc agattttttt acatttttta aggggtccct cgctaccgtg 1020
 gacagagact tcgggttcat cggcaagcac ctcttccata acatcattga ccattcatgtt 1080
 gttcatcacc tcttcccaag aatcccttc tactacgctg aagaagctac caattcaata 1140
 agacctatgc tcggacctctt ttaccacaga gatgaccgtt ctttcatggg gcaactctgg 1200

tacaacttca cacactgcaa atgggttgc cctgatcctc aagtgcagg tgctctaattc 1260
 tgggctcaca ccgttcagag tactcagtaa 1290

<210> 38

<211> 1209

5 <212> ADN

<213> Aspergillus nidulans

<400> 38

atggccgcaa ccgcgaccac tctcgctgaa atagaaaaga agaaggaaaga gattacacta 60
 cagacaatca agaatgccat accaaagcac tgggtttaacc gtagtttgc tatttcaagt 120
 gcctacgtcg tcagagaccc cctctacgca tcagttttgt tctatccatc acttcatatt 180
 gatacgctct tctcatccca gtcctttagg atcttggcat ggacagctt cggtttcatg 240
 caaggctgcg tgggaacggg tataatggata ttggcacatg aatgcggaca cggagcttt 300
 agcccttacc aaacctggaa cgacgttggtt ggggtggaccc ttcattctct tctcatggc 360
 ctttacttctt cttggaaaat aaccacgcg aggacccaca gatatacgaa caataccgag 420
 agggacacag ctttcgttcc ctggaccgag aaggaatacg acaccagacc tcgttacttc 480
 cctgcattgtt tcgagatgtt tgaagacaca ccagtgtata acttgatttc attgctcgcc 540
 catcagatcg ccggctggca aatgtaccc tgcattctacg tctcagccgg agccaaaagt 600
 aaggcctgttc cacaaggcaaa gcagtcggaa tgggttggag gtcacaatc tgcatacac 660
 tttgaccacag gaagctctt atggaccgaa aaccagcgcc atctaatcgc aatctccgac 720
 cttggactcc ttctcggtcc cggccgaaat tggtaacttgg ctcaacaatg tgggttctt 780
 agaatgggtgc tcatttacgt cgtccctac ttttgggtcc accactggct agtcgcccac 840
 acgtacccctt accacactca cccatccata ccacactaca ccgactctac ctggacattc 900
 actaaaggag cactctcaac agtggatcgt gacttcggat ttataggaag gcacttctt 960
 caccacatca ttgatcacca cgtcgatccat cacttgcgtca ataggatacc attctatcac 1020
 gcagaggaag ctactaacgc aataatacca gttctcggtg atatgtacca tagagaagaa 1080
 accggattcc tctggagtttctt tatggaaaact tataaaaact gtcgtttgt tggcgtggag 1140
 aacgatgtgg gtaaggagg agttctccat tgggttttcg aagaaaagaa aggcgcataaa 1200
 gctgaatag 1209

<210> 39

10 <211> 1446

<212> ADN

<213> Neurospora crassa

<400> 39

atggcgtccg tctccctctgc ccttcccggag ggcaacaaggc ctgcctcgcg caggaccggaa 60
 accgaggcca cctccgactc ataccctggt accgctgatg cctctccctt cgactctccc 120
 cttgagcgct cggcctccaa cacctcgctt tcttcccagg cctctgacaa cgtcaagacc 180
 gacaaggccg agttcggccaa gctgctcgac acgtatggca acgagttcga ggtccccgac 240
 ttcaccatca aggacatccg cgatgccatc cccgcccact gctttgagcg ttcggctt 300
 cacagcttgg cgcacgtcgatc cgcgcacatc atttacctca cgcgtactt ttacgtctgg 360
 aacaagtatg tcaactcccgaa gtacatcccc atgaaggctg cccgtgtcgat cctctgggg 420
 ctgtacaccc tcatgcaggc cctttcgcc accggctctt gggttcttgc ccatgagtgc 480
 ggtcaccagg ctttctccccc gtccaggtt atcaacgaca cgcgtggctg ggtcctccac 540
 tctgccttc tcgtccccca cttctcgatgg aagttctccc acagcaaggca ccacaaggcc 600
 accggcaaca tcgagcgtga catggcttc gttcctcgga cccgcgagca gtttgcgtct 660
 cgcacatggcc gtttcgttcca tgagatttcc gagttgacccg aggagacccc catctacacc 720
 ttgatccacc ttatcggtca gcagctcatc ggctggccca actacctcat gaccaacgtc 780
 accggccaca acttccacca gaggcagcgc gagggtcgatg gcaaggggcaa gaagaacggc 840
 tggttcaactg gtgtcaacca cttaaaccccc agctctcccc tctatgagga gctgtgaggcc 900
 ccctggatca tcgtctcccgatc catcggtatc gctatcgccg ccacccgcct catctacctc 960
 ggcaacaccc tcggctggtc caacatgttc gtctggtaact tccttcccta cctctgggtc 1020
 aaccactggc ttgttgcctt cacctaccc cagcacacccg acccctcgat cccccactac 1080
 acccctgatc agtggaaactt tgtccgtggt gccgcggcga ctattgaccc cgagttcgcc 1140
 ttcatcgcc gtcacccctt ccacggcatt atcgagaccc acgttcttcca ccactacgtc 1200
 agcaccattc cttttacca cgccgacgag gcctccgagg ccatcaagaa ggtcatgggc 1260
 cgtcaactacc gcgctgacgt ccaagatggc cccatcggtt tcatcaaggc catgtggaag 1320
 gctgctcgatgg ggtgccagctt accgaggccgctt accgagggtaa gggcaaggcc 1380

gtcttgcgtt accgcaacca gaacggtctc ggtgtcaaggc ctgccaagct ccccaaaacc 1440
 aactaa

<210> 40

5 <211> 481

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 40

ES 2 542 420 T3

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

Arg Arg Thr Gln Thr Glu Ala Thr Ser Asp Ser Tyr Pro Gly Thr Ala
 20 25 30

Asp Ala Ser Pro Phe Asp Ser Pro Leu Glu Arg Ser Ala Ser Asn Thr
 35 40 45

Ser Leu Ser Ser Gln Ala Ser Asp Asn Val Lys Thr Asp Lys Ala Glu
 50 55 60

Phe Gly Lys Leu Leu Asp Thr Tyr Gly Asn Glu Phe Glu Val Pro Asp
 65 70 75 80

Phe Thr Ile Lys Asp Ile Arg Asp Ala Ile Pro Ala His Cys Phe Glu
 85 90 95

Arg Ser Ala Leu His Ser Leu Ala His Val Val Arg Asp Ile Ile Tyr
 100 105 110

Leu Thr Val Thr Phe Tyr Val Trp Asn Lys Tyr Val Thr Pro Glu Tyr
 115 120 125

Ile Pro Met Lys Ala Ala Arg Val Val Leu Trp Gly Leu Tyr Thr Phe
 130 135 140

Met Gln Gly Leu Phe Gly Thr Gly Leu Trp Val Leu Ala His Glu Cys
 145 150 155 160

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

Trp Val Leu His Ser Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe
 180 185 190

Ser His Ser Lys His His Lys Ala Thr Gly Asn Ile Glu Arg Asp Met
 195 200 205

Val Phe Val Pro Arg Thr Arg Glu Gln Phe Ala Ser Arg Ile Gly Arg
 210 215 220

Phe Val His Glu Ile Ser Glu Leu Thr Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Thr
 225 230 235 240

Leu Ile His Leu Ile Gly Gln Gln Leu Ile Gly Trp Pro Asn Tyr Leu
 245 250 255

Met Thr Asn Val Thr Gly His Asn Phe His Glu Arg Gln Arg Glu Gly
 260 265 270

Arg Gly Lys Gly Lys Lys Asn Gly Trp Phe Thr Gly Val Asn His Phe

ES 2 542 420 T3

275

280

285

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

Asn

<210> 41

<211> 1200

<212> ADN

5 <213> Mortierella alpina

<400> 41

atggcacctc ccaacactat cgatgcggg ttgaccacgc gtcatatcag cacctcgcc 60
 ccaaactcg ccaagcctgc cttcgagcgc aactaccacg tccccgagtt caccatcaag 120
 gagatccgag agtgcacccc tgccactgc tttgagcgct ccggctctccg tggctctgc 180
 cacgttgcca tcgatctgac ttggcgctcg ctcttgc tggctgcac ccagatcgac 240
 aagtttgaga atcccttgat ccgcatttg gcctggctg tttactggat catgcagggt 300
 attgtctgca cccgtgtctg ggtgcgtgc caccgtgtg gtcacatcgtc cttctcgacc 360
 tccaagaccc tcaacaacac agttgggtgg atcttgcact cgatgcctt ggtccctac 420
 cactcctgga gaatctcgca ctcgaagcac cacaaggcca ctggccatat gaccaaggac 480
 caggtctttg tgcccaagac ccgcctcccg gttggcttgc ctcccaagga gaacgctgct 540
 gctgcgttc aggaggagga catgtccgtg cacctggatg aggaggctcc cattgtgact 600
 ttgttctgga tggtgatcca gttttgttc ggtggcccg cgtacctgat tatgaacgcc 660
 tctggccaag actacggccg ctggacctcg cacttccaca cgtactcgcc catcttgag 720
 ccccgcaact tttcgacat tattatctcg gacctcggtg tggctgc cctcggtgcc 780
 ctgatctatg cttccatgca gttgtcgctc ttgaccgtca ccaagacta tattgtcccc 840
 tacctctttg tcaacttttgc gttgtcgctg atcacctct tgcagcacac cgatcccaag 900
 ctgccccatt accgcgaggg tgcctggaat ttccagcgtg gagctcttg caccgttgac 960

