

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: **Desaturasas 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"), ejemplificados por ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:4, n-3), y los ácidos grasos omega-6 (también representados como ácidos grasos "n-6"), ejemplificados por ácido araquidónico (ARA, 20:4, n-6). Los PUFA son componentes importantes de la membrana plasmática de la célula y el tejido adiposo, donde pueden encontrarse en 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.

- 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 Los PUFA, tales como ácido linoleico (LA, 18:2, Δ 9, 12) y ácido α -linolénico (ALA 18:3, Δ 9, 12, 15), se consideran 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 fluidez a las membranas y funcionan como precursores de eicosanoides biológicamente activos tales como prostaglandinas, prostaciclina, y leucotrienos, que regulan las funciones fisiológicas normales.

- 45 En mamíferos, la formación de LC-PUFA está limitada en velocidad por la etapa de Δ 6 desaturación, que convierte LA en ácido γ -linolénico (GLA, 18:3, Δ 6, 9, 12) y ALA en SDA (18:4, Δ 6, 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 Δ 6 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.

- 55 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 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.

Las fuentes naturales de PUFA también están sometidas a incontrolables fluctuaciones de disponibilidad. Las reservas de peces pueden experimentar variación natural o pueden agotarse por sobrepesca. Además, incluso con evidencias abrumadoras de sus beneficios terapéuticos, las recomendaciones 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, 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, que depende principalmente de las reservas de pescado salvaje para la alimentación acuícola (Naylor y col., 2000).

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

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

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 $\Delta 15$ -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 $\Delta 6$ desaturasa, cuando se co-expresa con un ácido nucleico que codifica una $\Delta 15$ desaturasa, actúe sobre el ALA, produciendo de ese modo niveles superiores de SDA. A causa de la multitud de usos beneficiosos para SDA, existe la necesidad de crear un aumento sustancial en la producción de SDA. Se han buscado ácidos nucleicos de diversas fuentes para 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 *Caenorhabditis elegans* (Meesapyodsuk y col., 2000) no es ideal para la producción comercial de aceites vegetales enriquecidos de semilla.

Se han aislado ácidos nucleicos que codifican $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa conocido y secuencias de aminoácidos frente a bases de datos de ADN de *Aspergillus* y *Neurospora* no han producido $\Delta 15$ -desaturasas.

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 $\Delta 6$, $\Delta 12$, y $\Delta 15$) la enzima inicial, $\Delta 6$ -desaturasa, tiene baja actividad en seres humanos y es limitante de la velocidad. Las evidencias de que la $\Delta 6$ desaturasa es limitante de la velocidad se proporcionan por estudios que demuestran que la conversión de su sustrato, ALA, es menos eficaz que la conversión de su producto, SDA en EPA en ratones y ratas (Yamazaki y col., 1992; Huang, 1991).

En base a estos estudios, se observa que en cultivos oleaginosos comerciales, tales como canola, soja, maíz, girasol, cártamo, 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 $\Delta 6$ y $\Delta 12$, y una enzima que tiene actividad $\Delta 15$ -desaturasa. Los aceites derivados de plantas que expresan niveles elevados de $\Delta 6$, $\Delta 12$, y $\Delta 15$ -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 puede 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 $\Delta 15$ -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 estearidónico.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido capaz de desaturar una molécula de ácidos graso en el carbono 15 ($\Delta 15$ -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 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 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); LeuLeuValProTyrPheSer-TrpLys (LLVPYFSWK) (SEC ID N.º: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); TrpValHisHisTrpLeuValAlaIleThrTyr-Leu(His/Gln)HisThrHis (WVHHWLVAITY-L(H/Q)HTH) (SEC ID N.º:11); AlaIleThrTyrLeu(His/Gln)HisThr (AIT-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.

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 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 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 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.

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 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 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 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

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 u 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.

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.

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.

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

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 $\Delta 15$ -desaturasa fúngica NcD15D en un casete pCR2.1 (pMON67004).

La FIG. 2 muestra la región codificante de la $\Delta 15$ -desaturasa fúngica NcD15D en el vector de expresión de levaduras pYES 2.1 (pMON77208).

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 $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*.

La FIG. 6 muestra una alineación de secuencia de polipéptidos desaturasa ejemplares respecto a la $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*.

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

Descripción detallada de la invención

La invención supera las limitaciones de la técnica previa proporcionando procedimientos y composiciones para la creación de plantas con contenido mejorado de PUFA. 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 conteniendo también al mismo tiempo un contenido beneficioso de ácido oleico.

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 desaturasa fúngicas y, en particular, puede codificar una $\Delta 15$ -

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

Los análisis de la K_m y la actividad específica de un polipéptido en cuestión pueden considerarse en la determinación de la idoneidad de un polipéptido dado para modificar la producción, nivel o perfil de PUFA en una célula huésped dada. El polipéptido usado en una situación particular es uno que típicamente puede funcionar en las condiciones presentes en la célula huésped pretendida, pero por lo demás puede ser cualquier polipéptido 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 N° 3 y codificada por la secuencia de nucleótidos en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 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 N° 3 tiene un punto isoelectrico 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 promotora

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).

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 desaturasa 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.

Pueden proporcionarse construcciones de ácido nucleico que se integran en el genoma de una célula huésped o se replican de forma autónoma (por ejemplo, se replican de forma episómica) en la célula huésped. Para la producción de ALA y/o SDA, los casetes de expresión (es decir, un polinucleótido que codifica una proteína que está unida de forma funcional a una o más secuencias de ácido nucleico que dirigen la expresión del polinucleótido) generalmente usados incluyen un casete 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.

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, cósmidos o virus. También se contemplan vectores lanzadera, por ejemplo (Wolk y col. 1984; Bustos y col., 1991) de acuerdo con la presente invención. Pueden encontrarse revisiones de vectores y procedimientos para prepararlos y usarlos en Sambrook y col. (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.

Los polinucleótidos que codifican desaturasas pueden colocarse bajo el control transcripcional de un promotor fuerte. 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 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 acilo 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 -conglucina de soja ha demostrado se 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 *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.

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 heliantina, napina, o glicina 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 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.

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

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 miríada de manuales de laboratorio sobre tecnología de ADN recombinante que están ampliamente disponibles. Está disponible una diversidad de estrategias para ligar fragmentos de ADN, la elección de los cuales depende de la naturaleza de los extremos de los fragmentos de ADN. Se contempla adicionalmente de acuerdo con la presente

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 transcrito $\Delta 6$ 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 transcrito 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 transcrito. 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 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 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 construcción que puede integrarse en el genoma huésped o que se replica de forma autónoma en la célula huésped. La expresión estable del gen de interés puede seleccionarse a través del uso de un marcador de selección localizado en o transfectado con la construcción de expresión, seguido de selección de células que expresan el marcador. Cuando la expresión estable resulta de la integración, la integración de construcciones puede suceder aleatoriamente dentro del genoma huésped o puede dirigirse a través del uso de construcciones que contienen regiones de homología con el genoma huésped suficiente para dirigir la recombinación con el locus huésped. Cuando las construcciones están dirigidas a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y la traducción pueden proporcionarse por el locus endógeno.

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

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

Cuando es necesario para la transformación, la secuencia codificante de $\Delta 15$ -desaturasa de la presente invención puede insertarse en un vector de transformación de plantas, por ejemplo el vector binario descrito por Bevan (1984). Los vectores de transformación de plantas pueden obtenerse modificando el sistema de transferencia génica natural de *Agrobacterium tumefaciens*. El sistema natural comprende plásmidos Ti grandes (que inducen tumores) que contienen un gran segmento, conocido como ADN T, que se transfiere a plantas transformadas. Otro segmento del plásmido Ti, la región vir, es responsable de la transferencia del ADN T. La región de ADN T está limitada por repeticiones terminales. En los vectores binarios modificados los genes que inducen tumor se han delecionado y las funciones de la región vir se utilizan para transferir ADN foráneo limitado por las secuencias límite del ADN T. La región T también contiene un marcador de selección para la resistencia a antibióticos, y un sitio de clonación múltiple para insertar secuencias para transferencia. Dichas cepas modificadas por ingeniería son conocidas como cepas de *A. tumefaciens* "desarmadas", y permiten la eficaz transformación de secuencias limitadas por la región T en los genomas nucleares de plantas.

La presente invención encuentra muchas aplicaciones. Sondas basadas en los polinucleótidos de la presente invención pueden encontrar uso en procedimientos para aislar moléculas relacionadas o en procedimientos para detectar organismos que expresan desaturasas. Cuando se usan como sondas, los polinucleótidos u oligonucleótidos deben ser detectables. Esto habitualmente se consigue uniendo un marcador en un sitio interno, por ejemplo mediante incorporación de un resto modificado, o en el extremo 5' o 3'.

Dichos marcadores pueden ser directamente detectables, puede unirse a una molécula secundaria que está marcada de forma detectable, o pueden unirse a una molécula secundaria no marcada y una molécula terciaria marcada de forma detectable; este procedimiento puede prolongarse siempre que sea práctico para conseguir una señal satisfactoriamente detectable sin niveles inaceptables de señal de fondo. Los sistemas secundarios, terciarios, o de puente pueden incluir el uso de anticuerpos dirigidos contra cualquier otra molécula, incluyendo marcadores u otros anticuerpos, o pueden implicar moléculas cualesquiera que se unan entre sí, por ejemplo un sistema de

biotina-estreptavidina/avidina. Los marcadores detectables típicamente incluyen isótopos radiactivos, moléculas que producen 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 5.011.770. 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.

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 extracromosómico que tiene múltiples números de copia.

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

Es de particular interés la producción mediada por $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa, y preferentemente produce grandes cantidades de uno o más de los sustratos.

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.

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 $\Delta 15$ -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, 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. Como la descendencia de plantas transformadas hereda el polinucleótido que codifica $\Delta 15$ -desaturasa, pueden usarse las semilla o esquejes de plantas transformadas para mantener la línea de la planta transgénica.

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 $\Delta 15$ -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 $\Delta 6$ y/o $\Delta 12$ -desaturasa en las células vegetales. Dichas plantas pueden comprender también o no actividad $\Delta 6$ y/o $\Delta 12$ -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 $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa, o una $\Delta 15$ -desaturasa y una $\Delta 6$ -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 anti-inflamatorios o reductores de los niveles de colesterol.

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

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, deleciones, inserciones y mutaciones puntuales, o combinaciones de las mismas. Las sustituciones pueden hacerse en base a la hidrofobicidad o hidrofiliidad 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 deleción para determinar los límites N- y C-terminales de la proteína necesaria para la función, y después se hacen deleciones 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 mutagénesis de deleción se consigue, por ejemplo, usando exonucleasas para eliminar secuencialmente las regiones codificantes 5' o 3'. Están disponibles kits para dichas técnicas. Después de la deleción, la región codificante se completa ligando oligonucleótidos que contienen codones de inicio o parada a la región codificante delecionada después de la deleción 5' o 3', respectivamente. Como alternativa, se insertan oligonucleótidos que 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 deleciones internas pueden hacerse asimismo a través de una diversidad de procedimientos incluyendo el uso 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 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 deleccionarse, 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 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 plantas que comprende uno o más genes o ADNc de desaturasa. Secuencias codificantes ejemplares para su uso con la invención incluyen el gen de $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* NcD15D (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2). En ciertas realizaciones, también pueden emplearse secuencias antisentido de desaturasa con la invención. Ácidos 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 N° 1 o la SEC ID N° 2. En ciertos aspectos, un ácido nucleico puede codificar 1, 2, 3, 4, o más enzimas desaturasas. En realizaciones particulares, un ácido nucleico puede codificar una $\Delta 6$ y una $\Delta 15$ -desaturasa.

