

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 013**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2006 PCT/EP2006/060913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2006 WO06100241**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2006 E 06725200 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 1866417**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados de C20 y C22 con al menos cuatro enlaces dobles en plantas transgénicas**

30 Prioridad:
22.03.2005 DE 102005013779

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2017

73 Titular/es:
**BASF PLANT SCIENCE GMBH (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:
**CIRPUS, PETRA y
BAUER, JÖRG**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 635 013 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

Procedimiento para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados de C20 y C22 con al menos cuatro enlaces dobles en plantas transgénicas

5 La presente invención se refiere en términos generales a la preparación de ácidos grasos poliinsaturados en organismos transgénicos, en el cual se introducen ácidos nucleicos al organismo, los cuales codifican para polipéptidos con actividad de Δ -6-desaturasa, de Δ -6-elongasa, una actividad de Δ -5-desaturasa, de Δ -5-elongasa, de Δ -4-desaturasa, de Δ -12-desaturasa y/o de ω -3-desaturasa. Estas desaturasas y elongasas provienen ventajosamente de *Phytophthora sojae*.

10 La invención se refiere además a las secuencias de ácido nucleico, vectores y organismos que contienen las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención, a los vectores que contienen las secuencias de ácido nucleico y/o los constructos de ácido nucleico así como a las plantas transgénicas que contienen las secuencias de ácido nucleico, constructos de ácido nucleico y/o vectores mencionados.

Otra parte de la invención se refiere a composiciones de ácido graso preparadas de acuerdo con el procedimiento aquí descrito y a su uso.

15 Los ácidos grasos y los triacilglicéridos tienen una gran cantidad de aplicaciones en la industria de alimentos, en la nutrición animal, los cosméticos y en el sector farmacéutico. Dependiendo de si son ácidos grasos libres saturados e insaturados, o de si son triacilglicéridos con un contenido elevado de ácidos grasos saturados o insaturados, son adecuados para las diferentes aplicaciones. Los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico y linolénico son esenciales para los mamíferos ya que no pueden prepararse por estos mismos. Por eso, los ácidos ω -3-grasos y ω -6-grasos poliinsaturados representan un componente importante de la nutrición animal y humana.

20 Los ácidos ω -3-grasos poliinsaturados de cadena larga tales como el ácido eicosapentaenoico (= EPA, C20:5 Δ ^{5,8,11,14,17}) o el ácido docosahexaenoico (= DHA, C22:6 Δ ^{4,7,10,13,16,19}) son componentes importantes de la nutrición humana debido a sus diferentes roles en la salud, en aspectos tales como el desarrollo del cerebro infantil, la funcionalidad del ojo, la síntesis de hormonas y otras sustancias de señal, así como en la prevención de patologías cardiovasculares, cáncer y diabetes (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA y Yeo YK Pharmacol Res 40:211-225, 1999). Por esta razón existe una demanda de producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

25 Debido a la composición hoy habitual de la nutrición humana, una adición de ácidos ω -3-grasos poliinsaturados, que se encuentran preferiblemente en aceites de pescado, al alimento es particularmente importante. De esta manera, por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido docosahexaenoico (= DHA, C22:6 Δ ^{4,7,10,13,16,19}) o el ácido eicosapentaenoico (= EPA, C20:5 Δ ^{5,8,11,14,17}) se adicionan al alimento para bebés con el fin de incrementar el valor nutritivo. Al ácido graso insaturado DHA se atribuye un efecto positivo sobre el desarrollo y el mantenimiento de las funciones del cerebro.

30 A continuación, los ácidos grasos poliinsaturados se denominan como PUFA, PUFAs, LCPUFA o LCPUFAs (poly unsaturated fatty acids, PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga).

35 Los diferentes ácidos grasos y triglicéridos se obtienen principalmente de los microorganismos tales como *Mortierella* o *Schizochytrium* o de plantas que producen aceite tales como soja, colza, algas como *Cryptothecodinium* o *Phaeodactylum* y otras; por lo regular se obtienen en forma de sus triacilglicéridos (= triglicéridos = trigliceroles). Pero también pueden obtenerse de animales tales como, por ejemplo, peces. Los ácidos grasos libres se preparan ventajosamente mediante hidrólisis. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga tales como DHA, EPA, ácido araquidónico (= ARA, C20:4 Δ ^{5,8,11,14}), ácido dihomo- γ -linolénico (C20:3 Δ ^{8,11,14}) o ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5 Δ ^{7,10,13,16,19}) no se sintetizan en plantas oleaginosas como colza, soja, girasol, cártamo. Las fuentes naturales habituales para estos ácidos grasos son peces como arenque, salmón, sardina, perca marina, anguila, carpa, trucha, fletán, caballa, lucioperca o atún, o algas.

40 Dependiendo del propósito de aplicación, se prefieren aceites con ácidos grasos saturados o insaturados. De esta manera, se prefieren lípidos con ácidos grasos insaturados, especialmente ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo en la nutrición humana. A los ácidos ω -3-grasos poliinsaturados se les atribuye en este caso un efecto positivo sobre el nivel de colesterol en la sangre y por lo tanto sobre la posibilidad de prevenir una enfermedad cardíaca. Adicionando estos ácidos ω -3-grasos al alimento puede reducirse ostensiblemente el riesgo de una enfermedad cardíaca, una apoplejía o de hipertensión. Los ácidos ω -3- grasos también pueden influir positivamente en los procesos inflamatorios especialmente crónicos en asociación con enfermedades inmunológicas. Por esto tales ácidos se adicionan especialmente a los alimentos dietéticos o encuentran aplicación en medicamentos. Los ácidos ω -6- grasos tales como el ácido araquidónico habitualmente tienen un efecto más bien negativo en estas enfermedades reumáticas debido a nuestra composición habitual de alimentos.

55

Los ácidos ω -3- y ω -6-grasos son precursores de hormonas tisulares, los así llamados eicosanoides como las prostaglandinas que se derivan del ácido dihomo- γ -linolénico, del ácido araquidónico y del ácido eicosapentaenoico, los tromboxanos y leucotrienos que se derivan del ácido araquidónico y del ácido eicosapentaenoico. Los eicosanoides (llamados serie PG₂), que se forman a partir de los ácidos ω -6-grasos por lo regular promueven reacciones inflamatorias, mientras que los eicosanoides (llamados serie PG₃) de los ácidos ω -3-grasos tienen un pequeño efecto o ningún efecto que promueva la inflamación.