cgctcgtttgc gcaagttctt ggaccatatg ttccacggca ttgtccacac ccatgtggcc 1020
 catcacttgc tctcgaaat gccgttctac catgctgagg aagctaccta tcacatctcaag 1080
 aaactgctgg gagagtacta tggtaacgac ccatccccga tcgtcggtgc ggtctggagg 1140
 tcgttccgtg agtgcggatt cgtggaggat cagggagacg tggctttttt caagaagtaa 1200

<210> 42

<211> 1290

<212> ADN

5 <213> Neurospora crassa

<400> 42

atggcggtca ccacccgcag ccacaaggcc gcggccgcca ccgagccgaa ggttgtcagc 60
 accggcggttgc acgcccgtc tgctgctgt ccctccctt cctcccttc ttccagccaa 120
 aagtccggccg agcccatcga ataccccgac atcaagacca tccgcgcacgc catccccgac 180
 cactgcttcc gcccgcgcgt ctggatctcc atggcctact tcacccgcga cttcgccatg 240
 gcctttggcc tcggctaccc cgcctggcag tacatcccc tgatcgctc caccggctc 300
 cgctacggcg cctgggctct gtacggctac ctccagggtc tcgtcgac gggcatctgg 360
 attctggcgcc acgagtgcgg ccacggcgcc ttctcgaggg acacgtgggtt caacaacgtc 420
 atgggggtggaa ttggccactc cttctcttgc gtcccttact tcagctggaa gttcagccac 480
 catcgccacc atcgcttcac cggccacatg gagaaggaca tggcggttgc gctgcccacc 540
 gaggctgatc gcaaccagag gaagctggcc aacttgtaca tggacaagga gacggcccgag 600
 atgtttgagg atgtgcccatt tgcctcgatc gtcaagctca tcgcccacca gctggccggc 660
 tggcagatgt acctcttgc caacgtctcc gccggtaagg gcagcaagca gtggagact 720
 ggcaaggcg gcatgggctg gttgagggtt agccactttg agccttcctc tgctgtgttc 780
 cgcaactccg aggccatcta cattggccctg tccgatcttgc gtctcatgtat catgggctac 840
 atcctctacc aggccgcgca ggttggc tggcagatgg tggctctgtt gtacttccag 900
 cagtacttctt gggccatcca ttgggtggc gccatcactt acctccacca caccacgag 960
 gaagtccacc actttgcgc cgcactcggtt accttcgtca agggcgctct cgccacccgtc 1020
 gaccgcgatt ttggcttcat tggcaagcac ctcttccaca acattatcga ccaccacgtc 1080
 gtccaccact tggccctcg catccccctt tactacggc aagaagccac caactcgatc 1140
 cggcccatgc tcggcccccctt ctaccaccgc gacgaccgct ccttcattggg ccagctgtgg 1200
 tacaacttca cccactgcaa gtgggtcggtt ccggaccaccc aggtccccgg cgccgttatt 1260
 tggcgcaca ccgttcagag caccagtaa 1290

<210> 43

<211> 1617

10 <212> ADN

<213> Mortierella alpina

<400> 43

cgacactcct tccttcttct caccgtcct agtccccctc aaccccccctc tttgacaaag 60
 acaacaaacc atggctgctg ctcccagtgt gaggacgtt actcgggccc aggtttgaa 120
 tgccgaggct ctgaatgagg gcaagaagga tgccgaggca cccttcttga tgatcatcga 180
 caacaagggt tacgatgtcc gcgagttcg tccgtatcat cccggtgaa gtgtgattct 240
 cacgcacgtt ggcaaggacg gcactgacgt ctttgacact tttcaccccg aggctgctt 300
 ggagactctt gccaactttt acgttggtga tattgacgag agcgaccgcg atatcaagaa 360
 tgatgacttt gcgcccgagg tccgcaagct gcgtacccctt ttcagtgctc ttggttacta 420
 cgattttcc aaggcatact acgccttcaa ggtctcggtt aacctctgca tctgggttt 480
 gtcgacggtc attgtggcca agtggggcca gacctcgacc ctcgccaacg tgctctcggc 540
 tgcgcttttggtcttgc ggcagcagtgcggatggtttgcgtacgacttttgcatca 600
 ccaggtcttc caggaccgtt tctgggtga tcttttcggc gccttcttgg gaggtgtctg 660
 ccagggcttc tcgtcctcggttggtaagga caagcacaac actcaccacg ccgcccccaa 720
 cgtccacggc gaggatcccg acattgacac ccaccctctg ttgacctgga gtgagcatgc 780
 gttggagatg ttctcgatg tcccaagatga ggagctgacc cgcatgtggt cgcggttcat 840
 ggtcctgaac cagacctggttttacttccc cattctctcg tttgcccgtc tctcctggtg 900
 cctccagttcc attctcttttg tgctgcctaa cggtcaggtcc cacaaggccct cgggcgcgcg 960
 tgtgccccatc tcgttggtgc agcagctgtc gcttgcgtatg cactggacct ggtacctcg 1020
 caccatgttc ctgttcatca aggatccgttcaacatgtgc gtgtactttt tggtgctgca 1080
 ggcgggtgtgc ggaaacttgttggcgatcgttgccttgcaccacaacg gtatgcctgt 1140
 gatctcgaag gaggaggccgg tcgatatggtttcttcacaaagcagatca tcacgggtcg 1200
 tgatgtccac ccgggtcttat ttgccaactgttgcacgggttggattgaactatcagatcga 1260

gcaccacttg ttcccttcga tgcctcgcca caactttca aagatccagc ctgctgtcga 1320
 gaccctgtgc aaaaaagtaca atgtccgata ccacaccacc ggtatgtatcg agggaaactgc 1380
 agaggtctt agccgtctga acgaggatctc caaggctgcc tccaaagatgg gtaaggcgca 1440
 gtaaaaaaaaaaa aaacaaggac gtttttttc gccagtgcttgccttgccttgccttgc 1500
 tgtcaagtcg agcgtttctg gaaaggatcg ttcaatgcag tatcatcatt ctcctttac 1560
 ccccccgtca tatctcatttcaatttcttta ttaaacaact tggccatcccttgc 1617

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 15, en el que el polinucleótido es seleccionado entre:
 - 5 a) un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID Nº 3;
 - b) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 1 o SEC ID Nº 2; y
 - c) un polinucleótido que hibrida con una o más de la SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2, o un complemento de las mismas, en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42°C.
2. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido es de *Neurospora crassa*.
- 10 3. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido
 - (i) codifica un polipéptido que tiene al menos uno de los motivos de aminoácido:

TrpIleLeu-AlaHisGluCysGlyHisGlyAla-SerPhe (WLAHECGHGASF) (SEC ID N.º:6); LeuAlaHisGlu-CysGlyHis (LAHECGH) (SEC ID N.º:7); HisSerPh-eLeuLeuValProTyrPheSerTrpLys (H-SFLLVLPYFSWK) (SEC ID N.º:8); LeuLeuValProTyrPheSerTrpLys (LLVPYFSWK) (SEC ID N.º:9); His(His/Ala)ArgHisHisArg(Phe/Tyr)ThrThr (H(H/A)RHHR(F/Y)TT) (SEC ID N.º:10, SEC ID N.º:19, SEC ID N.º:20, o SEC ID N.º:21); TrpValHisHisTrpLeuVal-AlalleThrTyr-Leu(His/Gln)HisThrHis (WVHHHLVAITYL(H/Q)HTH) (SEC ID N.º:11); AlalleThrTyrLeu(His/Gln)HisThr (AIT-YL(H/Q)HT) (SEC ID N.º:12); GlyAlaLeuAlaThrValAspArg (GALATVDR) (SEC ID N.º:13) o HisValValHisHis-LeuPheXaaArgIleProPhe-Tyr (HVVHHLFXRIPFY) (SEC ID N.º:14 o SEC ID N.º:22); o
 - (ii) codifica el polipéptido de la SEC ID Nº 3; o
 - (iii) comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 1 o SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 4 o SEC ID Nº 33; o
 - (iv) hibrida con una o más de la SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2 en condiciones de SSC 5X, formamida al 50%
4. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 1.
5. El vector recombinante de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente al menos una secuencia adicional elegida entre:
 - 20 (a) secuencias reguladoras unidas de forma funcional al polinucleótido;
 - (b) marcadores de selección unidos de forma funcional al polinucleótido;
 - (c) secuencias marcadoras unidas de forma funcional al polinucleótido;
 - (d) un resto de purificación unido de forma funcional al polinucleótido; y
 - (e) una secuencia de dirección unida de forma funcional al polinucleótido.
- 25 6. El vector recombinante de la reivindicación 4, definido adicionalmente como comprendiendo un promotor unido de forma funcional a dicho polinucleótido aislado, preferentemente
 - (i) dicho promotor es un promotor regulado por el desarrollo, específico de orgánulo, específico de tejido, constitutivo o específico de célula; o
 - (ii) dicho promotor se selecciona entre 35S CaMV, 34S FMV, Napina, 7S, Glob, y Lec.
- 30 7. El vector recombinante de la reivindicación 4, que es definido como un casete de expresión aislado.
8. El vector recombinante de la reivindicación 4, que