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.

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.

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

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 desee. El segmento de ADN o gen elegido para introducción celular a menudo codificará una

10 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.

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.

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

25 invención aquí descritas serán obvias para los especialistas en la técnica.

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

30 secuencias líder preferidas incluyen aquellas que comprenden secuencias predichas para dirigir la expresión óptima del gen unido, es decir, para incluir una secuencia líder consenso preferida que puede aumentar o mantener la estabilidad del ARNm y evitar el inicio inapropiado de la traducción. La elección de dichas secuencias será conocida para los especialistas en la técnica a la luz de la presente divulgación. Las secuencias que se obtienen de genes que se expresan altamente en plantas serán típicamente preferidas.

Las construcciones de transformación preparadas de acuerdo con la invención típicamente incluirán una secuencia

35 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 desee.

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

Se cree que los procedimientos adecuados para la transformación de células vegetales u otras células para su uso

55 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 (Kaeppeler 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

60

(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.

Después de realizar el suministro de ADN exógeno a las células destinatarias, las siguientes etapas generalmente conciernen a la identificación de las células transformadas para cultivo adicional y regeneración de la planta. Para mejorar la capacidad de identificar transformantes, se puede desear el empleo de un gen marcador de selección o exploración con un vector de transformación preparado de acuerdo con la invención. 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.

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 medios 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 señalará el momento para la transferencia a medio que carezca de reguladores del crecimiento.

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.

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

Como se ha expuesto anteriormente, puede introducirse un gen de desaturasa seleccionado en una variedad de planta particular 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.

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

La introgresión de un elemento de ADN en un genotipo vegetal se define como el resultado del procedimiento de conversión por retrocruzamiento. Un genotipo vegetal en que se ha introducido por introgresión una secuencia de ADN puede mencionarse como genotipo, línea, endogámico, o híbrido convertido por retrocruzamiento. Asimismo un

genotipo vegetal que carece de la secuencia de ADN deseada puede mencionarse como genotipo, línea, endogámico, o híbrido no convertido.

Ejemplos

5 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

10 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

20 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 $\Delta 12$ y $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*

25 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 $\Delta 12$ -desaturasa (Nc111F2 y Nc111R3) y la putativa $\Delta 15$ -desaturasa (Nc94F6 y Nc94R8). Los cebadores directos se diseñaron para incluir tres nucleótidos 5' del sitio de inicio Met

30 Nc111F2: 5'-AAGATGGCGTCCGTCTCCTCTGCCCTTCCC-3' (SEC ID N° 15)

Nc111R3: 5'-TTAGTTGGTTTTGGGGAGCTTGGCAGGCTTG-3' (SEC ID N° 16)

Nc94F6: 5'-GCGGCCGCAACATGACGGTCACCAACCCGCAGCCA-3' (SEC ID N° 17). El sitio NotI añadido al extremo 5' del oligonucleótido está en cursiva.

35 Nc94R8: 5'-CCTGCAGGTTACTGGGTGCTCTGAACGGTGTGCG-3' (SEC ID N° 18). El sitio Sse8387I añadido al extremo 5' del oligonucleótido está en cursiva.

40 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.

45 Cuando se comparan con otras $\Delta 12$ y $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa (NcD15D) se dan en la SEC ID N° 2 y la SEC ID N° 3, respectivamente, y el clon genómico se da en la SEC ID N° 1. Se digirió pMON67004 con EcoRI y se ligó en el sitio EcoRI 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 Sse8387I. El fragmento génico se ligó en el vector binario, pMON73270, que se digirió por NotI, seguido por una reacción de relleno, y después por Sse8387I. Esto dio lugar al vector pMON77214 (FIG. 4) en que el gen de $\Delta 15$ -desaturasa, NcD15D, estaba bajo la regulación del promotor específico de semilla de Napina. El fragmento de ADN digerido con EcoRI/Sse8387I 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.

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 $\Delta 12$ y $\Delta 15$ -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 $\Delta 12$ -desaturasa (NcD12D) se dan en la SEC ID N° 39 y la SEC ID N° 40, respectivamente.

Ejemplo 4

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 ($\Delta 9,12$ -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.

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 μ g 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 (Supelcomega; 50 m x 0,25 mm, d.i., Supelco, Bellefonte, PA).

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 $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -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 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$. 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 N_2 . 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 espectinomicina (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.

Para seleccionar los transformantes, la semilla se colocó en medio agar que contenía 50 mg/l de glifosato. Los plántones 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***

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

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

Para evaluar la especificidad funcional del clon 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

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

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 $\Delta 15$ -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.

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 $\Delta 15$ -desaturasa de *A. nidulans* y las secuencias de $\Delta 12$ y $\Delta 15$ -desaturasa de *B. cinerea*

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 $\Delta 15$ -desaturasa (AnD15-F1 y AnD15-R1). El cebador directo se diseñó para incluir tres nucleótidos 5' del sitio de inicio Met.

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

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

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 $\Delta 12$ -desaturasa de *B. cinerea*. El cebador degenerado D15D-R9 se diseñó para amplificar cualquier $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa putativa de *B. cinerea*.

BcD12F1: 5'-GTCGACACCATGGCCTCTACCACTGCTCTC-3', 5' end contains Sall - 3' SEC ID N° 25

BcD12R1: 5'-CTGCAGTGCCTTGAGCTTCATTGGTGGTGTA-3', 5' end contains PstI SEC ID N° 26

D15D-R9: 5'-GCCRTGNCCRCAYTCRTGNGCNAGDAT-3' SEC ID N° 27

BcD15-F1: 5'-ACGATGACTCTCGATTACACAAGTCACCCG-3' SEC ID N° 28

BcD15F3: 5'-GTCGACACGATGACTCTCGATTACACAAGTCACC-3', 5' end contains Sall SEC ID N° 29

BcD15R1: 5'-CTGCAGAATGCTTGAGCTATCAGCAGATCCCAA-3', 5' end contains PstI SEC ID N° 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 $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa (AnD15D) se dan en la SEC ID N° 4 y la SEC ID N° 5, respectivamente.

Se amplificó un ADNc que codifica la $\Delta 12$ -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 $\Delta 12$ -desaturasa (BcD12D) se dan en la SEC ID N° 31 y la SEC ID N° 32, respectivamente.

Para clonar una $\Delta 15$ -desaturasa de *B. cinerea* se generó un oligonucleótido degenerado basado en una alineación de secuencia de aminoácidos de las $\Delta 12$ y $\Delta 15$ -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

fabricante. Después de la síntesis del ADNc, se amplificó el extremo 5' de un ADNc de una putativa $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasas fúngicas. Se usó una reacción 3'-RACE para amplificar 664 pb del extremo 3' de la putativa $\Delta 15$ -desaturasa de *B. 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 $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa (BcD15D) se dan en la SEC ID N° 33 y la SEC ID N° 34, respectivamente.

Para evaluar la actividad $\Delta 15$ -desaturasa de la putativa AnD15D en el ensayo de expresión en levaduras, a la levadura que expresa la putativa $\Delta 15$ -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 $\Delta 15$ -desaturasa de *N. crassa*, pMON67023, con la de la $\Delta 15$ -desaturasa de *A. nidulans*, se muestran en la Tabla 5. pMON67023 (FIG. 7E) se construyó del siguiente modo:

Nc94F2: 5'-AACATGACGGTCACCAACCCGCAGCCACAAG-3' SEC ID N° 35

Nc94R2: 5'-CTGGGTGCTCTGAACGGTGTGCGCCCAAT-3' SEC ID N° 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 epítipo V5 y la región 6-His contenidos en el vector de expresión pYES2.1.

TABLA 5 Producción de ALA por $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* y $\Delta 15$ -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 (conglucina, glicina, 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
- 10 algoritmo patentado para generar las secuencias finales de codones optimizados con la más baja energía libre para 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

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

- 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 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
- 20 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 $\Delta 12$ 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 $\Delta 12$ -desaturasa de *Mortierella alpina* (por ejemplo, las últimas 51 pb de la SEC ID N° 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.

5

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 $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* en combinación con las $\Delta 6$ y $\Delta 12$ -desaturasas de *M. alpina*, se volvieron a transformar líneas homocigóticas para la construcción pCGN5544 (que contiene las $\Delta 6$ y $\Delta 12$ -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 aprox.) de semillas R ₁ 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 $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* en combinación con la $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina*

- Se evaluó la actividad de la $\Delta 15$ -desaturasa de *Neurospora crassa* en combinación con la $\Delta 6$ -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 digiriendo pCGN5536 (patente de EE. UU. n.º 6.459.018 B1), que contiene el promotor de Napina dirigiendo la expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa de *M. alpina* (MaD6D), con NotI y después ligando el fragmento del casete de expresión en el sitio NotI del vector binario, pMON70660, para formar pMON77212. El plásmido pMON77215 se construyó digiriendo pMON77214 con PmeI y Ascl y después ligando el fragmento del casete de expresión de Napina-NcD15D resultante en los sitios SwaI 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	11,45	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	Ácido graso (porcentaje en peso)					
	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_G 1860-32	2,31	56,01	5,09	4,34	9,93	15,47
BN_G 1860-33	2,18	55,92	8,83	4,06	5,46	15,54
BN_G 1860-34	2,38	54,85	8,52	4,01	5,76	15,56
BN_G 1860-35	1,99	58,89	4,14	2,09	9,74	15,58
BN_G 1860-36	2,87	55,91	6,55	2,8	7,37	15,66
BN_G 1860-37	2,35	53,18	8,89	4,73	6,45	15,71
BN_G 1860-38	3,15	51,6	10,29	4,85	5,68	15,78
BN_G 1860-39	2,31	55,68	6,08	4,52	7,81	15,92
BN_G 1860-40	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_G 1860-42	2,33	53,62	6,48	5,35	7,97	16,62
BN_G 1860-43	2,37	57,86	5,24	2,81	7,32	16,77
BN_G 1860-44	2,04	51,3	11,41	5,03	5,09	16,94
BN_G 1860-45	2,1	53,32	8,75	4,04	6,44	17,12
BN_G 1860-46	2,14	53,01	6,85	4,3	7,82	17,16
BN_G 1860-47	2,42	50,96	7,83	4,13	7,91	17,44
BN_G 1860-48	1,94	49,97	10,64	4,78	5,74	17,84
BN_G 1860-49	1,46	55,32	4,57	2,67	9,98	18
BN_G 1860-50	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 N° 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 N° 2 se sustituye con una treonina cambiando la primera base del segundo codón (posición 4 en la SEC ID N° 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 N° 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 Buising 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 Sones, 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.