Debido a sus propiedades positivas, en el pasado no han faltado intentos de proporcionar genes que participen en la síntesis de ácidos grasos o triglicéridos para la preparación de aceites en diferentes organismos con contenido modificado de ácidos grasos insaturados. De esta manera, en la publicación WO 91/13972 y en su equivalente estadounidense se describe una Δ -9-desaturasa. En la publicación WO 93/11245 se reivindica una Δ -15-desaturasa y en la publicación WO 94/11516 se reivindica una Δ -12-desaturasa. Otras desaturasas se describen a manera de ejemplo en las publicaciones EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 o Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659. Hasta ahora, la caracterización bioquímica de las diferentes desaturasas se ha efectuado sólo de modo insuficiente ya que las enzimas son muy difíciles de aislar y de caracterizar como proteínas enlazadas con membrana (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). La caracterización de desaturasas enlazadas con membrana se efectúa por lo regular incorporando a un organismo adecuado, el cual a continuación se investiga para actividad enzimática por medio de análisis de sustancias de partida y de producto. Las Δ -6-desaturasas se describen en las publicaciones WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO00/21557 y WO 99/27111 y la aplicación para la producción en organismos transgénicos también se describe en las publicaciones WO98/46763 WO98/46764, WO9846765. En este caso, en las publicaciones WO99/64616 o WO98/46776 también se describe y se reivindican la expresión de diferentes desaturasas y la formación de ácidos grasos poliinsaturados. Respecto de la efectividad de la expresión de las desaturasas y de su influencia en la formación de ácidos grasos poliinsaturados debe notarse que mediante la expresión de una desaturasa individual como hasta ahora se ha descrito sólo han sido logrados contenidos bajos de ácidos grasos insaturados/lípidos como, por ejemplo, ácido γ -linolénico y ácido estearidónico. Además, por lo regular ha sido obtenida una mezcla de ácidos ω -3- y ω -6-grasos.

En el pasado también se han realizado numerosos intentos de obtener genes de elongasa. Millar and Kunst, 1997 (Plant Journal 12:121-131) y Millar et al. 1999, (Plant Cell 11:825-838) describen la caracterización de elongasas vegetales para la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga (C22:1) y para la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga para la formación de cera en plantas (C₂₈-C₃₂). Descripciones sobre la síntesis de ácido araquidónico y EPA se encuentran, por ejemplo, en las publicaciones WO0159128, WO0012720, WO02077213 y WO0208401. La síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de C₂₄ se describe, por ejemplo, en Tvrdik et al 2000, JCB 149:707-717 o la publicación WO0244320.

Microorganismos particularmente adecuados para la producción de PUFAs son microorganismos tales como microalgas como *Phaeodactylum tricornutum*, especies de *Porphyridium*, especies de *Thraustochytrium*, especies de *Schizochytrium* o especies de *Cryptocodinium*, ciliados como *Stylonychia* o *Colpidium*, hongos como *Mortierella*, *Entomophthora* o *Mucor* y/o musgos como *Physcomitrella*, *Ceratodon* y *Marchantia* (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) Botanica Marina 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) Lipids 22: 1060-1062; M. Akimoto et al. (1998) Appl. Biochemistry and Biotechnology 73: 269-278). Mediante la selección de cepas ha sido desarrollada una cantidad de cepas mutantes de los microorganismos correspondientes que producen una serie de compuestos deseados, incluidos los PUFAs. La mutación selección de cepas con producción mejorada de una molécula determinada como los ácidos grasos poliinsaturados es, no obstante, un procedimiento complicado que consume mucho tiempo. Por esto, siempre que sea posible, se prefieren procedimientos de ingeniería genética tales como los descritos antes. Sin embargo, con ayuda de los microorganismos antes mencionados pueden prepararse solo cantidades limitadas de los ácidos grasos poliinsaturados deseados, como DPA, EPA o ARA. En este caso, estos se obtienen como mezclas de ácidos grasos, por ejemplo de EPA, DPA y ARA, por lo regular dependiendo del microorganismo usado.

Para la síntesis de ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) se discuten diferentes rutas de síntesis (figura 1). De esta manera se efectúa la producción de EPA o DHA en bacterias marinas tales como *Vibrio sp.* o *Shewanella sp.* De acuerdo con la ruta de policétido (Yu, R. et al. Lipids 35:1061-1064, 2000; Takeyama, H. Et al. Microbiology 143:2725-2731, 1997).

Una estrategia alternativa pasa por la actividad variable de las desaturasas y elongasas (Zank, T.K. et al. Plant Journal 31:255-268, 2002; Sakuradani, E. et al. Gene 238:445-453, 1999). Una modificación de la ruta descrita a través de Δ 6-desaturasa, Δ 6-elongasa, Δ 5-desaturasa, Δ 5-elongasa, Δ 4-desaturasa es la ruta de síntesis de Sprecher (Sprecher 2000, Biochim. Biophys. Acta 1486:219-231) en mamíferos. En lugar de la Δ 4-desaturación se efectúa aquí otra etapa de elongación a C₂₄, otra Δ 6-desaturación y finalmente una β -oxidación a la longitud de cadena de C₂₂. Para la preparación en plantas y microorganismos la ruta de síntesis llamada de Sprecher (véase la figura 1) en realidad no es adecuada puesto que los mecanismos de regulación no se conocen.

Para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como el ácido araquidónico, EPA o particularmente DHA (C22:6 n-3), tal como se infiere de la figura 1, además de las desaturasas también se requieren

5 elongasas que alargan en al menos dos átomos de carbono los ácidos grasos saturados que tienen enlaces dobles, por ejemplo en posición delta-9, delta-6 o delta-5. Según su función, se distinguen en este caso dos tipos diferentes de elongasa. Las elongasas de tipo I, que están muy difundidas en el reino animal, tienen solamente una especificidad baja de sustrato; es decir alargan una serie de ácidos grasos insaturados diferentes. Las elongasas de tipo II se caracterizan por una especificidad de sustrato muy superior. Sólo unos pocos ácidos grasos que tienen enlaces dobles en posiciones específicas son convertidos por medio de estas.