es definido adicionalmente como comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 6 y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 12.
- 35 9. El vector recombinante de la reivindicación 8, que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 12.

10. El vector recombinante de la reivindicación 9, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 12 es seleccionada entre:
- un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID Nº 32 o SEC ID Nº 40;
 - 5 un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 31 o SEC ID Nº 39; y
 - un polinucleótido que hibrida con una o ambas de la SEC ID Nº 31 o SEC ID Nº 39, o un complemento de las mismas, en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42°C.
11. El vector recombinante de la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 12
- 10 es de un filo seleccionado entre zígomocota, basidiomicota, y ascomicota; o
 - 15 (ii) es de una especie seleccionada entre *Neurospora crassa* y *Botrytis cinerea*.
12. Un polipéptido fúngico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 3; o un fragmento de la misma que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 15.
13. El polipéptido fúngico o fragmento del mismo de la reivindicación 12 que comprende al menos uno de los 15 motivos de aminoácido:
- TrpIleLeuAlaHisGluCysGlyHisGlyAlaSerPhe (WILAHECGHGASF) (SEC ID N.º:6); LeuAlaHisGluCysGlyHis (LA-HECGH) (SEC ID N.º:7); His-SerPheLeuLeuValProTyrPheSerTrpLys (HSFLLVPYFSWK) (SEC ID N.º:8); LeuLeu-ValProTyrPheSerTrpLys (LLVPYFSWK) (SEQ ID NO:9); His(His/Ala)ArgHisHisArg-(Phe/Tyr)ThrThr (H(H/A)RH-
HR(F/Y)TT) (SEC ID N.º:10, SEC ID N.º:19, SEC ID N.º:20, o SEC ID N.º:21); TrpValHisHisTrpLeuValAlalleThr-TyrLeu(His/Gln)HisThrHis (WVHHWLVAITYL(H/Q)HTH) (SEC ID N.º:11); AlalleThrTyrLeu(His/Gln)HisThr (AIT-YL(H/Q)HT) (SEC ID N.º:12); GlyAlaLeuAlaThrValAspArg (GALATVDR) (SEC ID N.º:13) o HisValValHisHisLeu-PheXaaArgIleProPheTyr (HWHHLFXRIPFY) (SEC ID N.º: 14 o SEC ID N.º: 22).
14. El polipéptido fúngico o fragmento del mismo de la reivindicación 12, definido adicionalmente como comprendiendo todos estos motivos de aminoácido.
15. Una planta transgénica que comprende el vector recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 9 a 11.
20. La planta transgénica de la reivindicación 15, definida adicionalmente como comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad desaturasa que desatura una molécula de ácido graso en el carbono 6.
25. Una célula huésped que comprende el vector recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 9 a 11.
18. La célula huésped de la reivindicación 17, en la que dicha célula huésped
- expresa una proteína codificada por dicho vector; o
 - 20 es una célula vegetal.
30. 19. Un procedimiento para producir aceite de semilla que contiene ácidos grasos omega-3 de semillas vegetales, que comprende las etapas de:
- 35 obtener semillas de una planta de acuerdo con la reivindicación 15; y
 - extraer el aceite de dichas semillas.
20. 21. Un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende aceite de semilla que contiene niveles aumentados de ácidos grasos omega-3 respecto a una planta no transformada que comprende introducir el vector recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 9 a 11 en una planta productora de aceite.
21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la introducción del vector recombinante comprende
- reproducir las plantas que incluye explorar las plantas o descendencia de las mismas que han heredado el vector recombinante para una planta que tenga un perfil deseado de ácidos grasos omega-3; o
 - las etapas de

- (a) transformar una célula vegetal con el vector recombinante de la reivindicación 4 o 9-11; y
- (b) regenerar dicha planta a partir de la célula vegetal, en el que la planta tiene niveles aumentados de ácidos grasos omega-3 respecto a las plantas no transformadas.
22. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la planta
- 5 (i) es una planta seleccionada entre *Arabidopsis thaliana*, *Brassica* oleaginosa, semilla de colza, girasol, cártamo, canola, maíz, semilla de soja, algodón, lino, jojoba, árbol de sebo chino, tabaco, cacao, cacahuete, plantas frutales, plantas cítricas, y plantas que producen nueces y bayas; o
- 10 (ii) se define 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 6, preferentemente en la que está aumentado el ácido estearidónico.
23. El procedimiento de la reivindicación 20, definido adicionalmente como comprendiendo la introducción del vector recombinante de la reivindicación 4 en una pluralidad de plantas productoras de aceite y la exploración de dichas plantas o descendencia de las mismas que han heredado el vector recombinante para una planta que tenga un perfil deseado de ácidos grasos omega-3.
- 15 24. Un aceite de semilla de canola endógeno que tiene un contenido de ácido estearidónico del 8% al 27% y un contenido de ácido oleico del 40% al 70%.
25. El aceite de semilla de canola de la reivindicación 24, definido adicionalmente como comprendiendo menos del 10% de ácido alfa-linoleico, ácido linoleico y ácido gamma-linoleico combinados.
26. El aceite de semilla de canola de la reivindicación 24, en el que
- 20 (i) el contenido de ácido estearidónico se define adicionalmente como del 10% al 20%, preferentemente del 12% al 17%; o
- (ii) el contenido de ácido oleico se define adicionalmente como del 45% al 65%, preferentemente del 55% al 65%; o
- 25 (iii) el contenido de ácido estearidónico se define adicionalmente como del 12% al 17% y el contenido de ácido oleico se define adicionalmente como del 55% al 65%.
27. El aceite de semilla de canola de la reivindicación 24, que es aceite de semilla de *Brassica napus* o *Brassica rapa*.
28. El aceite de semilla de canola de la reivindicación 24, en el que la proporción de ácidos grasos omega-6 a omega-3 en el aceite es de 1:1 a 1:4, preferentemente de 1:2 a 1:4.
- 30 29. Un procedimiento para aumentar el valor nutricional de un producto comestible para consumo humano o animal, que comprende añadir el aceite de semilla de canola de la reivindicación 24 al producto comestible.
30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que el producto comestible es
- (i) alimento para seres humanos; o
- (ii) pienso para animales; o
- 35 (iii) un complemento alimenticio; o
- (iv) carece de ácido estearidónico antes de añadir el aceite de semilla de canola.
31. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que el aceite de semilla de canola
- (i) aumenta el contenido de ácido estearidónico del producto comestible; o
- (ii) disminuye la proporción de ácidos grasos omega-6 a omega-3 del producto comestible.
- 40 32. Un procedimiento para fabricar alimentos o piensos, que comprende añadir un aceite de semilla de canola de la reivindicación 24 a ingredientes de partida de alimentos o piensos para producir el alimento o pienso.
33. El procedimiento de la reivindicación 32, definido adicionalmente
- (i) como un procedimiento para fabricar alimentos; o
- (ii) como un procedimiento para fabricar piensos.