- Hensgens 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 Guala, *Plant Mol. Biol.*, 12:579-589, 1989.
- 10 Ikuta y col., *Bio/technol.*, 8:241-242, 1990.
- Ishidia 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 Kaeppler y col., *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Kaeppler 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) pág. 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	gttttcctcc	catcaccaat	ttctttttct	gaaagaggtg	tgtcgagtgt	60
gagttgaacc	tcaggtcttc	ttccacacta	cctctaccct	cctcttccta	ccctctttct	120
tcacttcttg	gatatactca	agaaatatca	ccacacccaa	caaacatgac	ggtcaccacc	180
cgcagccaca	aggccgcggc	cgccaccgag	cccagaggtg	tcagcaccgg	cgttgacgcc	240
gtctctgctg	ctgctccctc	ctcctcctcc	tcctcttcca	gccaaaagtc	ggccgagccc	300
atcgaatacc	ccgacatcaa	gaccatccgc	gaagccatcc	ccgaccactg	cttccgcccc	360
cgcgtctgga	tctccatggc	ctacttcata	cgcgaacttg	ccatggcctt	tggcctcggc	420
tacctcgctt	ggcagtagat	ccccctgata	gcctccaccc	cgcctccgta	cggcgcctgg	480
gctctgtacg	gctacctcca	gggtctcgtc	tgcacgggca	tctggattct	ggcgcacgag	540
tgcggccacg	gcgcctttct	gaggcacacg	tgggttcaaca	acgtcatggg	gtggattggc	600
cactccttcc	tcttggtccc	ttacttcagc	tgggaagttca	gccaccatcg	ccaccatcgc	660
ttcacccggc	acatggagaa	ggacatggcg	tttgtgcctg	ccaccgaggg	tgatcgcaac	720
cagaggaagc	tggccaactt	gtacatggac	aaggagacgg	ccgagatgtt	tgaggatgtg	780
cccattgtcc	agctcgtcaa	gctcatcgcc	caccagctgg	ccggctggca	gatgtacctc	840
ctcctcaacg	tctccgcggg	taagggcagc	aagcagtggg	agactggcaa	ggcggcgcatg	900
ggctgggtga	gggttagcca	ctttgagcct	tcctctgctg	tgttccgcaa	ctccgaggcc	960
atctacattg	ccctgtccga	tcttggtctc	atgatcatgg	gctatatcct	ctaccaggcc	1020
gcgcaggttg	tgggtggca	gatggtaggt	ctgctgtact	tccagcagta	cttctggggtt	1080
caccattggg	tgggtaagtt	gtctctcgcc	catttcgcct	ctgtctgggtg	gttcttgtga	1140
tctttgtgga	attagcgcac	taactctcgc	tcctcttcaa	aacagtcgcc	atcacttacc	1200
tccaccacac	ccacgaggaa	gtccaccact	ttgacgccga	ctcgtggacc	ttcgtcaagg	1260
gcgctctcgc	caccgtcgac	cgcgattttg	gcttcattgg	caagcacctc	ttccacaaca	1320
ttatcgacca	ccacgtcgtc	caccacttgt	tcctgtaagt	cttcagatca	gatatacctg	1380
ctattttctc	atttaaaacc	atcccttcaa	tgtccctcgc	taacgccccca	aatcctgcac	1440
agtcgcatcc	ccttctacta	cgcgaagaa	gccaccaact	cgatccgccc	catgctcggc	1500
cccctctacc	accgcgacga	ccgctccttc	atggggccagc	tgtggtacaa	cttcaccac	1560
tgcaagtggg	tgttccgga	ccccaggtc	cccggcgcgc	ttatttgggc	gcacaccgtt	1620
cagagcacc	agtaagcagt	tcttttctgc	tcctggggc	actctgagga	ggctacctac	1680
ctacctaggt	actcgagtgc	tggctgctgc	cctgggttag	tgctacctac	ttcggtagct	1740
ctaaccggta	ccagaagaac	gatgttggaa	aaaaggaggg	agaaagactg	gaagaaaagg	1800
aaaacaaaga	aatctcaact	cttcttcatg	attgatggat	ctgtgccacg	ttctgattgg	1860
ttcggtcggg	caaaaggcgt	acataacggg	caccattgaa	aggtctggat	aactcgggtac	1920
ctggaatttc	acatcaaaca	agtgatagac	gagagagaga	gtctggtaga	atagagggtat	1980
ggtagatctg	gaagctatta	gacttactag	agctatagat	agacaaagag	gatagagcga	2040
gggtatgtgt	gtgtagaggt	agagatgcat	catagaaggg	agggcatgca	tgcattgattg	2100
aagaacaaaa	agaatgatac	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 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	
ggc 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 gac atg gcg ttt	528
His Arg His 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	ggc	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	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	ggc	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	ggc	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				

<210> 3

<211> 429

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 3

Met	Thr	Val	Thr	Thr	Arg	Ser	His	Lys	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	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	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	75	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	155	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	235	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	315	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	395	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 agc 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 ccg 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 ccg 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 ccgtctctc tgcccttccc 30

<210> 16

15

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

20

<400> 16

ttagttgggt 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 gcca 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

10 His His Arg His His Arg Tyr Thr Thr
 1 5

<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

ES 2 542 420 T3

	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														
	ttcgcctttg gcaccctct 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 ttgagcttca 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 caytcrtgng 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 tgactctcga 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

<400> 31

```

atggcctcta ccactgctct cccaaagcgc accgcccgttc aaagaacggt gacctcctcc 60
actgccgaat cagctccctc gacagctgcc ggttccccc atgatacccc aagacaatcc 120
ccctcgtcta cttctctgtc atctatgtca tctctaggcg aagatgttaa gagcaccaag 180
ccatatggca aactcatcga tacttacgga aacgaatttg agcttccaga ttataccgtc 240
aatgacatcc gtaacgcaat tccaaagcat tgttacgagc gatctggagt aaggggtttg 300
gcttatgttg ctgcgatat tgccagctta gccaccacat tcttcctctt caacaaatac 360
cttacaccag aaaacgttcc ctcaactyca gcgcgcgctg tgctgtgggc tttatacacc 420
gttggttcagg gtttgtttgg tactgggtctc tgggttcttg ctcatgagtg tggccatcaa 480
tctttctcga cttcaaaggc cttgaacgat acaactggat ggatctgcca ctctgctctt 540
ctcgtcccat acttttcatg gaagatctct caccggcaagc atcacaaagc tactggcaac 600
atggagcgtg atatggtttt cgttccaaag acccgtcaag attatgctac ccgcgtcggc 660
aagttcgttc atgagcttca cgagctcacc gaggagactc caatcgcaac tcttattcac 720
tccatcggac aacaacttgc tggctggcct ttgtacttat tcatgaacgt caccggtcac 780
aacaaccatg agcgtcaaca tgagggtcgt ggaaagggtg aggtcaacag tttctggacc 840
gtcagtcact tcaaccacgc cagtcctctt tatgaagcta aggatgccaa attgatcttg 900
ttgagtgtac tcggtatcgc catcacgcgc gctgtcctta tcatgcttag caagacatac 960
ggattttaca acatggctat ctggtacttc attccatacc tctgggtaaa ccaactggctt 1020
gttgctatca ctttcttcca acacaccgac ccaactcttc ctcaactactc tggcgagagc 1080
tggaactatg ttcgtggagc cgcagcaacc atcgatcgtg aattcggatt catcggacgc 1140
actcttcttc acggtatcat cgagaccac gttcttcacc actacgtcag caccattcct 1200
ttctaccacg ccgatgagggc taccgaggcc atcaagccta tcatgggtcg tcaactacaga 1260
gccgatgttc gaggcggatc ccttggattt ttgaagagct tgtgggtccag cgctcgttgg 1320
tgccagtggg tcgagccatc tgagggtgct gaagggtgagg gcaagaaggc attcttcttc 1380
cgtaaccgca 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 tcacccggcg gagctgggtca aaggagggga ggtccctaca 60
aaccctaaag tgactgtcaa ggatttgcg c atgagcactg cttcaagcca 120
tcttacaagc tttcattttg gtaccttttc agagacctat ttgttgctac aataacgggtg 180
gttgtagcat atttatatat acctcgaatc gagactaacg tgcttcgtta tgcggcttgg 240
gctacttatg gagttattca aggactaacg gctactggca tctgggtact tggccatgag 300
tgtggacact ctgcattctc cccgtccgac attttgaatg atactctggg ctggattctg 360
cattctgctc tcctcacgcc ctacttctcc tggcaatcta gccatcgacg ccatcatata 420
tatgcaaatc atttggtaaa agaccacaac tacgtgcccc taccaaagga tgagtatgcc 480
gcgctcttat ctggtgacgt tagtcgacta gaagagctta ctgaggattc tccattttac 540
acattactac gcatagtagc acaacatctc ttogggtttc cattgtacct tacagcgaac 600
atcactgcat ctcaaggttc actgaatcag gctcaatcca aaaatattct agggcaacagt 660
cacttctcac cagcaagcac actatttcgt cccgaggaat cacatctcat tattctttcg 720
gatattggca ttggccttgt cgtgtttgga ctttggtagc ctagccaaat atttgggtgga 780
tccatgattg cattgttgta tcttcaacct tatctctggg tcaaccactg gattgtcgct 840
atcacctatc tgcatacatc acaccctgat gtacccaaat acgaaccgga agcatggaca 900
tttcttaaag gtgcatttgc aacagttgat cgggagctgg ggtgggtggg aaagcacatg 960
ctacacaaca ttgccgagtt ccatgttatt caccacctat tttcacgtat cctcaatat 1020
cacgctgagg aagcgaccaa ggctattatg ccattgctga aaagctctta ccgtagtgat 1080
aagaagcgaa acttttggat gtgtatgtgg gagtctttta ctaagtgccg gtacgttggt 1140
ccatagtagc ttaaggctaa gctagaagat cgtacaatgg tctacaaggg tgggtccaacg 1200
ccaacctcag agatctttat gaggaagaaa ggatgggtca aggaggtgaa tcagagtaaa 1260
cagttgggat 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
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
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
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
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

ES 2 542 420 T3

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 tcaccaccg 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 gcgccc aaat 30

<210> 37

<211> 1290

20 <212> ADN

<213> Neurospora crassa

<400> 37

ES 2 542 420 T3

```

atggctgtca ctactaggtc acacaaagcc gccgctgcc cgaacctga agttgtgtct 60
acaggagtgg atgcagtcag cgctgccgca ccaagcagta gtagctcctc atcctcccaa 120
aagtcagctg agcctatcga atatccagac atcaagacaa ttcgtgacgc tataccagac 180
cactgcttta gacctcgcgt ttggatatcc atggcgctact ttattcgcga ttttgcaatg 240
gctttcggcc tcggatactt ggcattggcaa tacatccctt tgattgcaag taccctattg 300
agatacggag cttgggcttt gtacgggttac ctccaggagc tcgtctgtac tggaatttgg 360
atcttggctc acgaatgcgg tcacggagcc ttttctagac acacctgggt caacaacgtt 420
atgggttggg ttggtcactc tttcctacta gtcccatatt ttagctggaa attttcccat 480
caccgtcatc ataggttcac cggacatatg gaaaaagata tggcgctcgt tccagccacg 540
gaggcggaca gaaatcagag aaaactagct aatctctata tggacaaaga gactgaggag 600
atgttcgagg atgttcctat tgtgcagttg gttaaactaa ttgctacca actcgccggg 660
tggcagatgt atctcttgtt caacgttagt gccggaaaag gctccaaaca gtgggaaacc 720
ggcaaagggt gaattgggat gctccgcgtg agccatttcg aaccaagttc agccgttttc 780
agaaacagcg aagcaattta catagctcta agcgatctcg gacttatgat tatgggatac 840
attctctacc aggcagccca agttgttggg tggcaaatgg ttggtctctt gtattttcaa 900
cagtacttct gggttcacca ttggctcggt gccatcactt accttcatca cacacacgaa 960
gaagttcacc actttgatgc agattcttgg acatttggtt aggggtgccct cgctaccgtg 1020
gacagagact tcggtttcat cggcaagcac ctcttcata acatcattga ccatcatgtt 1080
gttcacacc tcttcccaag aatccctttc tactacgctg aagaagctac caattcaata 1140
agacctatgc tcggacctct ttaccacaga gatgaccgtt ctttcatggg gcaactctgg 1200

```