En la publicación WO 2005/012316 se describen algunas de las desaturasas y elongasas antes mencionadas. Especialmente se divulgan las primeras elongasas de tipo II en la publicación WO 2005/012316, las cuales alargan específicamente ácidos grasos que tienen un enlace doble en posición delta-5.

10 Los ácidos grasos poliinsaturados pueden dividirse en dos grandes clases en correspondencia con su patrón de desaturación: en ácidos ω -6- o ω -3-grasos, que tienen diferentes actividades desde el punto de vista metabólico y funcional (Fig. 1).

15 Como producto de partida para la ruta metabólica de ω -6 funge el ácido graso ácido linoleico (18:2 ^{Δ 9,12}), mientras que la ruta de ω -3 pasa por el ácido linolénico (18:3 ^{Δ 9,12,15}). El ácido linoleico se forma en este caso por actividad de una ω -3-desaturasa (Tocher et al. 1998, Prog. Lipid Res. 37, 73-117; Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113).

20 Los mamíferos y, por lo tanto, también el ser humano, no disponen de actividad correspondiente de desaturasa (Δ -12- y ω -3-desaturasa) y tienen que ingerir estos ácidos grasos (ácidos grasos esenciales) a través de la alimentación. Mediante la secuencia de reacciones de desaturasa y elongasa, se sintetizan luego a partir de estos precursores los ácidos grasos poliinsaturados (= ARA, 20:4 ^{Δ 5,8,11,14}) fisiológicamente importantes, un ácido ω -6-graso y los dos ácidos ω -3-grasos: ácido eicosapentaenoico (= EPA, 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ^{Δ 4,7,10,13,17,19}). La aplicación de ácidos ω -3-grasos muestra en este caso el efecto terapéutico tal como se ha descrito antes en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108), inflamaciones (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358) y artritis (Cleland y James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307).

30 Plantas superiores contienen ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3). ARA, EPA y DHA no se encuentran presentes en el aceite de las semillas de las plantas superiores, o se encuentran en forma de trazas (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Vegetales. Technique & Documentation - Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Sin embargo sería ventajoso preparar LCPUFAs en plantas superiores, preferiblemente en semillas oleaginosas como colza, linaza, girasol y soja, puesto que de esta manera podrían obtenerse de manera económica grandes cantidades de LCPUFAs de alto valor cualitativo para la industria de alimentos, la nutrición animal y para propósitos farmacéuticos. Para este propósito, los genes que codifican enzimas de la biosíntesis de LCPUFAs tienen que introducirse ventajosamente en semillas oleaginosas mediante métodos de ingeniería genética y expresarse allí. La publicación WO 2005/012316 describe una estrategia de este tipo. En la ruta descrita en la publicación WO 2005/012316 la desventaja es que el rendimiento de los ácidos grasos deseados todavía es demasiado bajo para una utilización industrial. Además, junto con los ácidos grasos deseados tales como ARA, EPA o DHA, mediante reacciones secundarias no deseadas se generan además ácidos grasos que disminuyen aún más el rendimiento y contaminan el producto resultante.

40 Por eso, un procedimiento ventajoso para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados en lo posible debe combinar en sí muchas de las siguientes propiedades:

- alta especificidad de las desaturasas y elongasas usadas para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados,
- alto desempeño de síntesis de las desaturasas y elongasas usadas,
- en lo posible síntesis sólo de uno de los ácidos grasos poliinsaturados como ARA, EPA o DHA,
- alto rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados como ARA, EPA o DHA o sus mezclas
- 45 • en lo posible, sin productos secundarios no deseados o solo cantidades muy pequeñas de estos,
- sin preparación de ácidos grasos no naturales, es decir de ácidos grasos que no existen en la naturaleza,
- síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados ventajosamente sólo en los triglicéridos.

50 Con el fin de hacer posible un enriquecimiento del alimento y de los forrajes con estos ácidos grasos poliinsaturados, existe por lo tanto una gran demanda de un procedimiento sencillo, económico para la preparación de estos ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en sistemas eucariotas.

Por lo tanto, el objetivo consistió en desarrollar un procedimiento sencillo, económico, que tenga en cuanto sea posible muchas de las propiedades ventajosas antes mencionadas. El objetivo de la invención fue además, en conexión con la preparación de ácidos grasos poliinsaturados, determinar ácidos nucleicos, proteínas, constructos génicos, vectores y organismos transgénicos útiles, preferiblemente plantas y sus partes.

5 El objetivo se logra por medio de los objetos de las reivindicaciones.

Además, se determina un procedimiento para la preparación en plantas transgénicas de ácidos grasos poliinsaturados de C_{20} o C_{22} , que tienen al menos cuatro enlaces dobles, con un contenido de al menos 15 % en peso respecto del contenido total de triglicéridos de la planta transgénica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas procedimentales:

10 a) introducir un constructo de ácido nucleico a la planta transgénica que contiene las secuencias de ácido nucleico, el cual codifica una Δ -6-desaturasa, una Δ -6-elongasa y una Δ -5-desaturasa, o

b) introducir un constructo de ácido nucleico a la planta transgénica que contiene secuencias de ácido nucleico, el cual codifica una Δ -6-desaturasa, una Δ -6-elongasa, una Δ -5-desaturasa, una Δ -12-desaturasa y ω -3-desaturasa, o

15 c) introducir un constructo de ácido nucleico a la planta transgénica, el cual codifica una Δ -6-desaturasa, una Δ -6-elongasa, una Δ -5-desaturasa, una Δ -5-elongasa y Δ -4-desaturasa, o

d) introducir un constructo de ácido nucleico a la planta transgénica que contiene secuencias de ácido nucleico, el cual codifica una Δ -6-desaturasa, una Δ -6-elongasa, una Δ -5-desaturasa, una Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, una Δ -12-desaturasa y ω -3-desaturasa, y

e) obtención de los aceites o lípidos de las plantas.

20 Los ácidos grasos poliinsaturados de C_{20} o C_{22} preparados en el procedimiento contienen ventajosamente al menos cuatro, cinco o seis enlaces dobles. Los ácidos grasos contienen de forma particularmente ventajosa cinco o seis enlaces dobles. Los ácidos grasos saturados reaccionan poco o no reaccionan con los ácidos nucleicos usados en el procedimiento. Por poco debe entenderse que en comparación con los ácidos grasos poliinsaturados, los ácidos grasos saturados reaccionan con menos de 5 % de la actividad, ventajosamente menos de 3 %, de modo particularmente ventajoso con menos de 2 %, de modo muy particularmente preferido con menos de 1; 0,5; 0,25 o 0,125 %. Estos ácidos grasos preparados pueden prepararse en el procedimiento preferiblemente como producto único o presentarse en una mezcla de ácidos grasos.