34. Alimento o pienso preparado por el procedimiento de la reivindicación 32, que comprende el aceite de semilla de canola de la reivindicación 24.
35. Un procedimiento no terapéutico para proporciona ácido estearidónico a un ser humano o animal, que comprende administrar el aceite de semilla de canola de la reivindicación 24 a dicho ser humano o animal.
- 5 36. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el aceite de semilla de canola se administra en una composición comestible, preferentemente 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 productos alimenticios intermedios.
- 10 37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que la composición comestible es
- (i) sustancialmente un líquido; o
 - (ii) sustancialmente un sólido; o
 - (iii) un complemento alimenticio; o
 - (iv) un nutracéutico.
- 15 38. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el aceite de semilla de canola
- (i) se administra a un ser humano; o
 - (ii) se administra a un animal, preferentemente se administra a ganado o aves de corral.
39. Una composición farmacéutica o veterinaria que comprende el aceite de semilla de canola de la reivindicación 24.
- 20 40. Una planta transgénica de maíz que comprende polinucleótidos que codifican una $\Delta 6$ -desaturasa y una $\Delta 15$ -desaturasa definidas en la reivindicación 1 o 2, en la que la planta de maíz produce aceite de semilla que contiene ácido estearidónico (18:4, n-3).
41. La planta transgénica de maíz de la reivindicación 40, en la que el polinucleótido que codifica la $\Delta 15$ -desaturasa se define adicionalmente como comprendiendo una secuencia seleccionada entre:
- 25 (a) un polinucleótido representado en las SEC ID Nº 1 o 2 o su complemento;
- (b) un polinucleótido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con uno cualquiera de los polinucleótidos de (a);
 - (c) un polinucleótido que hibrida con uno cualquiera de los polinucleótidos de (a) en condiciones de SSC 5X, formamida al 50% y 42°C, un complemento de los cuales codifica una proteína que tiene la misma función biológica que uno cualquiera de los polinucleótidos de (a);
- 30 (d) un polinucleótido que codifica la misma secuencia de aminoácidos que cualquiera de los polinucleótidos de (a), pero que muestra degeneración normal de acuerdo con la degeneración del código genético;
- (e) un polinucleótido que codifica una cualquiera de las mismas secuencias de aminoácidos que (b), pero que muestra degeneración normal de acuerdo con la degeneración del código genético; y
 - (f) un polinucleótido de (c), pero que muestra degeneración normal de acuerdo con la degeneración del código genético.
- 35 42. La planta transgénica de maíz de la reivindicación 40, en la que dicho aceite de semilla comprende ácido α -linolénico (18:3, n-3) aumentado respecto a una planta no transformada.
- 40 43. Un procedimiento para producir una planta de maíz con niveles aumentados de ácido α -linolénico (18:3, n-3) y/o ácido estearidónico (18:4, n-3) respecto a una planta no transformada que comprende:
- (a) transformar una célula vegetal de maíz con polinucleótidos que codifican una $\Delta 6$ -desaturasa y una $\Delta 15$ -desaturasa definida en la reivindicación 1; y
 - (b) regenerar una planta de maíz con contenido aumentado de ácido α -linolénico y/o ácido estearidónico a partid de dicha célula vegetal.

44. Un procedimiento para producir una aceite de maíz que contiene ácidos grasos omega-3 de semillas de maíz y que tiene un contenido aumentado de ácido estearidónico, que comprende las etapas de:
- (a) obtener una planta de acuerdo con la reivindicación 40;
 - (b) triturar las semillas producidas a partir de dicha planta; y
 - (c) extraer dicho aceite de dichas semillas.
- 5