```

tacaacttca cacactgcaa atgggttgtc cctgatcctc aagtgccagg tgctctaata 1260
tgggctcaca ccgttcagag tactcagtaa 1290

```

<210> 38

<211> 1209

5 <212> ADN

<213> *Aspergillus nidulans*

<400> 38

```

atggccgcaa ccgcgaccac tctcgtgaa atagaaaaga agaaggaaga gattacacta 60
cagacaatca agaattgcat accaaagcac tgttttaacc gtagtttgct tatttcaagt 120
gcctacgtcg tcagagacct cctctacgca tcagttttgt tctattttgc acttcataat 180
gatacgtctt tctcatccca gctccttagg atcttggcat ggacagctta cggtttcatg 240
caaggctgcg tgggaacggg tatatggata ttggcacatg aatgcggaca cggagctttt 300
agcccttacc aaacctggaa cgacgttgtt ggggtggacc ttcattctct tctcatgggt 360
ccttacttct cttggaaaat aaccacgca aggcaccaca gatatacgaa caataccgag 420
agggacacag ccttcgttcc ctggaccgag aaggaatacg acaccagacc tcgttacttc 480
cctgcatggg tcgagatgtt tgaagacaca ccagtgtata acttgatttc attgctcgcc 540
catcagatcg ccggctggca aatgtacctc tgcttctacg tctcagccgg agccaaaagt 600
aagcctgttc cacaaggcaa gcagtccgga tggtttggag gtcaacaatc tgcacacac 660
tttgacccag gaagctctct atggaccgaa aaccagcgcc atctaatacg aatctccgac 720
cttggactcc ttctcgtggc cgccgcgaat tggacttgg ctcaacaagt tgggtgttct 780
agaatggtgc tcatttacgt cgtcccctac ttttgggtcc accactgggt agtcgccatc 840
acgtacctcc accacactca cccatccata ccacactaca ccgactctac ctggacattc 900
actaaaggag cactctcaac agtggatcgt gacttcggat ttataggaag gcaattcttt 960
caccacatca ttgatacca cgtcgttcat cacttgttca ataggatacc attctatcac 1020
gcagaggaag ctactaacgc aataatacca gttctcgggt atatgtacca tagagaagaa 1080
accggattcc tctggagtct tatggaaact tataaaaact gtcgctttgt tggcgtggag 1140
aacgatgtgg gtaaggaggg agttctccat tgggttttcg aagaaaagaa aggcgctaaa 1200
gctgaatatg 1209

```

<210> 39

10 <211> 1446

<212> ADN

ES 2 542 420 T3

<213> Neurospora crassa

<400> 39

```

atggcgctccg tctcctctgc ccttcccagag ggcaacaagc ctgccctgcg caggacccaa 60
accgaggcca cctccgactc ataccctggg accgctgatg cctctcccct cgactctccc 120
cttgagcgct cggcctccaa cacctcgctt tcttcccagg cctctgacaa cgtcaagacc 180
gacaaggccg agttcggcaa gctgctcgac acgtatggca acgagttcga ggtccccgac 240
ttcaccatca aggacatccg cgatgccatc cccgcccaact gctttgagcg ttcggctctt 300
cacagcttgg cgcacgtcgt ccgcgacatc atttacctca ccgtcacttt ttacgtctgg 360
aacaagtatg tcaactcccga gtacatcccc atgaaggctg cccgtgtcgt cctctggggg 420
ctgtacacct tcatgcaggg ccttttcggc accggtctct gggttcttgc ccatgagtgc 480
ggtcaccagg ctttctcccc gtccagggtg atcaacgaca ccgtcggctg ggtcctccac 540
tctgcccttc tcgtccccta cttctcgtgg aagttctccc acagcaagca ccacaaggcc 600
accggcaaca tcgagcgtga catgggtctt gtccctcgga cccgcgagca gtttgctct 660
cgcacgggcc gtttcgtcca tgagatttcc gagttgaccg aggagacccc catctacacc 720
ttgatccacc ttatcgggtc gcagctcatc ggctggccca actacctcat gaccaacgtc 780
accggccaca acttccacga gaggcagcgc gagggctcgt gcaagggcaa gaagaacggc 840
tggttctact gtgtcaacca cttcaacccc agctctcccc tctatgagga gcgtgaggcc 900
ccctggatca tcgtctccga catcgggtatc gctatcgccg ccaccgccct catctacctc 960
ggcaacacct tcggctgggt caacatgttc gtctgggtact tccttcccta cctctgggtc 1020
aaccactggc ttgttgccat caccctacct cagcacaccg acccctcgct ccccaactac 1080
acccctgatc agtgggaact tgcccggtg gccgccgcga ctattgaccg cgagttcggc 1140
ttcatcggcc gtcacctcct ccacggcatt atcgagaccc acgttctcca ccactacgtc 1200
agcaccattc ctttttacca cgcgcacgag gcctccgagg ccatcaagaa ggtcatgggc 1260
cgtcactacc gcgctgacgt ccaagatggc cccatcggtt tcatcaaggc catgtggaag 1320
gctgctcgtt ggtgccagtg ggttgagcct accgagggcg ctgagggtaa gggcaagggc 1380