25 Las secuencias de ácido nucleico usadas en el procedimiento son secuencias de ácido nucleico aisladas, que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-desaturasa, de Δ -6-elongasa, de Δ -5-desaturasa, de Δ -5-elongasa, de Δ -4-desaturasa, de Δ -12-desaturasa y/o de ω -3-desaturasa.

En el procedimiento ventajosamente se usan las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-desaturasa, de Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa-, Δ -5-elongasa, de Δ -4-desaturasa, de Δ -12-desaturasa y/o de ω -3-desaturasa, seleccionadas del grupo que se compone de:

35 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25.

40 Los ácidos grasos poliinsaturados de C_{20} o de C_{22} , que tienen al menos cuatro enlaces dobles, preparados en el procedimiento, son de manera particularmente ventajosa los ácidos grasos ácido araquidónico (= ARA), ácido eicosapentaenoico (= EPA) o ácido docosahexaenoico (= DHA). En una forma ventajosa de realización del procedimiento, en el caso de ácidos grasos poliinsaturados de C_{20} o C_{22} , que tienen al menos cuatro enlaces dobles, se trata de ácido araquidónico. En otra forma ventajosa de realización, como ácidos grasos poliinsaturados de C_{20} o C_{22} , que tienen al menos cuatro enlaces dobles, se preparan ácido eicosapentaenoico o ácido docosahexaenoico o sus mezclas. De acuerdo con el procedimiento también pueden prepararse mezclas de ARA, EPA y DHA.

45 En el procedimiento ventajosamente en la planta transgénica se preparan el ácido araquidónico o el ácido eicosapentaenoico con un contenido de al menos 15, 16, 17, 18, 19 o 20 % en peso, preferiblemente de 25, 30, 35 o 40 % en peso, de forma particularmente preferida de 45, 50, 55 o 60 % en peso respecto del contenido total de triglicéridos.

En otra forma ventajosa de realización del procedimiento, en la planta transgénica se prepara ácido docosahexaenoico con un contenido de al menos 4, 5 o 6 % en peso, ventajosamente con un contenido de 7, 8, 9 o 10 % en peso respecto del contenido total de triglicéridos.

50 En el procedimiento, de manera particularmente ventajosa en los procedimientos debe estar presente menos de 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 o 0,1 % en peso, ventajosamente menos de 0,09; 0,08; 0,07; 0,06 o 0,05 % en peso, de modo

particularmente ventajoso menos de 0,04; 0,03; 0,02 o 0,01 % en peso respecto del contenido total de ácido graso de los triglicéridos de un ácido graso polisaturados seleccionado del grupo de ácido graso de C22:4^{Δ7,10,13,16}, C22:5^{Δ4,7,10,13,16} o C22:5^{Δ7,10,13,16,19}.

5 Los ácidos grasos poliinsaturados, preparados en el procedimiento, están enlazados ventajosamente en triacilglicéridos, pero también pueden existir como ácidos grasos libres o sino enlazados en forma de otros ésteres de ácido graso en los organismos. En tal caso pueden presentarse como "productos puros" o sino ventajosamente en forma de mezclas de diversos ácidos grasos o mezclas de diferentes glicéridos.

10 En el procedimiento se preparan ventajosamente ésteres de ácido graso con moléculas de ácido graso poliinsaturado de C₂₀ y/o C₂₂ que tienen al menos cuatro enlaces dobles en el éster de ácido graso, que tienen ventajosamente 56 enlaces dobles en el éster de ácido graso. Esto conduce a la síntesis de ácido ω-3-eicosatetraenoico (= ETA, C20:4^{Δ5,8,11,14}), ácido araquidónico (ARA, C20:4^{Δ5,8,11,14}), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5^{Δ5,8,11,14,17}), ácido ω-6-docosapentaenoico (C22:5^{Δ4,7,10,13,16}), ácido ω-6-docosatetraenoico (C22:4^{Δ7,10,13,16}), ácido ω-3-docosapentaenoico (= DPA, C22:5^{Δ7,10,13,16,19}), ácido docosahexaenoico (= DHA, C22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}) o sus mezclas, preferiblemente se preparan ARA, EPA y/o DHA. En una forma de realización particularmente preferida del procedimiento se preparan ácidos ω-6-grasos, ventajosamente el ácido araquidónico. En otra forma particularmente preferida se preparan ácidos ω-3-grasos como EPA y/o DHA.

15 En el procedimiento, de manera particularmente ventajosa se preparan, tal como se ha descrito antes, ácidos grasos poliinsaturados seleccionados del grupo de ácido ω-6-docosatetraenoico C22:4^{Δ7,10,13,16}, ácido ω-6-docosapentaenoico C22:5^{Δ4,7,10,13,16} o ácido ω-3-docosapentaenoico C22:5^{Δ7,10,13,16,19} en los triglicéridos con menos de 0,5 % en peso de los triglicéridos respecto del contenido total de ácido graso.

20 Los ésteres de ácido graso con moléculas poliinsaturadas de ácido graso de C₂₀ y/o C₂₂ pueden aislarse de los organismos que han sido usados para la preparación de ésteres de ácido graso en forma de un aceite o un líquido, por ejemplo en forma de compuestos como esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos como glicoesfingolípidos, fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerina, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos u otros ésteres de ácido graso como los ésteres de acetil-coenzima A que contienen los ácidos grasos poliinsaturados con al menos cuatro, cinco o seis, preferiblemente cinco o seis enlaces dobles; de manera ventajosa se aíslan en la forma de sus diacilglicéridos, triacilglicéridos y/o en forma de fosfatidilcolina; de modo particularmente preferido en la forma de los triacilglicéridos. Junto a estos ésteres, en los organismos, ventajosamente en las plantas, están contenidos los ácidos grasos poliinsaturados incluso como ácidos grasos libres o enlazados en otros compuestos. Por lo regular, los diferentes compuestos (ésteres de ácido graso y ácidos grasos libres) antes mencionados se encuentran presentes en los organismos en una distribución aproximada de 80 a 90 % en peso de triglicéridos, 2 a 5 % en peso de diglicéridos, 5 a 10 % en peso de monoglicéridos, 1 a 5 % en peso de ácidos grasos libres, 2 a 8 % en peso de fosfolípidos, y la suma de los diferentes compuestos se completa hasta 100 % en peso.