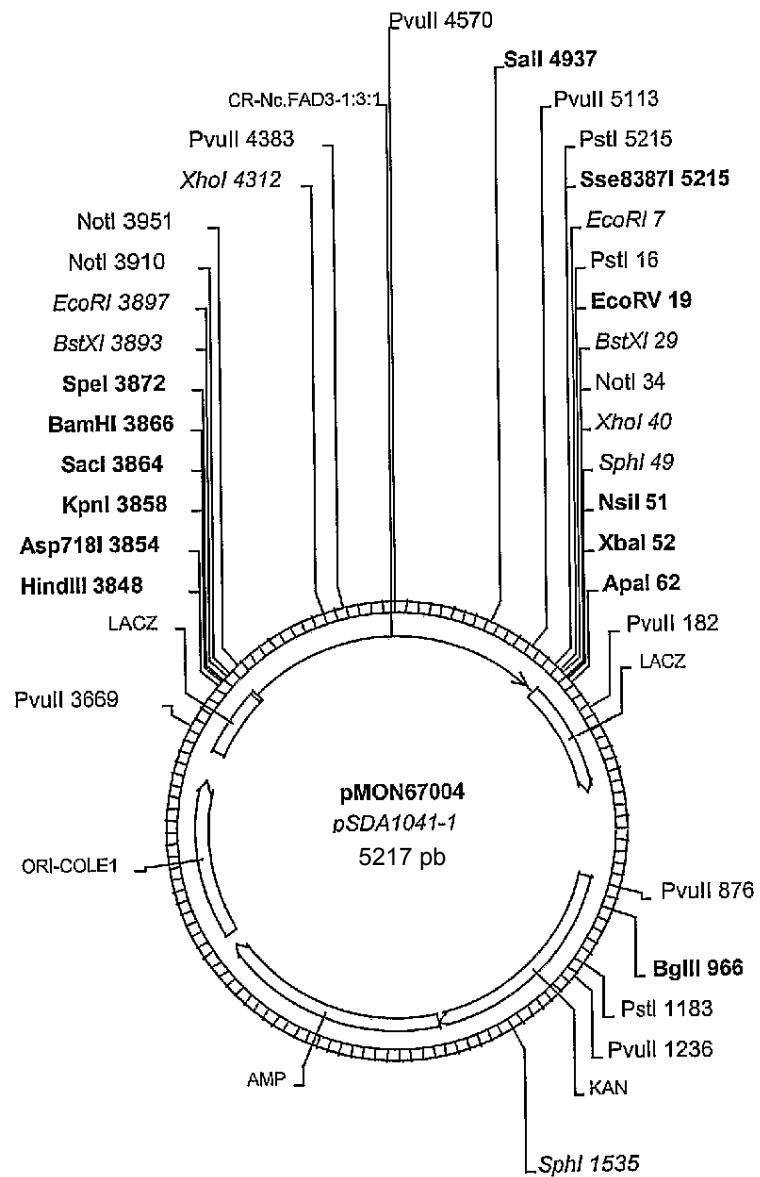


FIG. 1

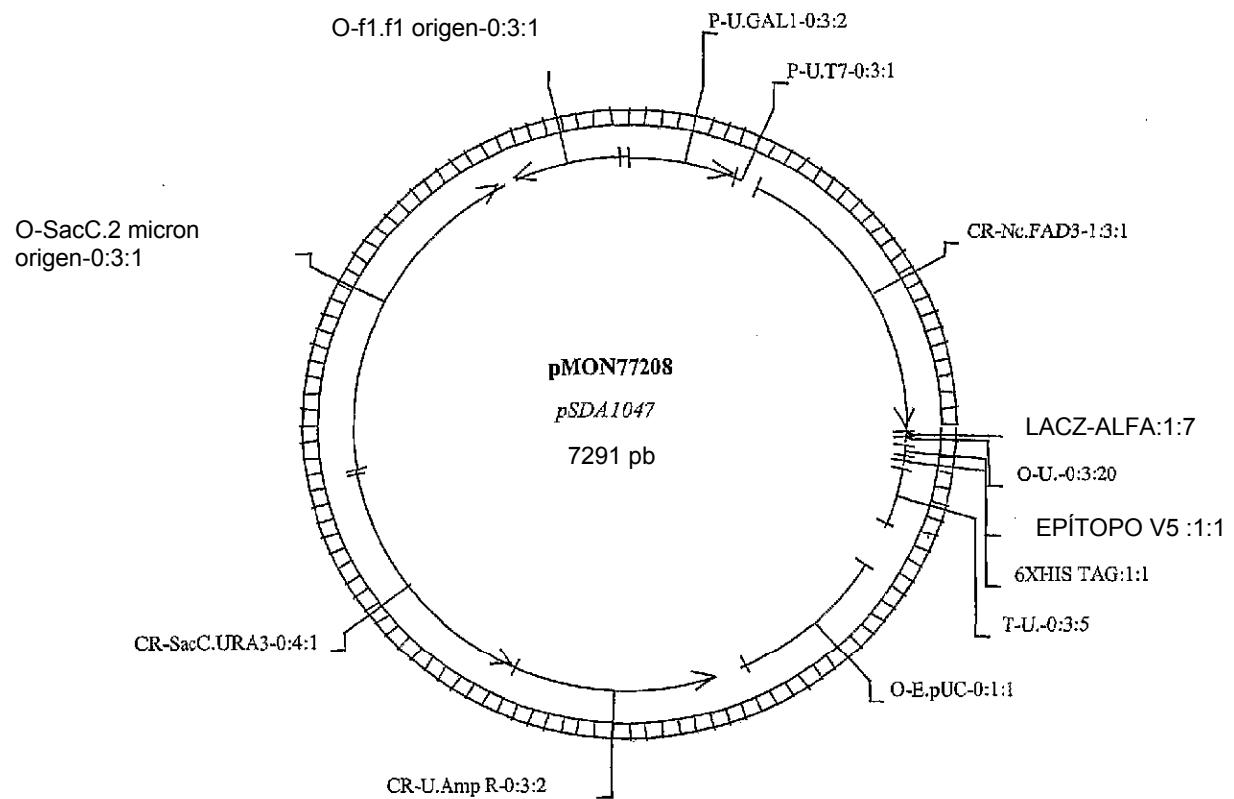


FIG. 2

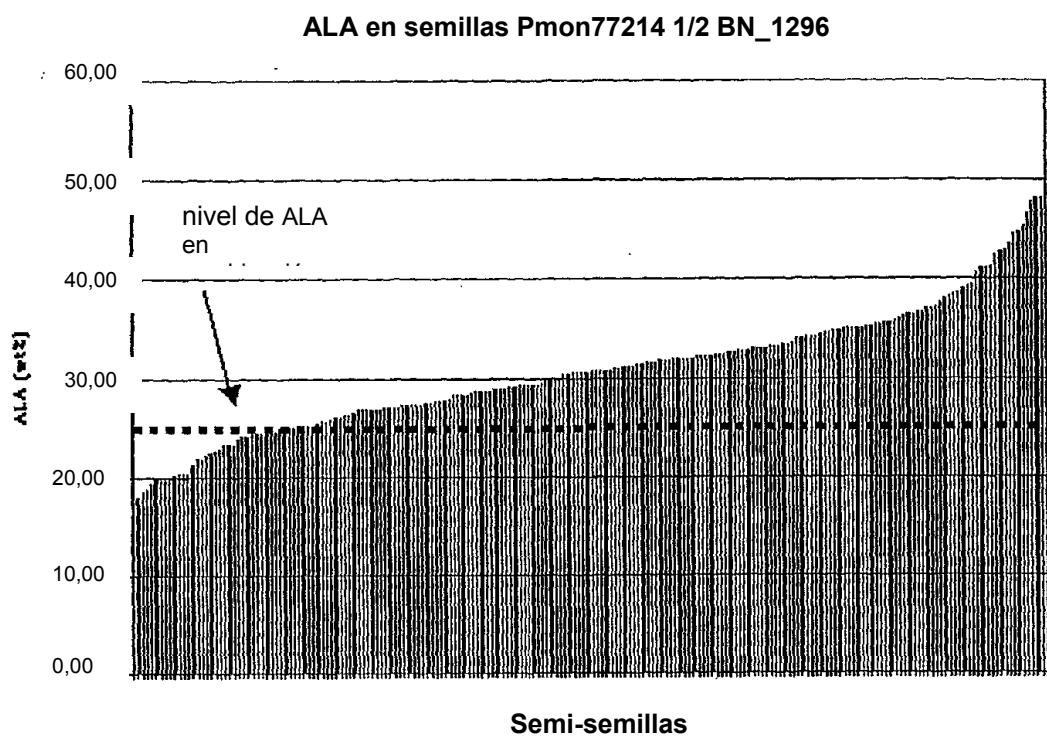


FIG. 3