gtcttgttct accgcaacca gaacggtctc ggtgtcaagc ctgccaagct ccccaaaacc 1440
aactaa                                             1446

```

<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					320
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	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					400
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					480

Asn

<210> 41

<211> 1200

<212> ADN

5 <213> Mortierella alpina

<400> 41

ES 2 542 420 T3

atggcacctc	ccaacactat	cgatgccggt	ttgaccacgc	gtcatatcag	cacctcggcc	60
ccaaactcgg	ccaagcctgc	cttcgagcgc	aactaccagc	tccccgagtt	caccatcaag	120
gagatccgag	agtgcacccc	tgcccactgc	tttgagcgc	ccggtctccg	tggtctctgc	180
cacgttgcca	tcgatctgac	ttgggcgtcg	ctcttggtcc	tggtctcgac	ccagatcgac	240
aagtttgaga	atcccttgat	ccgctatattg	gcctggcctg	tttactggat	catgcagggt	300
attgtctgca	ccggtgtctg	ggtgctggct	cacgagtggt	gtcatcagtc	cttctcgacc	360
tccaagaccc	tcaacaacac	agttgggttg	atcttgcact	cgatgctctt	ggtcccctac	420
cactcctgga	gaatctcgca	ctcgaagcac	cacaaggcca	ctggccatat	gaccaaggac	480
caggtctttg	tgcccaagac	ccgctcccag	ggtggcttgc	ctccaagga	gaacgctgct	540
gctgccgttc	aggaggagga	catgtccgtg	cacctggatg	aggaggctcc	cattgtgact	600
ttgttctgga	tggtgatcca	gttcttggtc	ggatggccc	cgtacctgat	tatgaacgcc	660
tctggccaag	actacggccg	ctggacctcg	cacttccaca	cgtactcgcc	catctttgag	720
ccccgcaact	ttttcgacat	tattatctcg	gacctcgggtg	tggtggctgc	cctcggtgcc	780
ctgatctatg	cctccatgca	gttgtcgctc	ttgaccgtca	ccaagtacta	tattgtcccc	840
tacctctttg	tcaacttttg	gttggctcctg	atcaccttct	tgcagcacac	cgatcccaag	900
ctgccccatt	accgcgaggg	tgccctggaat	ttccagcgtg	gagctctttg	caccgttgac	960

cgctcgtttg	gcaagttctt	ggaccatatg	ttccacggca	ttgtccacac	ccatgtggcc	1020
catcacttgt	tctcgcaaat	gccgttctac	catgctgagg	aagctaccta	tcatctcaag	1080
aaactgctgg	gagagtacta	tgtgtacgac	ccatccccga	tcgtcgttgc	ggtctggagg	1140
tcgttccgtg	agtgccgatt	cgtggaggat	cagggagacg	tggtcttttt	caagaagtaa	1200

<210> 42

<211> 1290

<212> ADN

5 <213> Neurospora crassa

<400> 42

atggcggtca	ccaccgcgag	ccacaaggcc	gcggccgcca	ccgagcccga	ggttgtcagc	60
accggcggtg	acgccgtctc	tgctgctgct	ccctcctcct	cctcctcctc	ttccagccaa	120
aagtgcggccg	agcccatcga	ataccgcgac	atcaagacca	tccgcgacgc	catccccgac	180
cactgcttcc	gccgcgcgt	ctggatctcc	atggcctact	tcatccgcga	cttcgccatg	240
gcctttggcc	tcggctacct	cgcttggcag	tacatcccc	tgatcgctc	caccccgctc	300