35 En el procedimiento, los LCPUFAs preparados, tales como el ácido araquidónico y el ácido eicosapentaenoico, se preparan con un contenido de al menos 15 % en peso, ventajosamente de al menos 16 o 17 % en peso, preferiblemente de al menos 18, 19 o 20 % en peso, de modo particularmente preferido de al menos 21, 22, 23, 24 o 25 % en peso, de modo muy particularmente preferido de al menos 26, 27, 28, 29 o 30 % en peso respecto de todos los ácidos grasos en los organismos transgénicos, ventajosamente en una planta transgénica. En tal caso, los ácidos grasos de C₁₈ y/o C₂₀ que se encuentran presentes en los organismos hospederos se convierten en al menos 10 %, ventajosamente en al menos 20 %, de modo particularmente ventajoso en al menos 30 %, de modo muy particularmente ventajoso en al menos 40 % en los productos correspondientes como ARA, EPA y/o DHA. Los ácidos grasos ventajosamente se preparan en forma enlazada. Con ayuda de los ácidos nucleicos usados en el procedimiento, estos pueden llevar a estos ácidos grasos insaturados a la posición sn1, sn2 y/o sn3 de los triglicéridos ventajosamente preparados. Puesto que en el procedimiento los compuestos de partida como el ácido linoleico (C18: 2) o el ácido linoléico (C18: 3) pasan por muchas etapas de reacción, los productos finales del procedimiento, tales como por ejemplo el ácido araquidónico (ARA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) o el ácido docosapentaenoico (DHA) no se obtienen como productos absolutamente puros; siempre se encuentran contenidas trazas pequeñas de los precursores en el producto final. Si en el organismo de partida, respectivamente en la planta de partida, se encuentran presentes por ejemplo tanto ácido linoleico como también ácido linoléico, entonces los productos finales tales como ARA, EPA o DHA por lo regular se presentan como mezclas. Los precursores, el ácido linoleico y/o el ácido linoléico, ventajosamente no deben ascender a más de 20 % en peso, preferiblemente a no más de 15 % en peso, de modo particularmente preferido a no más de 10 % en peso, de modo muy particularmente preferido a no más de 5 % en peso respecto de la cantidad del producto final respectivo. En el procedimiento, en una planta transgénica ventajosamente se preparan como productos finales solamente ARA, ARA y EPA, EPA y DHA o solamente DHA, enlazados o como ácidos libres. Si los compuestos ARA, EPA y DHA se preparan al mismo tiempo, se preparan ventajosamente en una proporción de al menos 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), ventajosamente de al menos 1:1:3, preferiblemente de 1:1:4, de modo particularmente preferido de 1:1:5. Si en el procedimiento se preparan ARA y EPA, entonces estos se preparan ventajosamente en una proporción de al menos 5:1 a al menos 1:5. Sin el procedimiento se preparan EPA y DHA, entonces estos se preparan ventajosamente en una proporción de al menos 5:1 a al menos 1:5.

Los ésteres de ácido graso y las mezclas de ácidos grasos que han sido preparados de acuerdo con el procedimiento contienen ventajosamente 6 a 15 % de ácido palmítico, 1 a 6 % de ácido esteárico; 7 - 85 % de ácido oleico; 0,5 a 8 % de ácido vaccénico, 0,1 a 1 % de ácido araquídico, 7 a 25 % de ácidos grasos saturados, 8 a 85 % de ácidos grasos monosaturados y 60 a 85 % de ácidos grasos poliinsaturados, cada caso respecto del 100 % y del contenido total de ácido graso de los organismos. Como ácido graso poliinsaturado ventajoso se encuentran contenidos en los ésteres de ácido graso o en las mezclas de ácidos grasos preferiblemente al menos 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 o 1 % de ácido araquidónico respecto del contenido total de ácido graso. Además, los ésteres de ácido graso o las mezclas de ácidos grasos, que han sido preparados de acuerdo con el procedimiento, contienen ventajosamente ácidos grasos seleccionados del grupo de los ácidos grasos ácido erúxico (ácido 13-docosaenoico), ácido estercúlico (ácido 9,10-metilen octadec-9-enoico), ácido malvático (ácido 8,9-metilen heptadec-8-enoico), ácido chaulmógrico (ácido ciclopenten-dodecanoico), ácido graso de furano (ácido 9,12-epoxi-octadeca-9,11-dienoico), ácido vernólico (ácido 9,10-epoxioctadec-12-enoico), ácido tarírico (ácido 6-octadecenoico), ácido 6-nonadecenoico, ácido santálbico (ácido t11-octadecen-9-inoico), ácido 6,9-octadeceninoico, ácido pirúlico (ácido t10-heptadecen-8-ynoico), ácido crepenínico (ácido 9-octadecen-12-inoico), ácido 13,14-dihidroorofeico, ácido octadecen-13-ene-9,11-diinoico, ácido petroselénico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 9c,12t-octadecadienoico, ácido calendúlico (ácido 8t10t12c-octadecatrienoico), ácido catálpico (ácido 9t11t13c-octadecatrienoico), ácido eleosteárico (ácido 9c11t13t-octadecatrienoico), ácido jacárico (ácido 8c10t12c-octadecatrienoico), ácido punícico (ácido 9c11t13c-octadecatrienoico), ácido parinárico (ácido 9c11t13t15c-octadecatetraenoico), ácido pinolénico (ácido all-cis-5,9,12-octadecatrienoico), ácido labalénico (ácido 5,6-octadecadienalénico), ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioléico) y/o ácido coriólico (ácido 13-hidroxi-9c,11t-octadecadienoico). Los ácidos grasos antes mencionados por lo regular se encuentran en los ésteres de ácido graso y en las mezclas de ácidos grasos preparados de acuerdo con el procedimiento ventajosamente sólo en pequeñas cantidades, es decir que se encuentran, respecto de los ácidos grasos totales, en menos de 30 %, preferiblemente menos de 25 %, 24 %, 23 %, 22 % o 21 %, de modo particularmente preferido menos de 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 %, de modo muy particularmente preferido menos de 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. Los ésteres de ácido graso y las mezclas de ácidos grasos preparados de acuerdo con el procedimiento contienen menos de 0,1 % respecto de los ácidos grasos totales o nada de ácido butírico, de colesterol, de ácido clupanodónico (= ácido docosapentaenoico, C22:5^{Δ4,8,12,15,21}) así como nada de ácido nisínico (ácido tetracosahexaenoico, C23:6^{Δ3,8,12,15,18,21}).