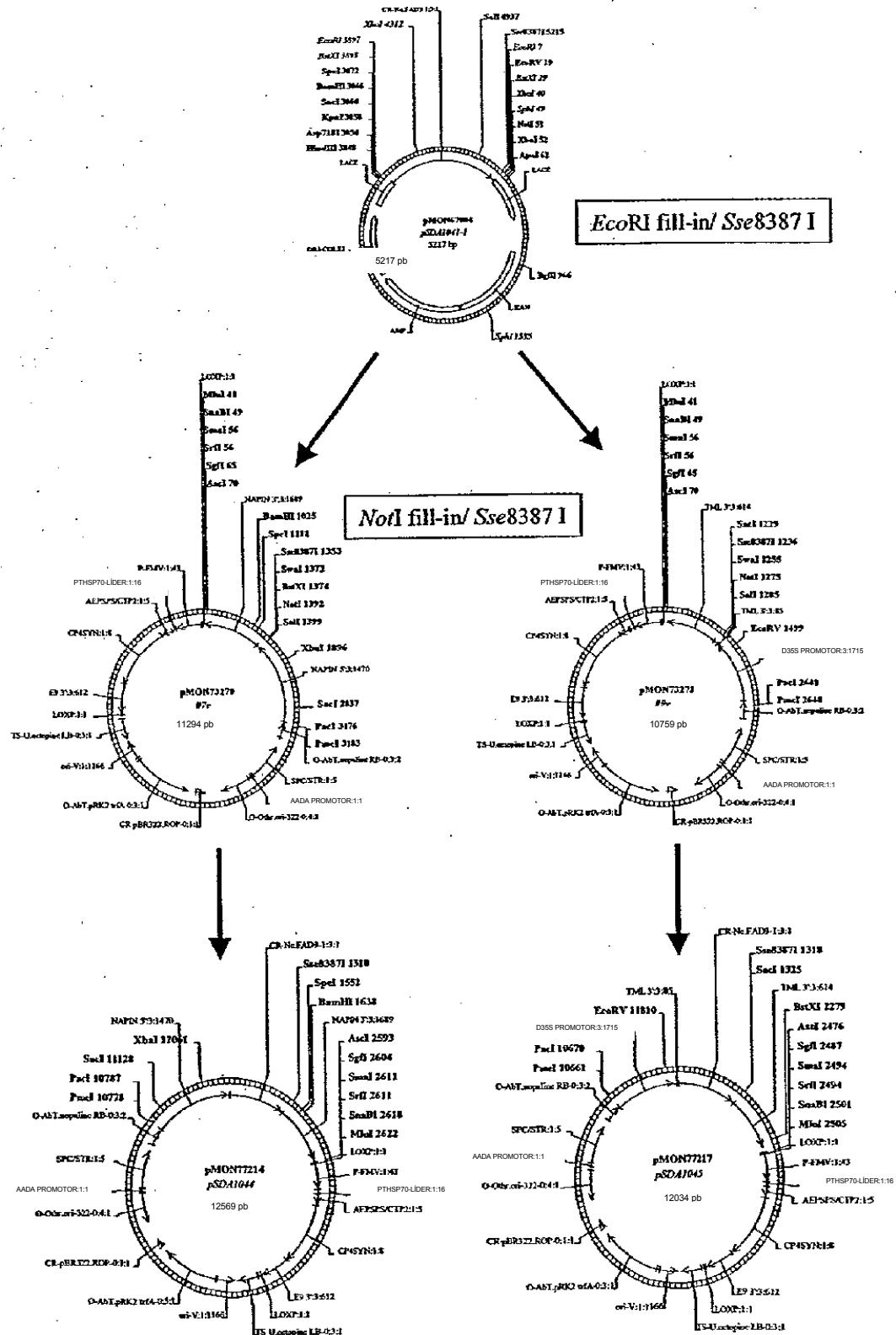


FIG. 4

ES 2 542 420 T3

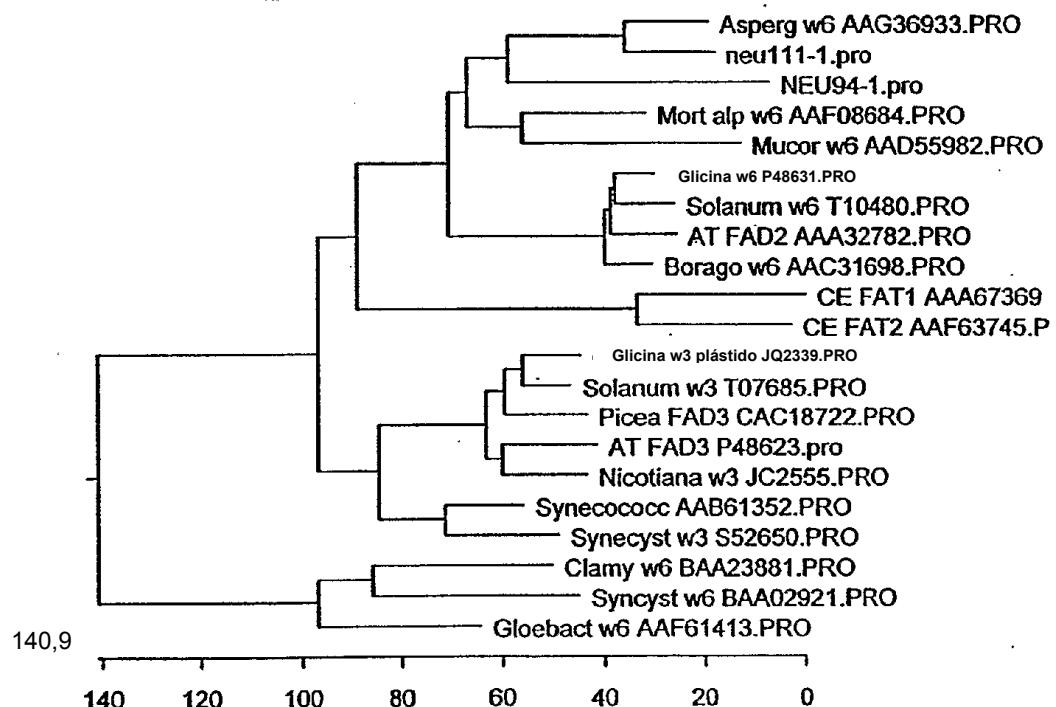


FIG. 5

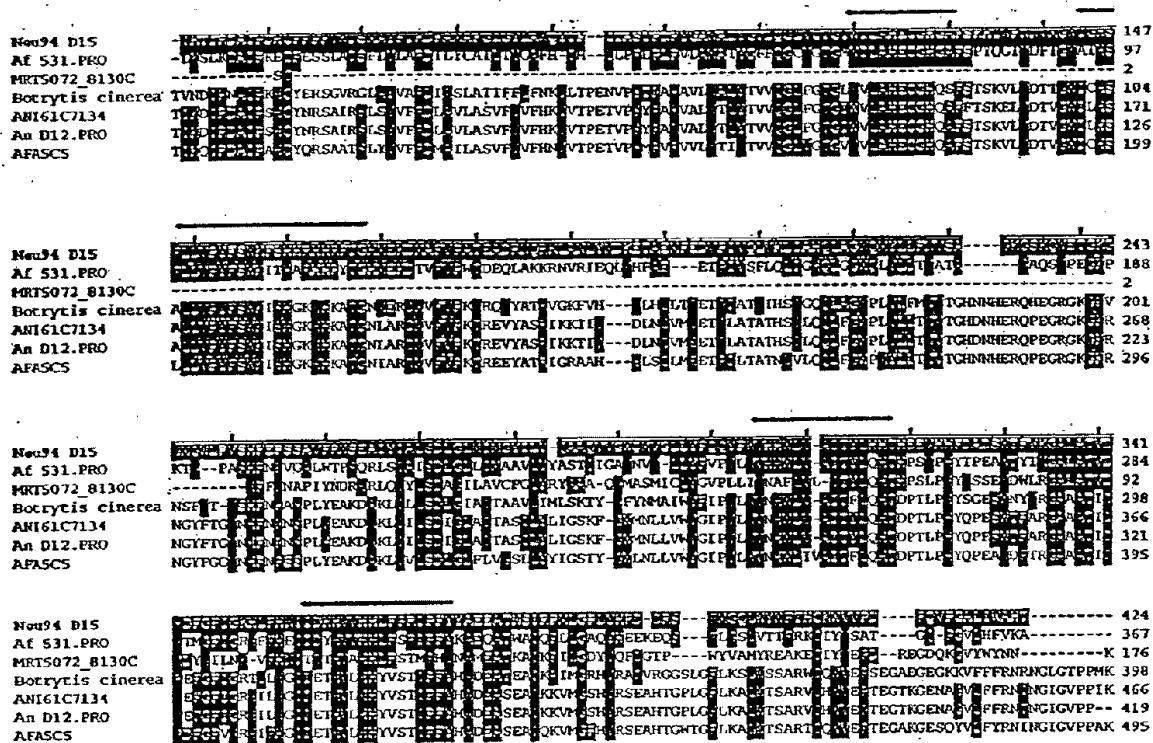


FIG. 6