cgctacggcg	cctgggctct	gtacggctac	ctccagggtc	tcgtctgcac	gggcatctgg	360
attctggcgc	acgagtgcgg	ccacggcgcc	ttctcgaggc	acacgtgggt	caacaacgtc	420
atgggggtgga	ttggccactc	cttctctctg	gtcccttact	tcagctggaa	gttcagccac	480
catcgccacc	atcgcttcac	cggccacatg	gagaaggaca	tggtcgtttg	gcctgccacc	540
gaggctgatc	gcaaccagag	gaagctggcc	aacttgtaca	tggaacaagga	gacggccgag	600
atgtttgagg	atgtgcccat	tgtccagctc	gtcaagctca	tgcgccacca	gctggccggc	660
tggcagatgt	acctcctctt	caacgtctcc	gccggttaagg	gcagcaagca	gtggggagact	720
ggcaaggggcg	gcatgggctg	gttgagggtt	agccactttg	agccttctct	tgctgtgttc	780
cgcaactccg	aggccatcta	cattgccttg	tccgatcttg	gtctcatgat	catgggctac	840
atcctctacc	aggccgcgca	ggttggttggc	tggcagatgg	tggtctgct	gtacttccag	900
cagtacttct	gggttcacca	ttggttggtc	gccatcactt	acctccacca	caccacgag	960
gaagtccacc	actttgacgc	cgactcgtgg	accttcgtca	agggcgctct	cgccaccgtc	1020
gaccgcgatt	ttggcttcat	tggcaagcac	ctcttccaca	acattatcga	ccaccacgtc	1080
gtccaccact	tgttccctcg	catccccttc	tactacgcgc	aagaagccac	caactcgatc	1140
cgccccatgc	tcggccccct	ctaccaccgc	cagcagcgc	ccttcatggg	ccagctgtgg	1200
tacaacttca	cccactgcaa	gtgggtcggt	ccggaccccc	aggtccccgg	cgcgcttatt	1260
tgggcgcaca	ccgttcagag	caccagtaa				1290

<210> 43

<211> 1617

10 <212> ADN

ES 2 542 420 T3

<213> Mortierella alpina

<400> 43

cgacactcct	tcctttcttct	cacccgctcct	agtcccccttc	aacccccctc	tttgacaaag	60
acaacaaacc	atggctgctg	ctcccagtg	gaggacgttt	actcggggccg	aggttttgaa	120
tgccgaggct	ctgaatgagg	gcaagaagga	tgccgaggca	cccttcttga	tgatcatcga	180
caacaagggtg	tacgatgtcc	gcgagtctgt	ccctgatcat	cccgggtgga	gtgtgattct	240
cacgcacgtt	ggcaaggacg	gcactgacgt	ctttgacact	tttcaccccg	aggctgcttg	300
ggagactcct	gccaactttt	acgttgggtga	tattgacgag	agcgaccgag	atatcaagaa	360
tgatgacttt	gcggccgagg	tccgcaagct	gcgtaccttg	ttccagtctc	ttggttacta	420
cgattcttcc	aaggcatact	acgccttcaa	ggtctcgttc	aacctctgca	tctgggggtt	480
gtcgacgggtc	attgtggcca	agtggggcca	gacctcgacc	ctcgccaacg	tgctctcggc	540
tgcgcttttg	ggtctgttct	ggcagcagtg	cggatgggtg	gctcacgact	ttttgcatca	600
ccaggctcttc	caggaccgtt	tctgggggtga	tcttttcggc	gccttcttgg	gaggtgtctg	660
ccagggtcttc	tcgtcctcgt	ggtggaagga	caagcacaac	actcaccacg	ccgcccccaa	720
cgtccacggc	gaggatccc	acattgacac	ccaccctctg	ttgacctgga	gtgagcatgc	780
gttggagatg	ttctcggatg	tcccagatga	ggagctgacc	cgcagtgtgt	cgcgtttcat	840