Mediante las secuencias de ácido nucleico acorde con la invención o las secuencias de ácido nucleico usadas en el procedimiento, puede alcanzarse un incremento del rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados de al menos 50 %, ventajosamente de al menos 80 %, de modo particularmente ventajoso de al menos 100 %, de modo muy particularmente ventajoso de al menos 150 % frente a las plantas no transgénicas como *Arabidopsis*, linaza, colza, soja o *Camelina* cuando se compara por medio de análisis de cromatografía de gases.

También pueden prepararse ácidos grasos poliinsaturados químicamente puros, o composiciones de ácido graso, de acuerdo con los procedimientos previamente descritos. Con este fin se aíslan los ácidos grasos o las composiciones de ácidos grasos de la planta de manera conocida, por ejemplo mediante extracción, destilación, cristalización, cromatografía o combinaciones de estos métodos. Estos ácidos grasos químicamente puros, o composiciones de ácidos grasos, son ventajosos para aplicaciones en el campo de la industria de alimentos, de la industria de cosméticos y particularmente en la industria farmacéutica.

Como organismo para la preparación en el procedimiento se toman en consideración teóricamente todas las plantas. De manera ventajosa en el procedimiento se usan plantas oleaginosas o plantas de cultivos agrícolas. Como plantas se toman en consideración teóricamente todas las plantas que son capaces de sintetizar ácidos grasos tales como todas las plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas, algas o musgos. Ventajosamente se seleccionan plantas del grupo de las familias vegetales Adolotheciaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Cryptocodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae o plantas hortalizas o plantas ornamentales tales como *Tagetes*.

A manera de ejemplo pueden mencionarse las siguientes plantas seleccionadas del grupo: Adolotheciaceae como las especies *Physcomitrella* por ejemplo la especie *Physcomitrella patens*, Anacardiaceae como las especies y géneros *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium* por ejemplo la especie *Pistacia vera* [pistacho], *Mangiferindica* [mango] o *Anacardium occidentale* [marañón], Asteraceae como las especies *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cynara*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana* por ejemplo la especie *Calendula officinalis* [caléndula de jardín], *Carthamus tinctorius* [cártamo, safflower], *Centaurea cyanus* [aciano], *Cichorium intybus* [achicoria, usillo], *Cynara scolymus* [alcachofa], *Helianthus annuus* [girasol], *Lactuca sativa*, *Lactuca crispa*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola* L. ssp. *sativa*, *Lactuca scariola* L. var. *integrata*, *Lactuca scariola* L. var. *integrifolia*, *Lactuca sativa* subsp. *romana*, *Locusta communis*, *Valeriana locusta* [lechuga], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* o *Tagetes tenuifolia* [damasquina], Apiaceae como la especie *Daucus* por ejemplo la especie *Daucus carota* [zanahoria], Betulaceae como la especie *Corylus* por ejemplo las especies *Corylus avellana* o *Corylus colurna* [avellana], Boraginaceae como la especie *Borago* por ejemplo la especie y género *Borago officinalis* [borraja], Brassicaceae como las especies *Brassica*, *Camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabidopsis* por ejemplo las especies y géneros *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [colza], *Sinapis arvensis* *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var.