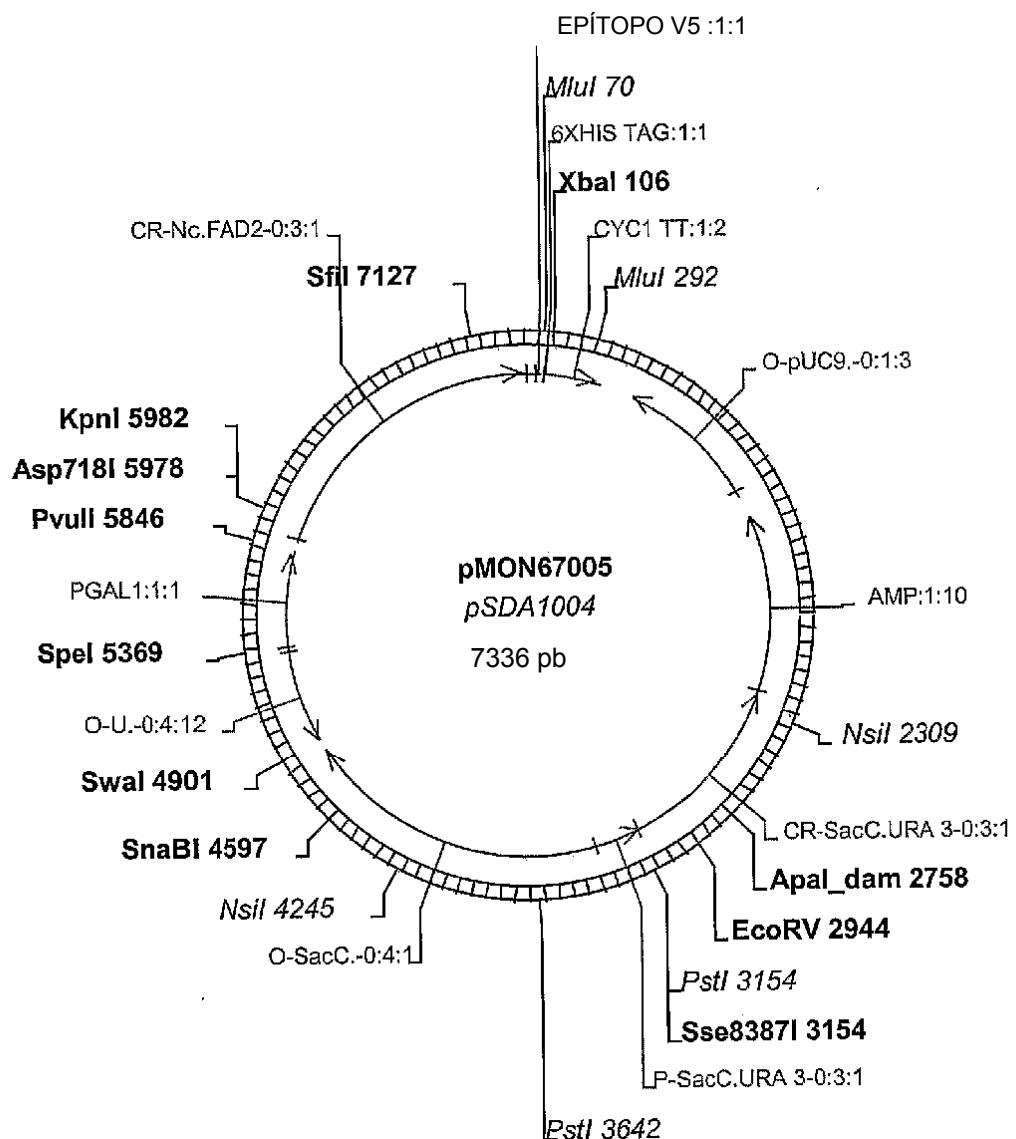


FIG. 7A

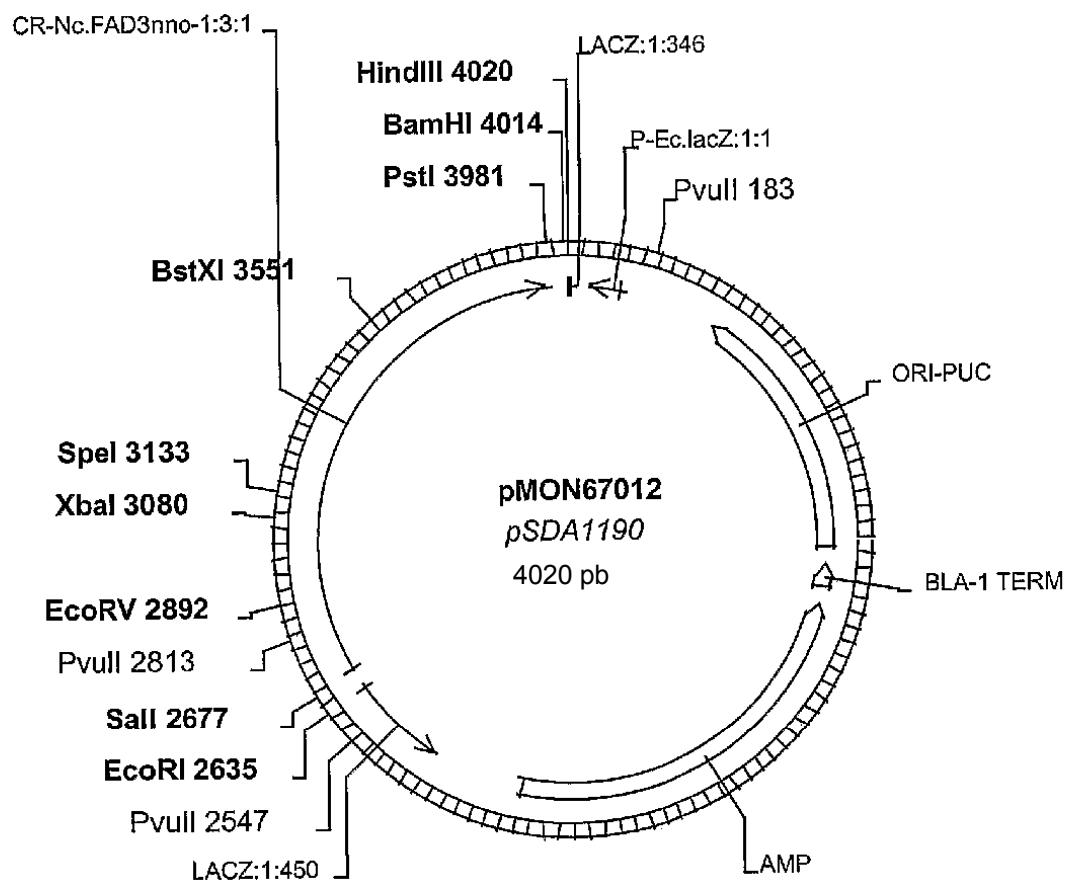


FIG. 7B

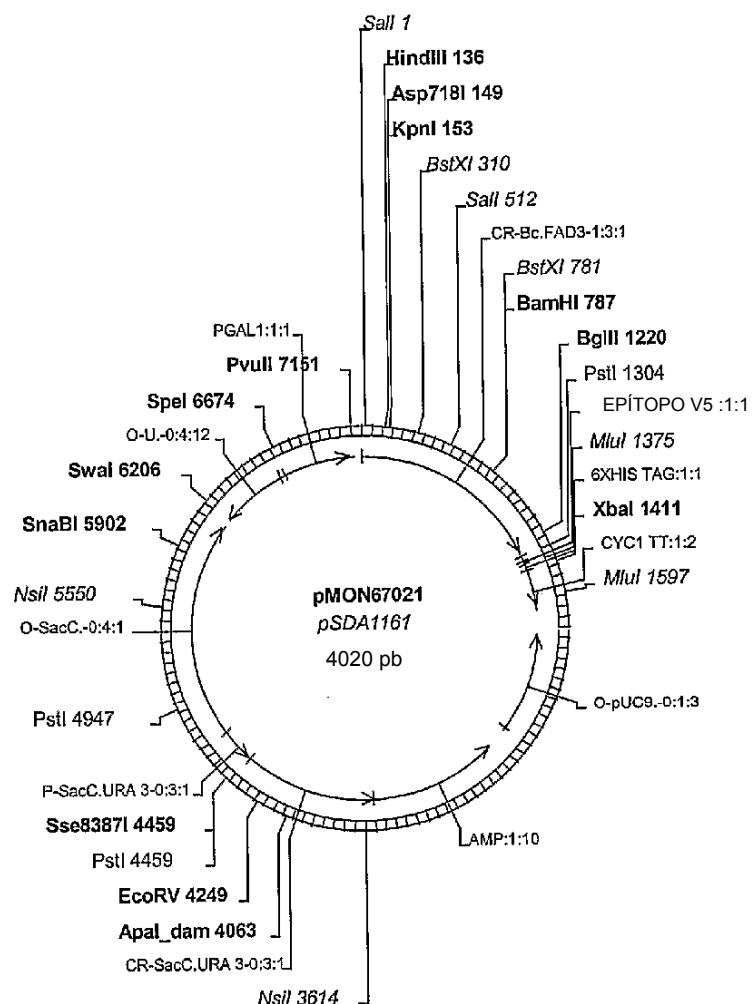


FIG. 7C

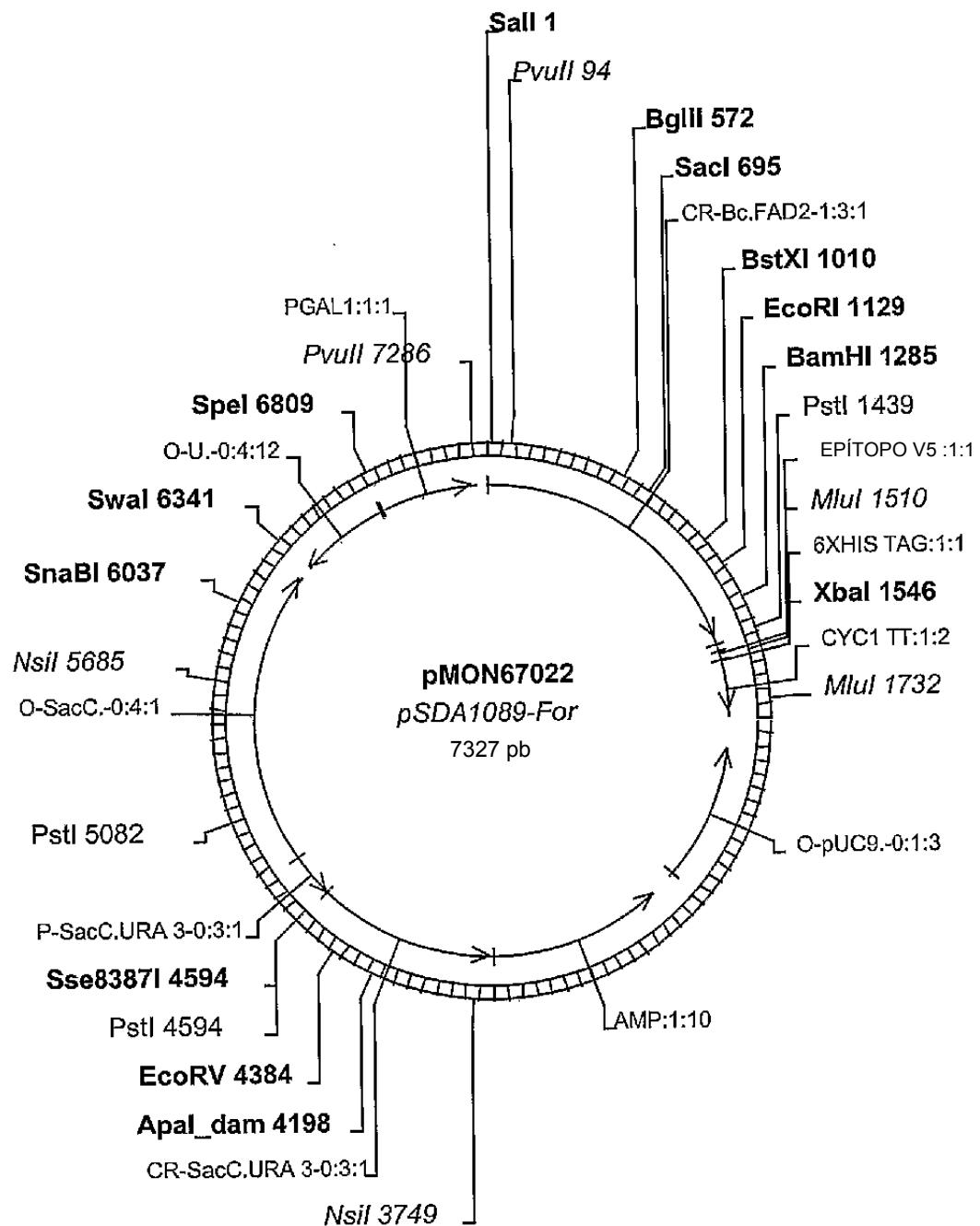