ggtcctgaac	cagacctggt	tttacttccc	cattctctcg	tttgcccgtc	tctcctggtg	900
cctccagtc	attctctttg	tgctgcctaa	cggtcaggcc	cacaagccct	cgggcgcgcg	960
tgtgcccato	tcgttggctg	agcagctgtc	gcttgcgatg	cactggacct	ggtacctcgc	1020
caccatgttc	ctgttcatca	aggatcccgt	caacatgctg	gtgtactttt	tggtgtcgca	1080
ggcgggtgtg	ggaaacttgt	tggcgatcgt	gttctcgctc	aaccacaacg	gtatgcctgt	1140
gatctcgaag	gaggaggcgg	tcgatatgga	tttcttcacg	aagcagatca	tcacgggtcg	1200
tgatgtccac	ccgggtctat	ttgccaactg	gttcacgggt	ggattgaact	atcagatcga	1260
gcaccacttg	ttcccttcga	tgcctcgcca	caacttttca	aagatccagc	ctgctgtcga	1320
gacctgtgc	aaaaagtaca	atgtccgata	ccacaccacc	ggtatgatcg	agggaactgc	1380
agagggtctt	agccgtctga	acgaggcttc	caaggctgcc	tccaagatgg	gtaaggcgca	1440
gtaaaaaaaaa	aaacaaggac	gttttttttc	gccagtgcct	gtgcctgtgc	ctgcttccct	1500
tgtcaagtcg	agcgtttctg	gaaaggatcg	ttcagtgcag	tatcatcatt	ctccttttac	1560
cccccgctca	tatctcattc	atttctctta	ttaaacaact	tgttcccccc	ttcacccg	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 N° 3;
 - b) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2; y
 - c) un polinucleótido que hibrida con 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.
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); HisSerPheLeuLeuValProTyrPheSerTrpLys (H-SFLLVPYFSWK) (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-AlaIleThrTyrLeu(His/Gln)HisThrHis (WVHHWLVAITYL(H/Q)HTH) (SEC ID N.º:11); AlaIleThrTyrLeu(His/Gln)HisThr (AIT-YL(H/Q)HT) (SEC ID N.º:12); GlyAlaLeuAlaThrValAspArg (GALATVDR) (SEC ID N.º:13) o HisValValHisHisLeuPheXaaArgIleProPhe-Tyr (HVVHHLFXRIPFY) (SEC ID N.º:14 o SEC ID N.º:22); o
 - (ii) codifica el polipéptido de la SEC ID N° 3; o
 - 15 (iii) comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, SEC ID N° 4 o SEC ID N° 33; o
 - (iv) hibrida con una o más de la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 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 órgano, 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
- 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:
 - (a) un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 32 o SEC ID N° 40;
 - 5 (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 31 o SEC ID N° 39; y