crispifolia, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Camelina sativa*, *Melanosinapis communis* [mostaza], *Brassica oleracea* [remolacha forrajera] o *Arabidopsis thaliana*, *Bromeliaceae* como las especies *Anana*, *Bromelia* (piña) por ejemplo las especies y géneros *Anana comosus*, *Ananas ananas* o *Bromelia comosa* [piña], *Caricaceae* como la especie *Carica* como la especie y género *Carica papaya* [papaya], *Cannabaceae* como la especie *Cannabis* como la especie y género *Cannabis sativa* [cáñamo], *Convolvulaceae* como las especies *Ipomea*, *Convolvulus* por ejemplo las especies y géneros *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* o *Convolvulus panduratus* [patata dulce, batata], *Chenopodiaceae* como la especie *Beta* como las especies y géneros *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *Vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* o *Beta vulgaris* var. *esculenta* [remolacha de azúcar], *Crypthecodiniaceae* como la especie *Crypthecodinium* por ejemplo la especie y género *Crypthecodinium cohnii*, *Cucurbitaceae* como la especie *Cucurbita* por ejemplo las especies y géneros *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* o *Cucurbita moschata* [calabaza], *Cymbellaceae* como las especies *Amphora*, *Cymbella*, *Okedenia*, *Phaeodactylum*, *Reimeria* por ejemplo la especie y género *Phaeodactylum tricornutum*, *Ditrichaceae* como las especies *Ditrichaceae*, *Astomiopsis*, *Ceratodon*, *Chrysoblastella*, *Ditrichum*, *Distichium*, *Eccremidium*, *Lophidion*, *Philibertiella*, *Pleuridium*, *Saelania*, *Trichodon*, *Skottsbergia* por ejemplo las especies y géneros *Ceratodon antarcticus*, *Ceratodon columbiae*, *Ceratodon heterophyllum*, *Ceratodon purpurascens*, *Ceratodon purpureus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *convolutus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *stenocarpus*, *Ceratodon purpureus* var. *rotundifolius*, *Ceratodon ratodon*, *Ceratodon stenocarpus*, *Chrysoblastella chilensis*, *Ditrichum ambiguum*, *Ditrichum brevisetum*, *Ditrichum crispatissimum*, *Ditrichum difficile*, *Ditrichum falcifolium*, *Ditrichum flexicaule*, *Ditrichum giganteum*, *Ditrichum heteromallum*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum pusillum*, *Ditrichum pusillum* var. *tortile*, *Ditrichum rhynchostegium*, *Ditrichum schimperi*, *Ditrichum tortile*, *Distichium capillaceum*, *Distichium hagenii*, *Distichium inclinatum*, *Distichium macounii*, *Eccremidium floridanum*, *Eccremidium whiteleggei*, *Lophidion strictus*, *Pleuridium acuminatum*, *Pleuridium alternifolium*, *Pleuridium holdridgei*, *Pleuridium mexicanum*, *Pleuridium ravenelii*, *Pleuridium subulatum*, *Saelania glaucescens*, *Trichodon borealis*, *Trichodon cylindricus* o *Trichodon cylindricus* var. *oblongus*, *Elaeagnaceae* como la especie *Elaeagnus* por ejemplo la especie y género *Olea europaea* [oliva], *Ericaceae* como la especie *Kalmia* por ejemplo las especies y géneros *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*, *Kalmia microphylla*, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros* o *Kalmia lucida* [laurel de la sierra], *Euphorbiaceae* como las especies *Manihot*, *Janipha*, *Jatropha*, *Ricinus* por ejemplo las especies y géneros *Manihot utilissima*, *Janipha manihot*, *Jatropha manihot*, *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta* [yuca] o *Ricinus communis* [ricino], *Fabaceae* como las especies *Pisum*, *Albizia*, *Cathormion*, *Feuillea*, *Inga*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Mimosa*, *Medicago*, *Glycine*, *Dolichos*, *Phaseolus*, soja por ejemplo las especies y géneros *Pisum sativum*, *Pisum arvense*, *Pisum humile* [guisante], *Albizia berteriana*, *Albizia julibrissin*, *Albizia lebbeck*, *Acacia berteriana*, *Acacia littoralis*, *Albizia berteriana*, *Albizia berteriana*, *Cathormion berteriana*, *Feuillea berteriana*, *Inga fragrans*, *Pithecolobium berterianum*, *Pithecolobium fragrans*, *Pithecolobium berterianum*, *Pseudalbizia berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Feuillea julibrissin*, *Mimosa julibrissin*, *Mimosa speciosa*, *Sericanrda julibrissin*, *Acacia lebbeck*, *Acacia macrophylla*, *Albizia lebbeck*, *Feuillea lebbeck*, *Mimosa lebbeck*, *Mimosa speciosa* [árbol de la seda], *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago varia* [alfalfa] *Glycine max* *Dolichos* soja, *Glycine gracilis*, *Glycine hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida* o *Soja max* [semillas de soja], *Funariaceae* como las especies *Aphanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*, *Physcomitrella*, *Physcomitrium* por ejemplo las especies y géneros *Aphanorrhagma serratum*, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*, *Entosthodon californicus*, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entosthodon leibergii*, *Entosthodon neostoticus*, *Entosthodon rubrisetus*, *Entosthodon spathulifolius*, *Entosthodon tucsoni*, *Funaria americana*, *Funaria bolanderi*, *Funaria calcarea*, *Funaria californica*, *Funaria calvescens*, *Funaria convoluta*, *Funaria flavicans*, *Funaria groutiana*, *Funaria hygrometrica*, *Funaria hygrometrica* var. *arctica*, *Funaria hygrometrica* var. *calvescens*, *Funaria hygrometrica* var. *convoluta*, *Funaria hygrometrica* var. *muralis*, *Funaria hygrometrica* var. *utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria microstoma* var. *obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria plano-convexa*, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubriseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonora*, *Funaria sublimbatus*, *Funaria tucsoni*, *Physcomitrella californica*, *Physcomitrella patens*, *Physcomitrella readeri*, *Physcomitrium australe*, *Physcomitrium californicum*, *Physcomitrium collenchymatum*, *Physcomitrium coloradense*, *Physcomitrium cupuliferum*, *Physcomitrium drummondii*, *Physcomitrium eurystomum*, *Physcomitrium flexifolium*, *Physcomitrium hookeri*, *Physcomitrium hookeri* var. *serratum*, *Physcomitrium immersum*, *Physcomitrium kellermanii*, *Physcomitrium megalocarpum*, *Physcomitrium pyriforme*, *Physcomitrium pyriforme* var. *serratum*, *Physcomitrium rufipes*, *Physcomitrium sandbergii*, *Physcomitrium subsphaericum*, *Physcomitrium washingtoniense*, *Geraniaceae* como las especies *Pelargonium*, *Cocos*, *Oleum* por ejemplo las especies y géneros *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* o *Oleum cocois* [coco], *Gramineae* como la especie *Saccharum* por ejemplo la especie y género *Saccharum officinarum*, *Juglandaceae* como las especies *Juglans*, *Wallia* por ejemplo la especie y géneros *Juglans regia*, *Juglans ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*, *Juglans californica*, *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* o *Wallia nigra* [nuez de nogal], *Lauraceae* como las especies *Persea*, *Laurus* por ejemplo las especies y géneros *Laurus nobilis* [laurel], *Persea americana*, *Persea gratissima* o *Persea persea* [aguacate], *Leguminosae* como la especie *Arachis* por ejemplo la especie y género *Arachis hypogaea* [cacahuete], *Linaceae* como las especies *Linum*, *Adenolinum* por ejemplo las especies y géneros *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense* o *Linum trigynum* [lino], *Lythraeae* como la especie *Punica* por ejemplo la especie y género *Punica granatum* [granada],