FIG. 7D

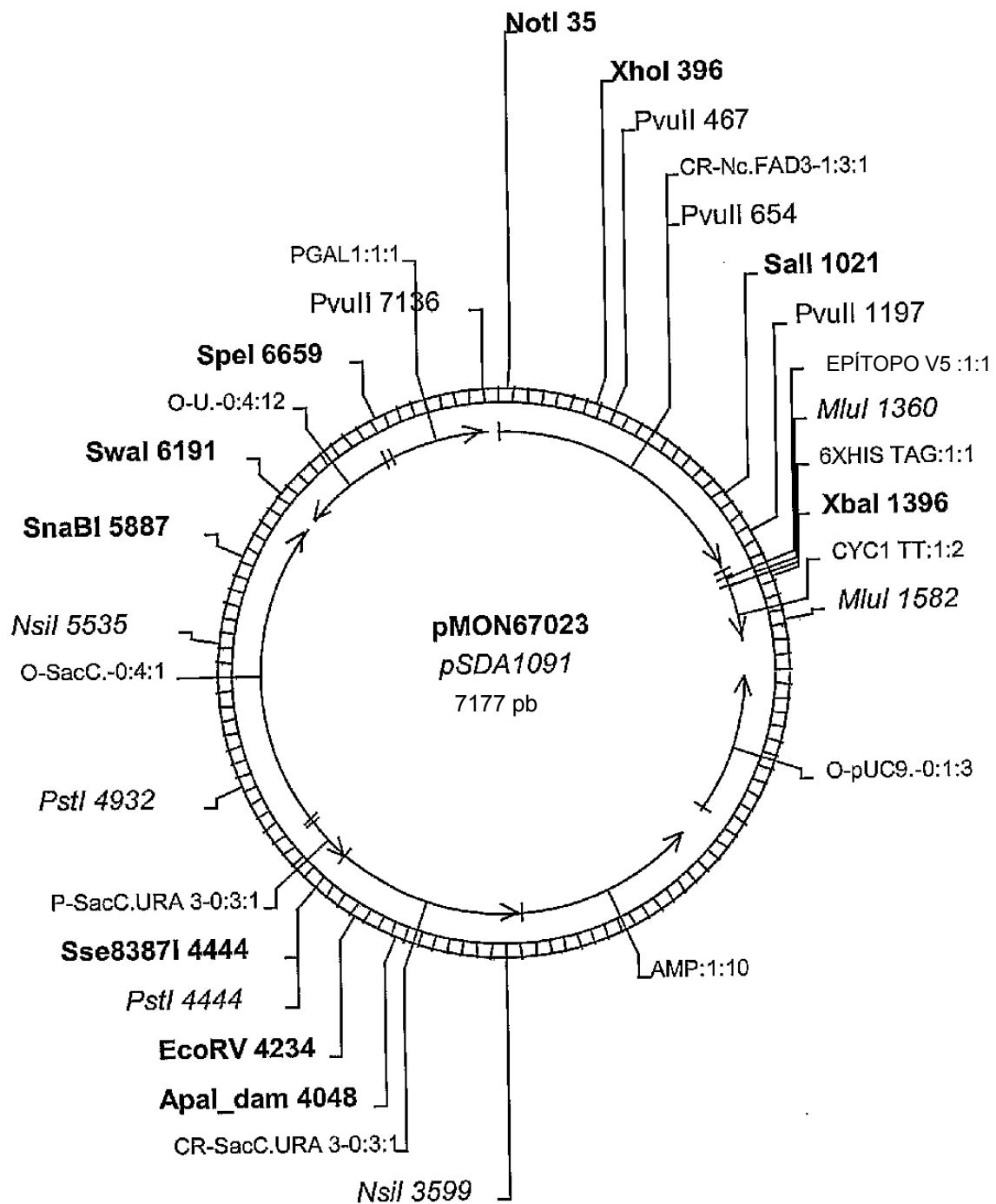


FIG. 7E

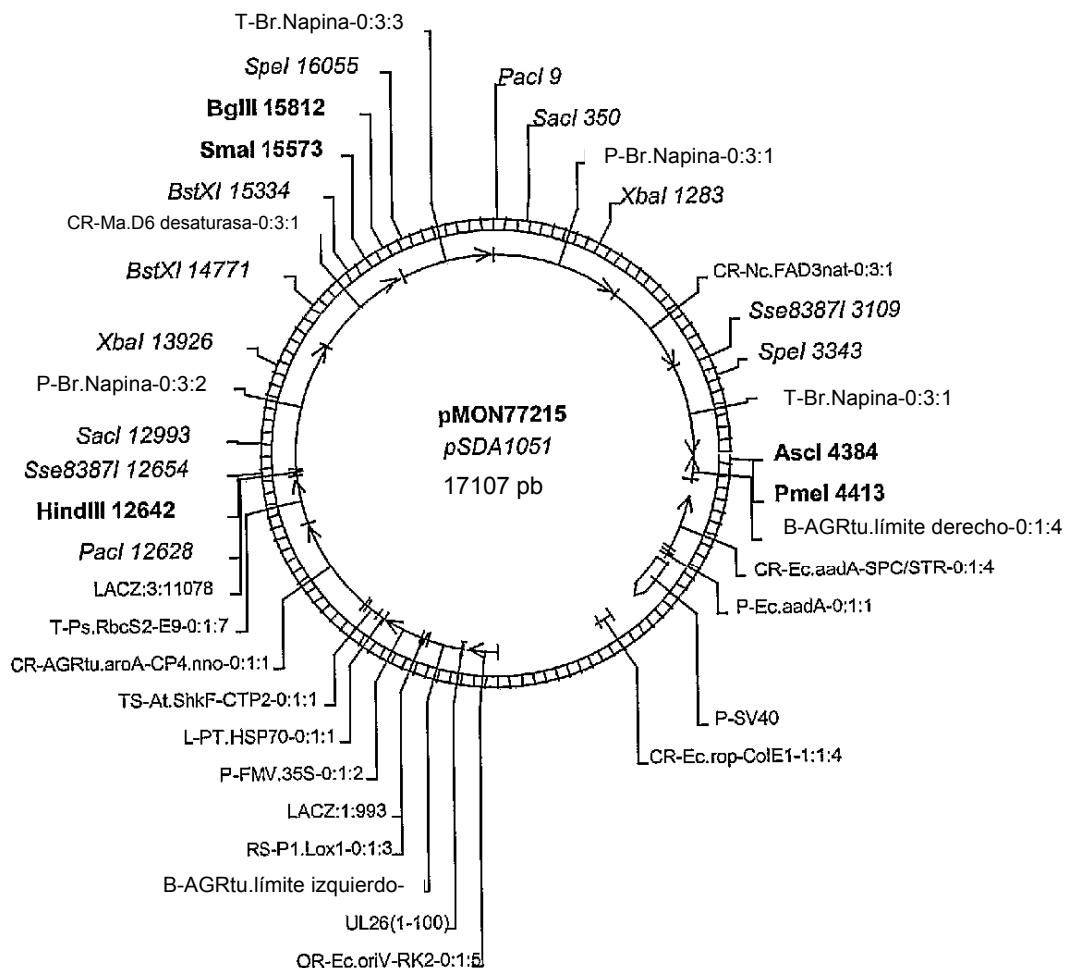


FIG. 7F

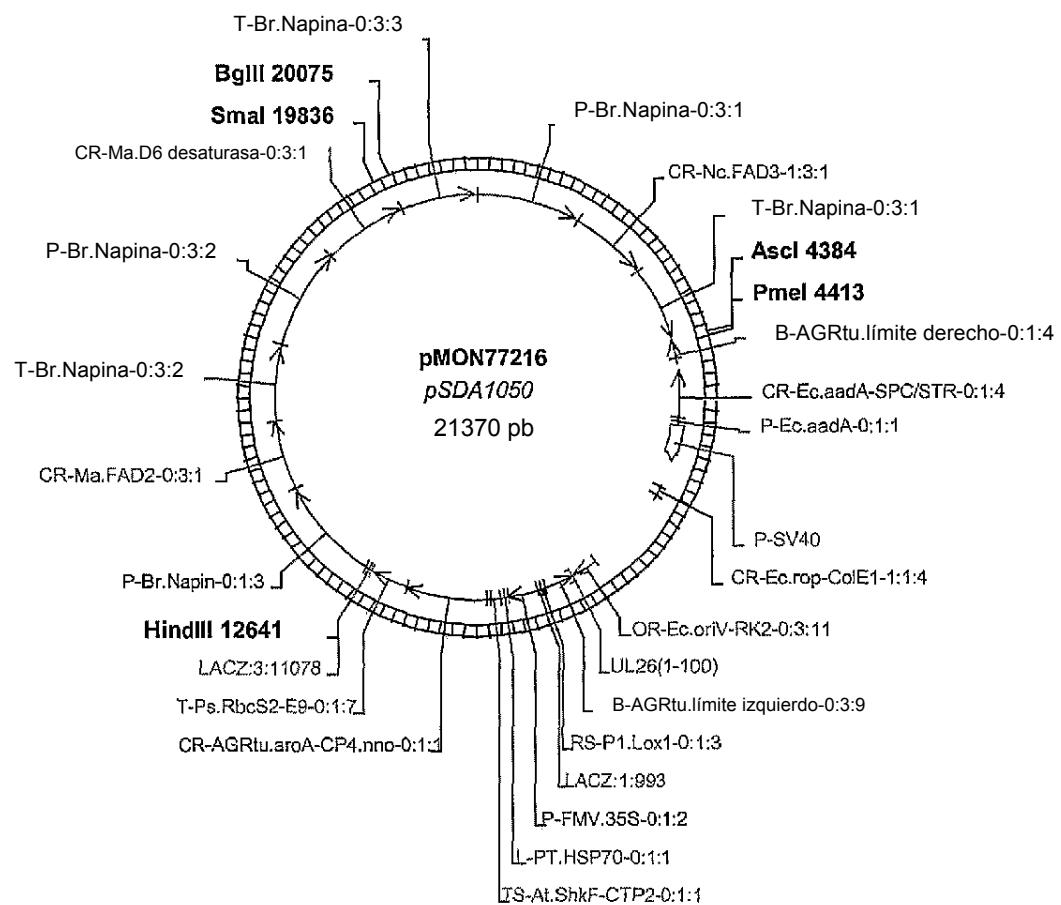


FIG. 7G