 - (c) un polinucleótido que hibrida con una o ambas de la SEC ID N° 31 o SEC ID N° 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 (i) es de un filo seleccionado entre zigomicota, basidiomicota, y ascomicota; o
 - (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 N° 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 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); TrpValHisHisTrpLeuValAlaIleThr-TyrLeu(His/Gln)HisThrHis (WVHHWLVAITYL(H/Q)HTH) (SEC ID N.º:11); AlaIleThrTyrLeu(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.
16. 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.
17. 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
 - (i) expresa una proteína codificada por dicho vector; o
 - (ii) es una célula vegetal.
19. Un procedimiento para producir aceite de semilla que contiene ácidos grasos omega-3 de semillas vegetales, que comprende las etapas de:
 - (a) obtener semillas de una planta de acuerdo con la reivindicación 15; y
 - (b) extraer el aceite de dichas semillas.
20. 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
 - (i) 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
 - (ii) 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 N° 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
 - 35 (f) un polinucleótido de (c), pero que muestra degeneración normal de acuerdo con la degeneración del código genético.
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
 - 45 (b) regenerar una planta de maíz con contenido aumentado de ácido α -linolénico y/o ácido estearidónico a partir de dicha célula vegetal.

44. Un procedimiento para producir un 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

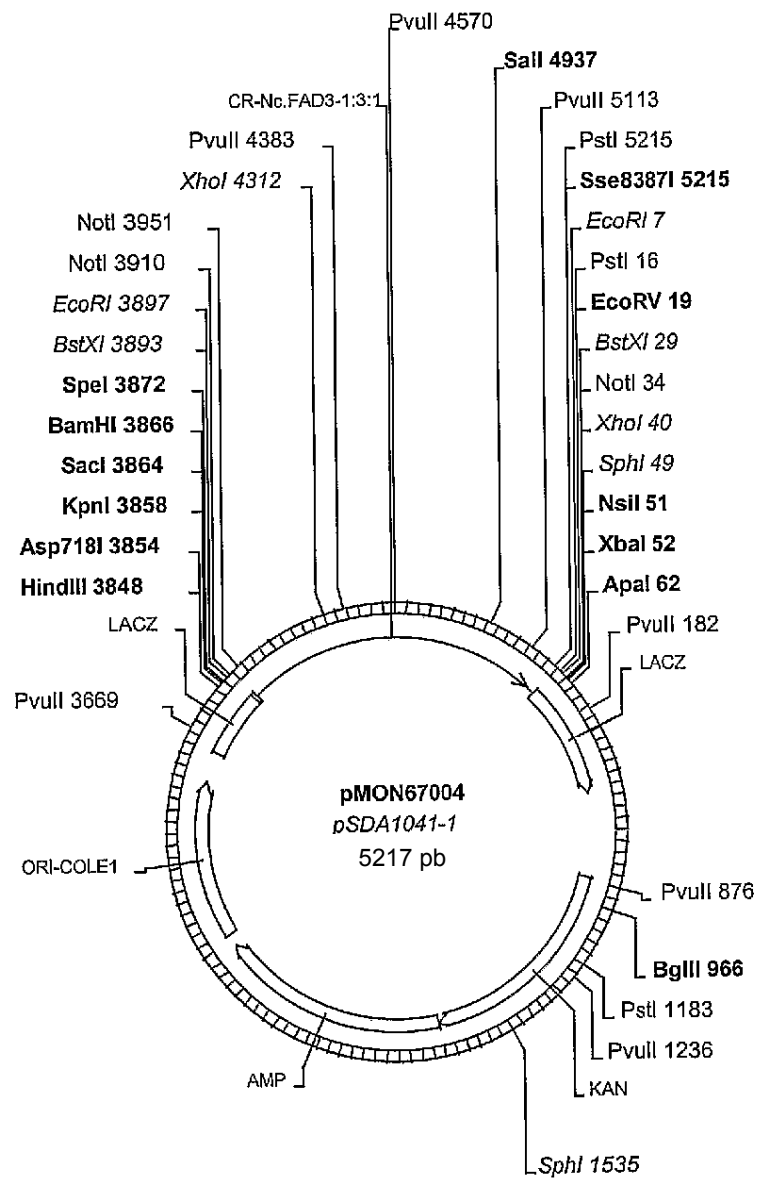


FIG. 1

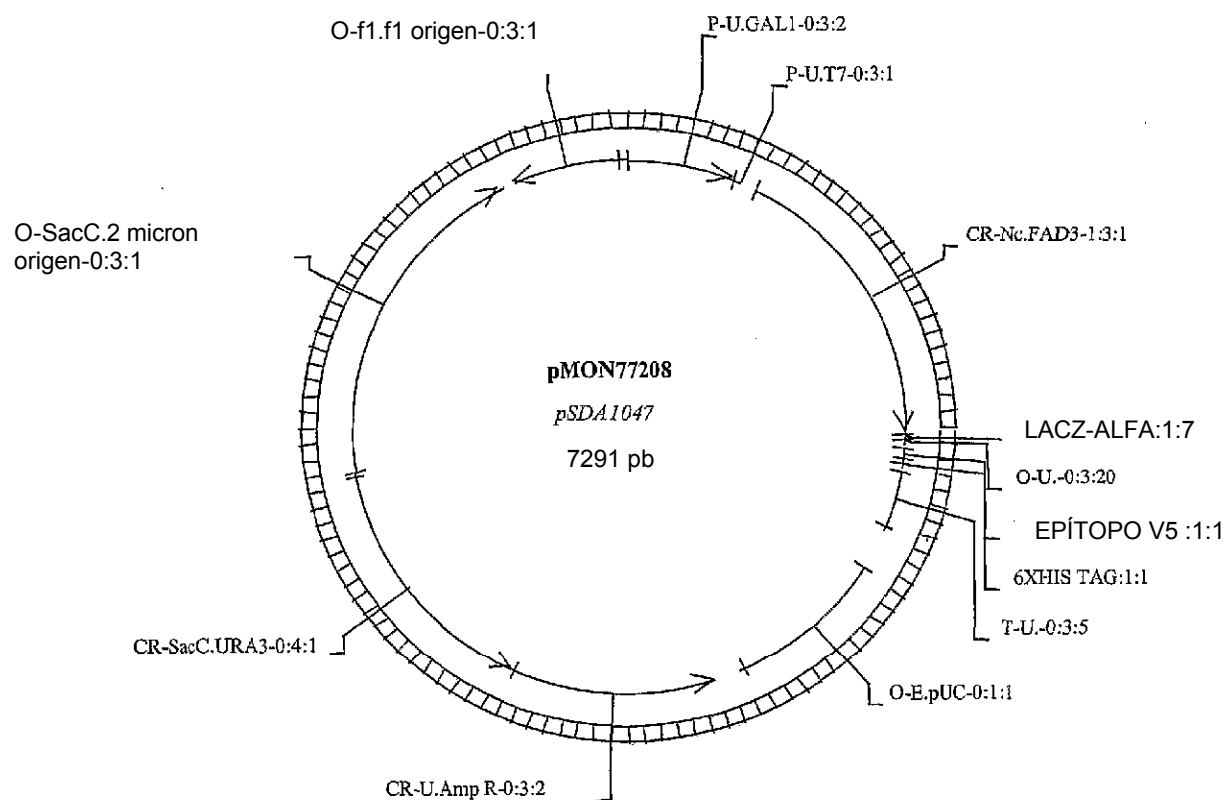


FIG. 2

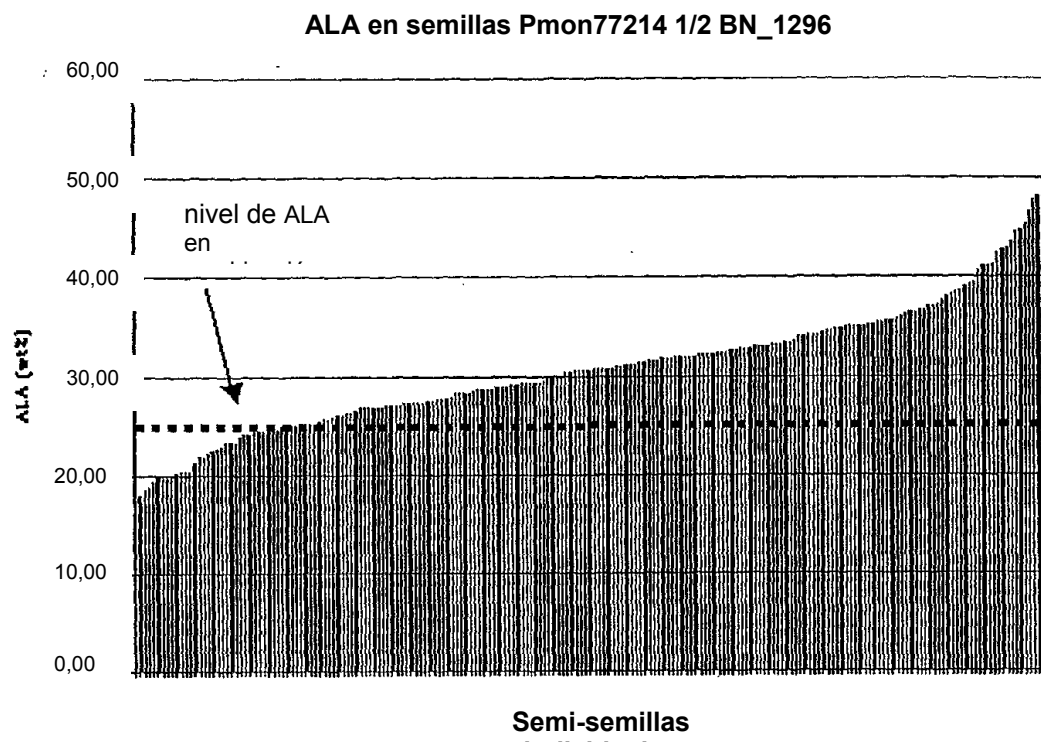


FIG. 3

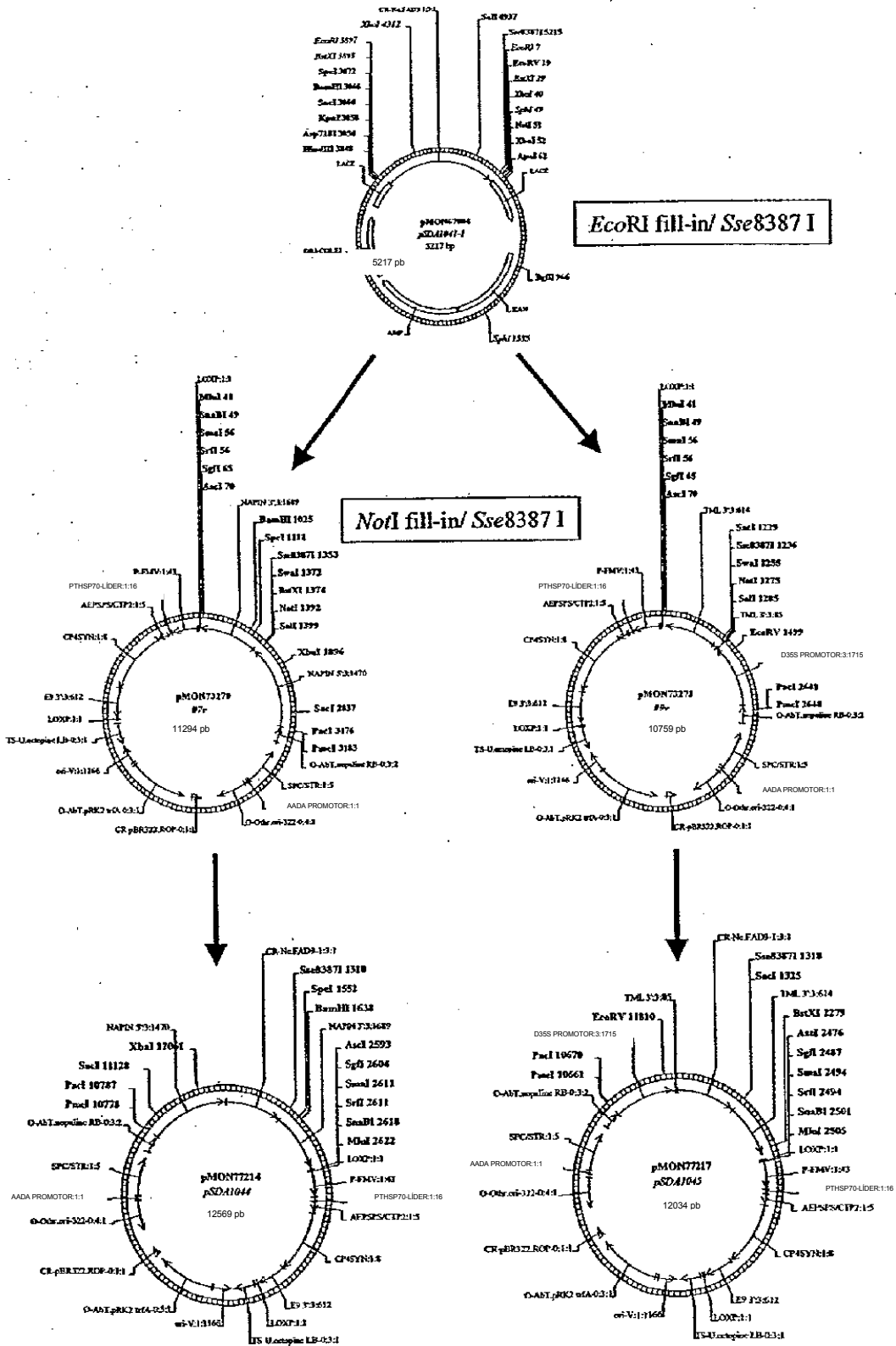


FIG. 4

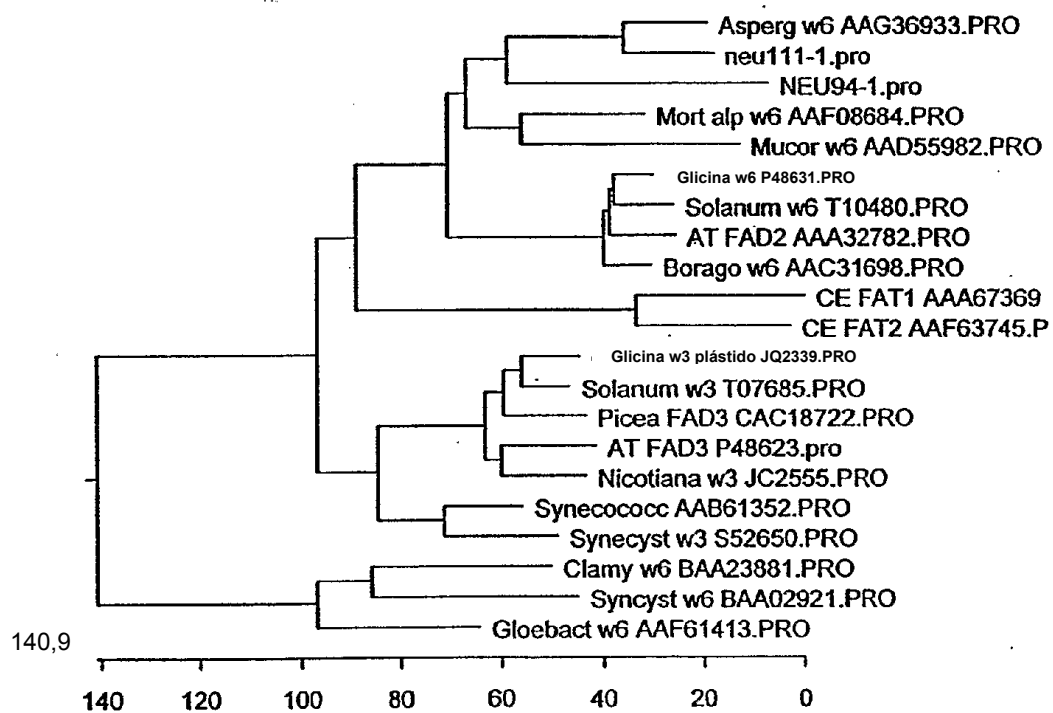


FIG. 5

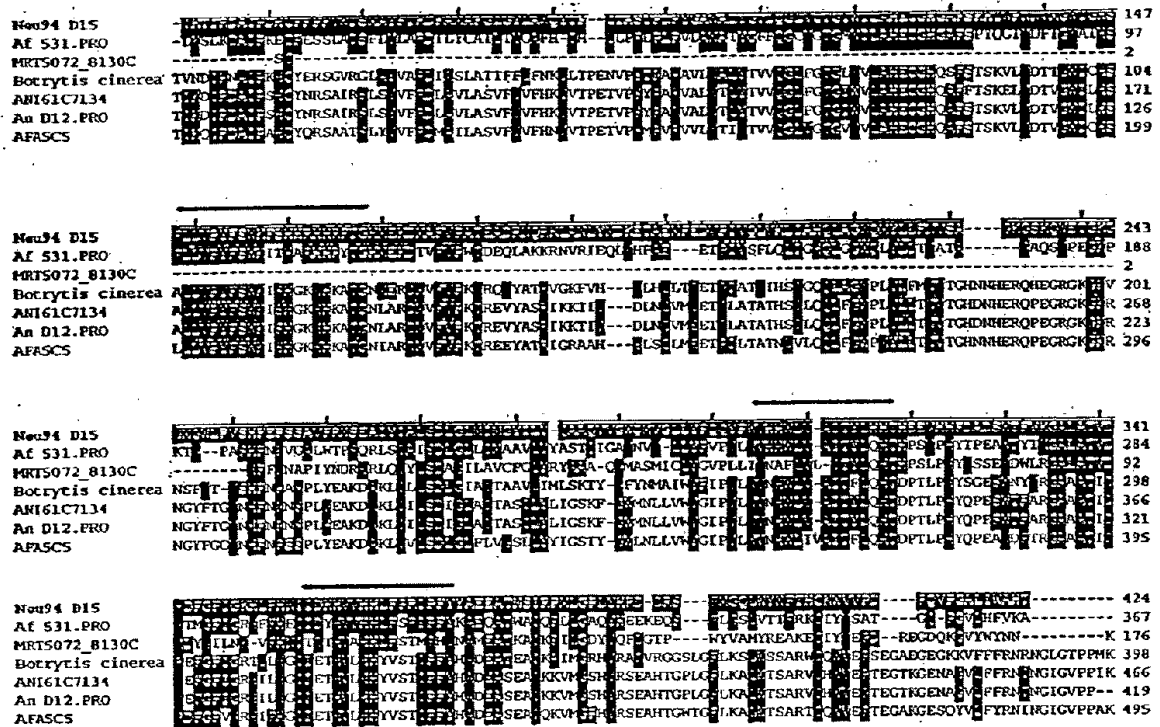


FIG. 6

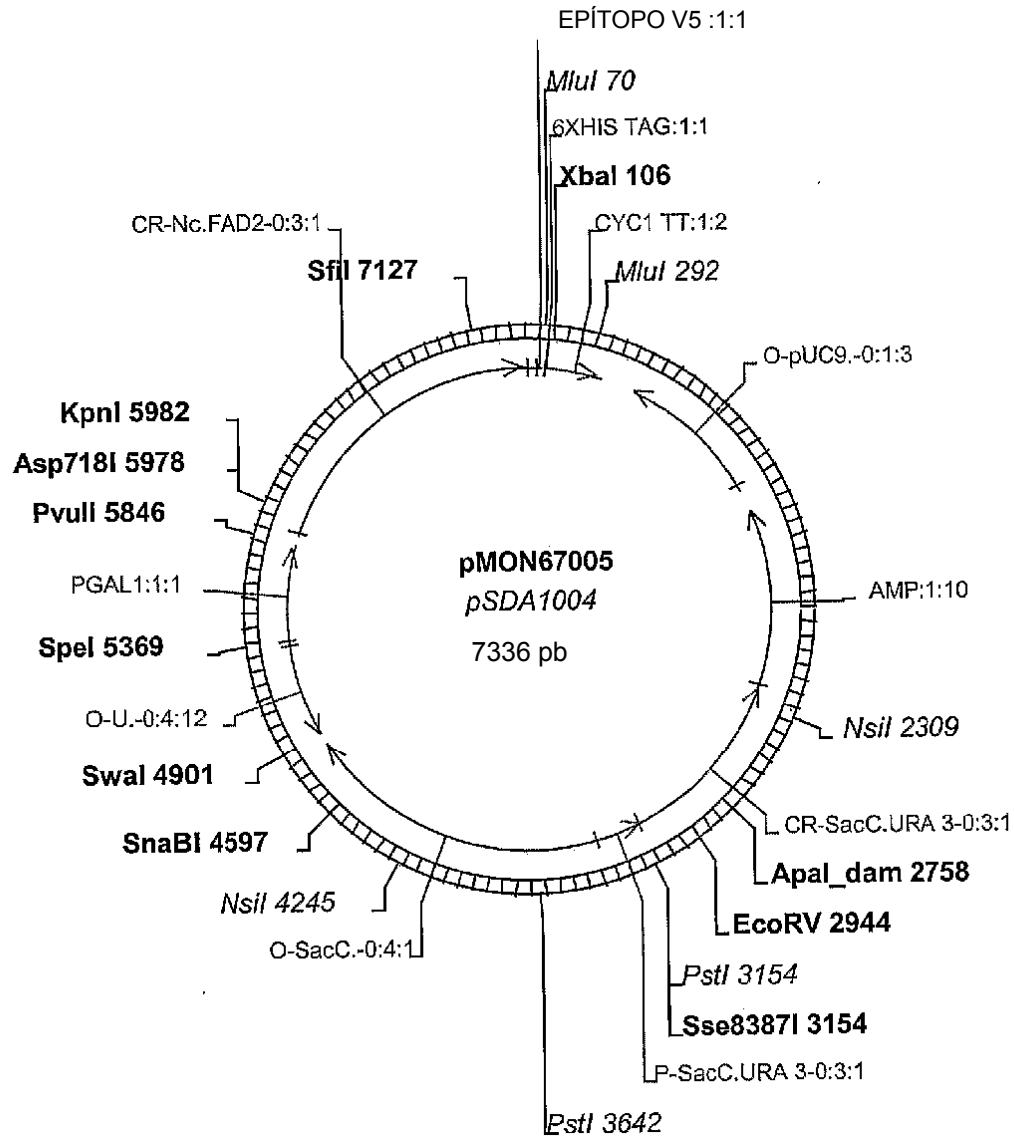


FIG. 7A

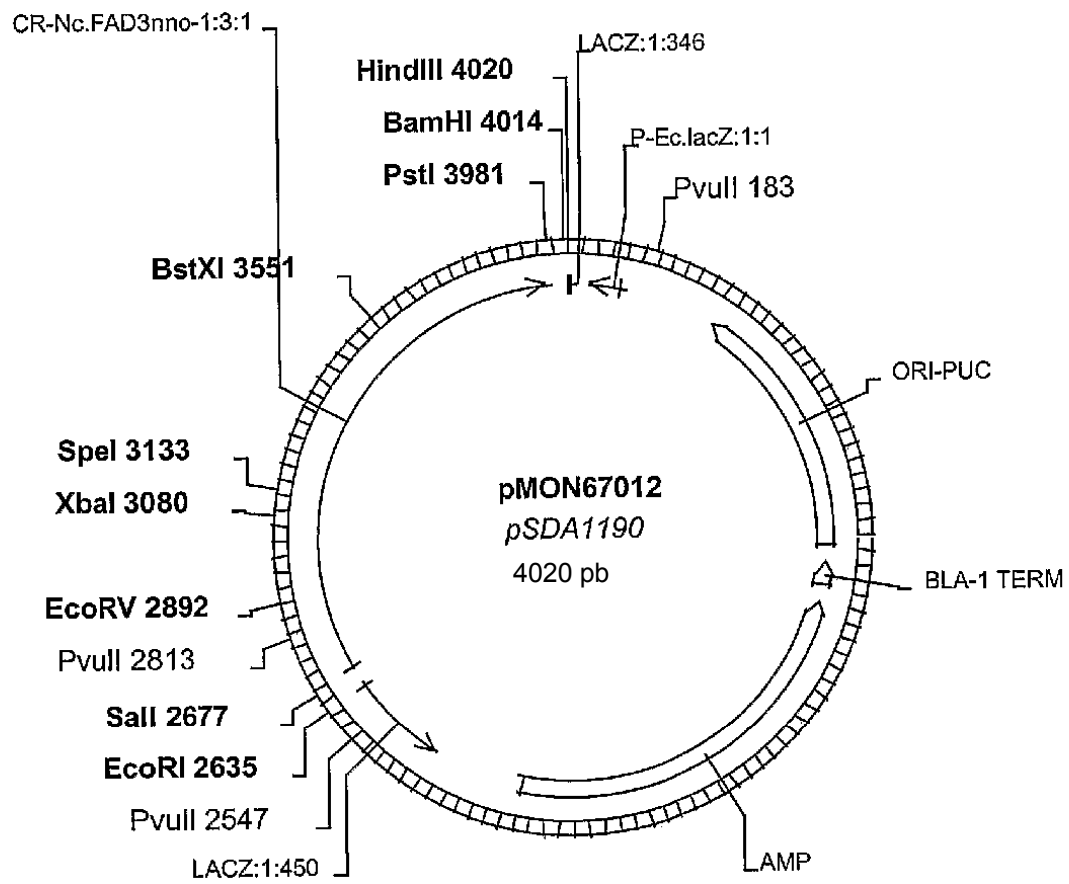


FIG. 7B

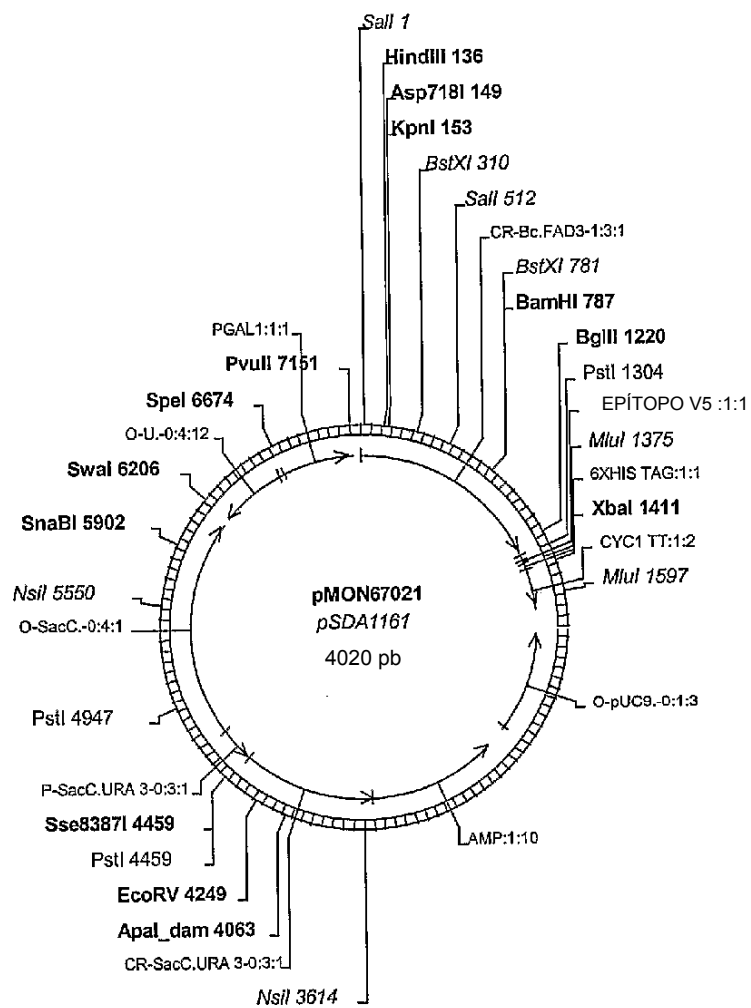


FIG. 7C

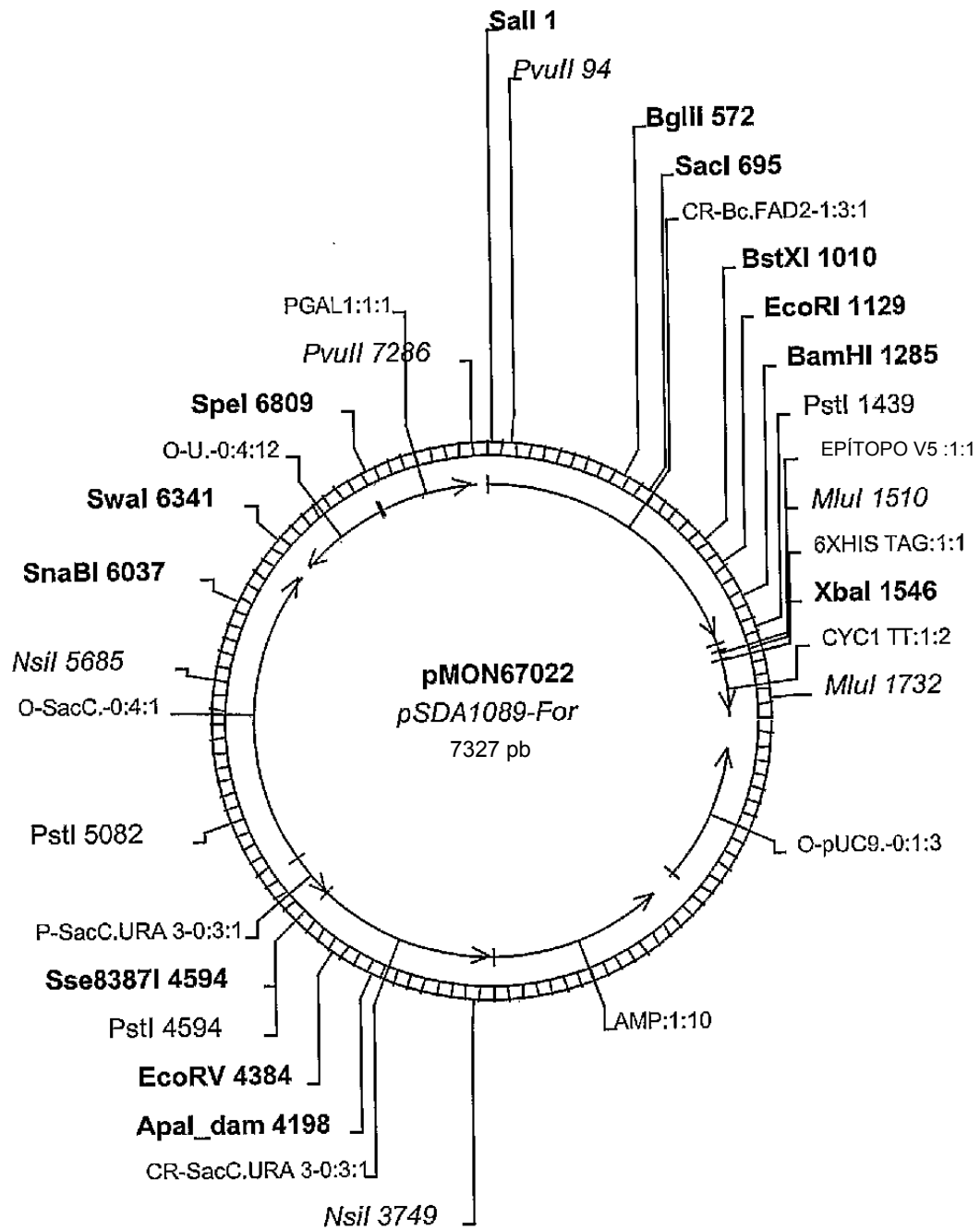


FIG. 7D

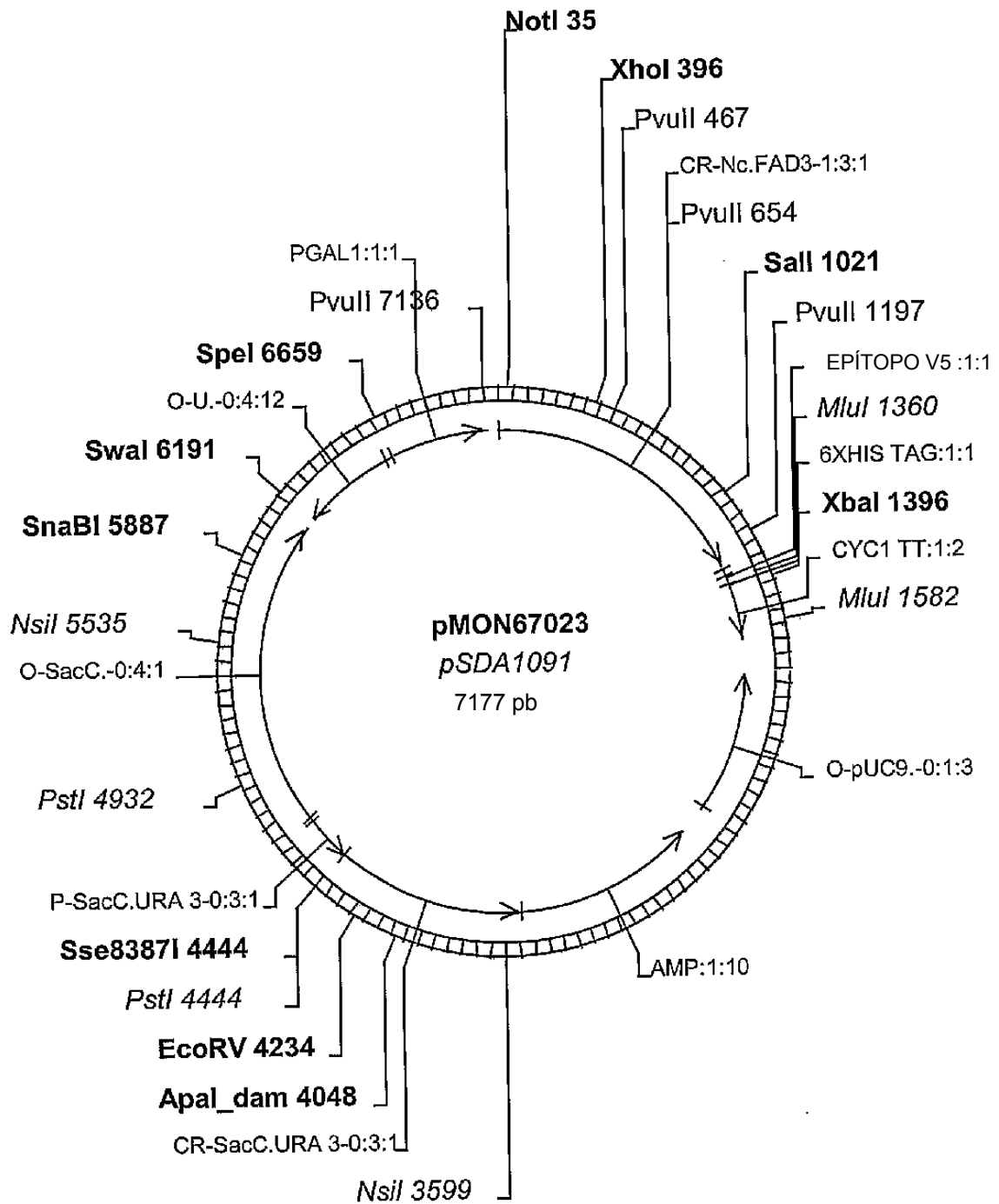


FIG. 7E

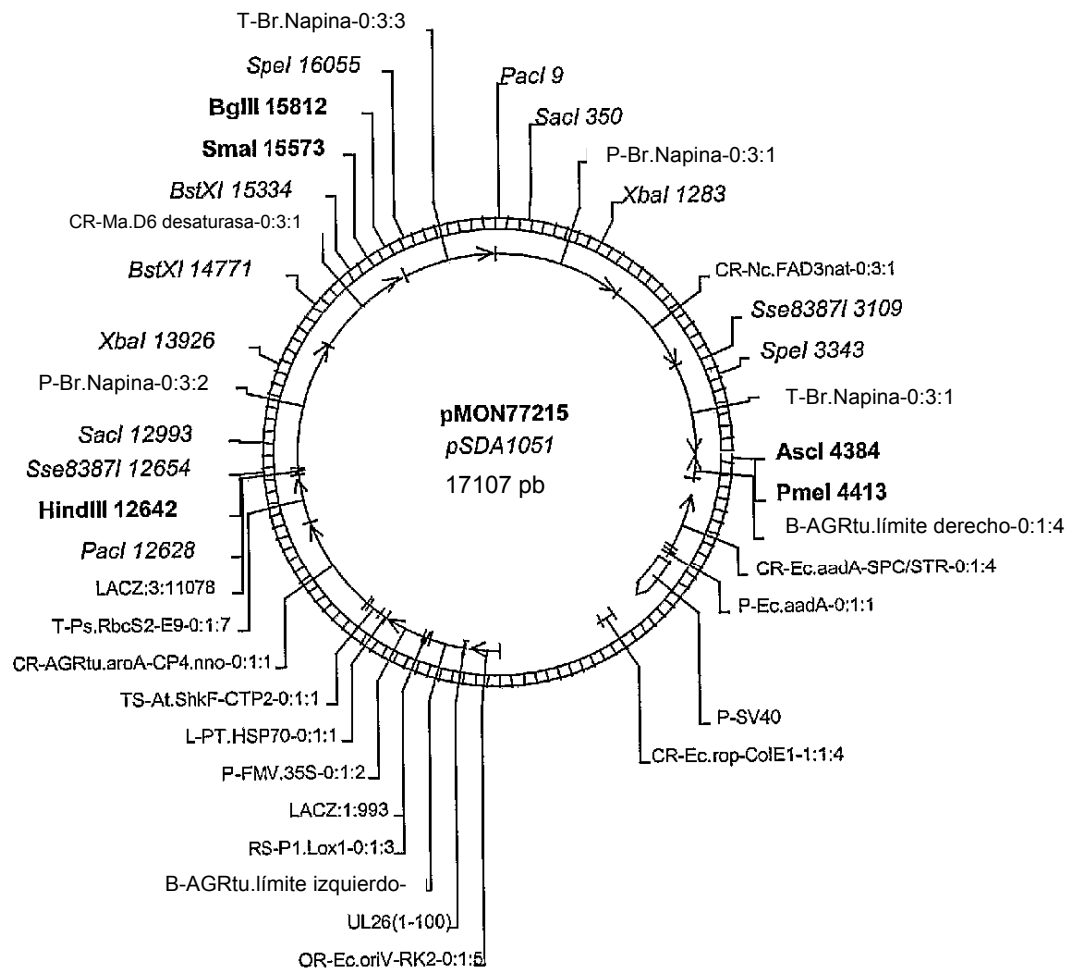


FIG. 7F

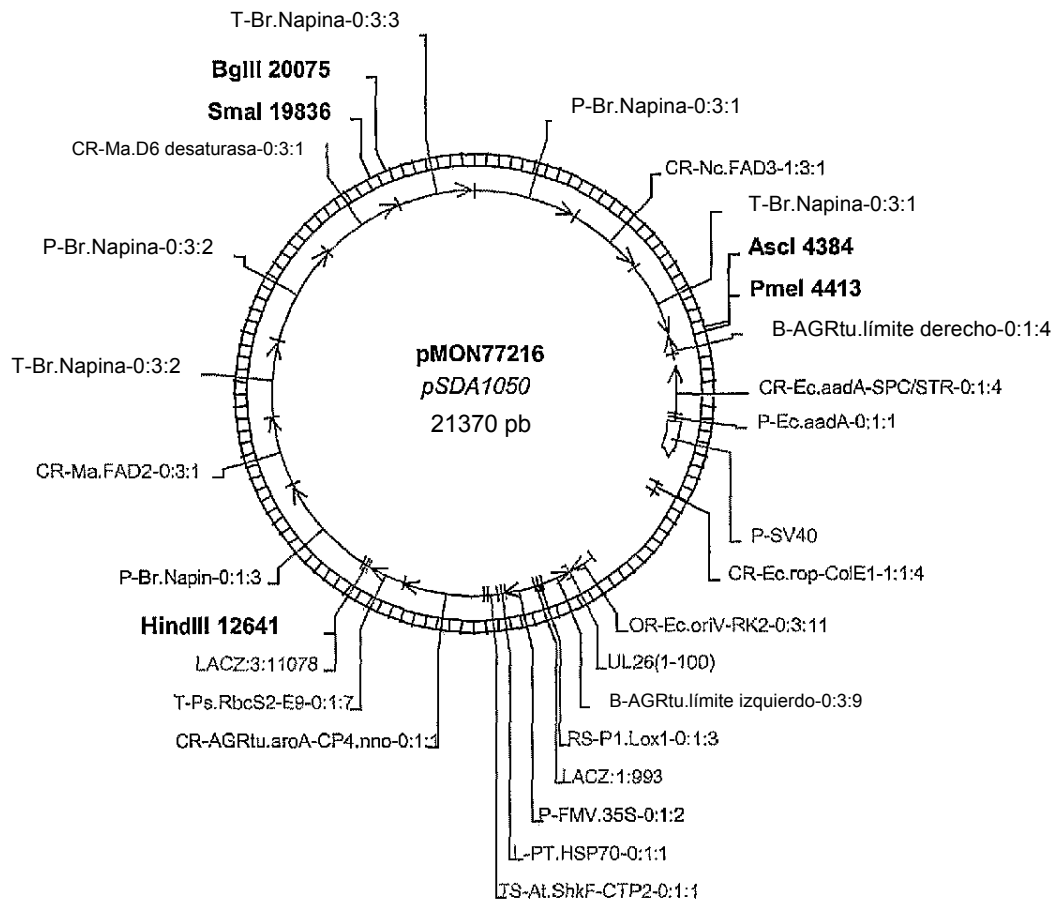


FIG. 7G