Malvaceae como las especies *Gossypium* por ejemplo las especies y géneros *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* o *Gossypium thurberi* [algodón], *Marchantiaceae* como la especie *Marchantia* por ejemplo las especies y géneros *Marchantia berteroana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, *Musaceae* como la especie *Musa* por ejemplo las especies y géneros *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa spp.* [banana], *Onagraceae* como las especies *Camissonia*, *Oenothera* por ejemplo las especies y géneros *Oenothera biennis* o *Camissonia brevipes* [onagra], *Palmae* como la especie *Elaeis* por ejemplo la especie y género *Elaeis guineensis* [palma de aceite], *Papaveraceae* como la especie *Papaver* por ejemplo las especies y géneros *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [amapola], *Pedaliaceae* como la especie *Sesamum* por ejemplo la especie y género *Sesamum indicum* [ajonjolí], *Piperaceae* como las especies *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia* por ejemplo las especies y géneros *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [pimienta de Cayena], *Poaceae* como las especies *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (maíz), *Triticum* por ejemplo las especies y los géneros *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*, *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon.*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [cebada], *Secale cereale* [centeno], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua var. sativa*, *Avena hybrida* [avena], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arinaceum*, *Sorghum caffrorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum*, *Panicum militaceum* [mijo], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [arroz], *Zea mays* [maíz] *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* o *Triticum vulgare* [trigo], *Porphyridiaceae* como las especies *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodorus*, *Vanhoeffenia* por ejemplo la especie y género *Porphyridium cruentum*, *Proteaceae* como la especie *Macadamia* por ejemplo la especie y género *Macadamia intergrifolia* [macadamia], *Prasinophyceae* como las especies *Nephroselmis*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus* por ejemplo las especies y géneros *Nephroselmis olivacea*, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, *Rubiaceae* como la especie *Coffea* por ejemplo las especies y géneros *Coffea spp.*, *Coffea arabica*, *Coffea canephora* o *Coffea liberica* [café], *Scrophulariaceae* como la especie *Verbascum* por ejemplo las especies y géneros *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* o *Verbascum thapsus* [verbasco], *Solanaceae* como las especies *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* por ejemplo las especies y géneros *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum var. glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [pimienta], *Capsicum annuum* [pimienta de España], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris* [tabaco], *Solanum tuberosum* [patata], *Solanum melongena* [berenjena] *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum.*, *Lycopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum* [tomate], *Sterculiaceae* como la especie *Theobroma* por ejemplo la especie y género *Theobroma cacao* [cacao] o *Theaceae* como la especie *Camellia* por ejemplo la especie y género *Camellia sinensis* [té].

En el procedimiento se usan plantas transgénicas como plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas. De modo particularmente ventajoso, en el procedimiento se usan plantas oleaginosas que contienen grandes cantidades de compuestos de líquido, tales como cacahuete, colza, canola, girasol, cártamo (*Carthamus tinctoria*), amapola, cáñamo, mostaza, ricino, oliva, ajonjolí, caléndula, *Punica*, onagra, verbasco, cardo, rosa silvestre, avellana, almendra, macadamia, aguacate, laurel, calabaza, lino, soja, pistacho, borraja, árboles (palma de aceite, coco o nuez de nogal), o se usan plantas útiles como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, yuca, pimienta, *Tagetes*, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies *Vicia*, guisantes, alfalfa o plantas arbustivos (café, cacao, té), especies *Salix*. Plantas preferidas acorde con la invención son plantas oleaginosas como cacahuete, colza, canola, girasol, cártamo, amapola, mostaza, cáñamo, ricino, oliva, caléndula, *Punica*, onagra, calabaza, lino, soja, borraja, árboles (palma de aceite, coco). De modo particular se prefieren plantas ricas en ácidos grasos de C18:2 y/o C18:3 como girasol, cártamo, tabaco, verbasco, ajonjolí, algodón, calabaza, amapola, onagra, nuez de nogal, lino, mostaza, cardo o cártamo. De modo muy particular se prefieren plantas como cártamo, girasol, amapola, onagra, nuez de nogal, avellana, lino o mostaza.

En teoría, en el procedimiento para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados pueden usarse ventajosamente todos los genes del metabolismo de ácido graso o del líquido en combinación con las Δ -6-desaturasa(s), Δ -6-elongasa(s), Δ -5-desaturasa(s), Δ -5-elongasa(s), Δ -4-desaturasa(s), Δ -12-desaturasa(s) y/o ω -3-desaturasa(s) de la invención [en el contexto de esta solicitud, el plural debe incluir el singular y viceversa]. Ventajosamente se usan genes del metabolismo de ácido graso o de lípidos seleccionados del grupo de acilo-coA-deshidrogenasa(s), acilo-ACP[= acyl carrier protein o proteína soporte de acilo]-desaturasa(s), acilo-ACP-tioesterasa(s), acilo-transferasa(s) de ácido graso, acilo-CoA:lisofosfolípido-aciltransferasas, sintasa(s) de ácido graso, hidroxilasa(s) de ácido graso, acetil-coenzima A-carboxilasa(s), acilo-coenzima A-oxidasa(s), desaturasa(s) de ácido graso, acetilenasas de ácido graso, lipoxigenasas, triacilglicerol-lipasas, sintasas de alenóxido, liasas de hidroperóxido o elongasa(s) de ácido graso en combinación con las Δ -6-desaturasa(s), Δ -6-elongasa(s), Δ -5-desaturasa(s), Δ -5-elongasa(s), Δ -4-

desaturasa(s), Δ -12-desaturasa(s) y/o ω -3-desaturasa(s); en este caso pueden usarse genes individuales o varios genes en combinación.

Además de la producción de ácidos grasos de partida para las Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y una ω -3-desaturasa usadas en el procedimiento directamente en el organismo, los ácidos grasos también pueden alimentarse desde afuera. Por razones de costes, se prefiere la producción en el organismo. Sustratos preferidos son el ácido linoleico (C18:2 ^{Δ 9,12}), y/o el ácido γ -linolénico (C18:3 ^{Δ 6,9,12}).

Para incrementar el rendimiento en el procedimiento descrito para la preparación de aceites y/o triglicéridos con un contenido ventajosamente elevado de ácidos grasos poliinsaturados, es ventajoso incrementar la cantidad de producto de partida para la síntesis de ácido graso; esto puede lograrse, por ejemplo, introduciendo en el organismo un ácido nucleico que codifica un polipéptido con Δ -12-desaturasa. La Δ -12-desaturasa que se usa en el proceso según la invención convierte ventajosamente el ácido oleico (C18:1 ^{Δ 9}) en ácido linoleico (C18:2 ^{Δ 9,12}) o C18:2 ^{Δ 6,9} en C18:3 ^{Δ 6,9,12} (= GLA). De esta manera se proporcionan más productos de partida ácido linoleico (C18:2 ^{Δ 9,12}) y ácido γ -linolénico (C18:3 ^{Δ 6,9,12}) para la síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados. Esto es particularmente ventajoso en organismos productores de aceite como los de la familia de las *Brassicaceae* como los de la especie *Brassica* por ejemplo colza; de la familia de las *Elaeagnaceae* como la especie *Elaeagnus* por ejemplo la especie y género *Olea europaea* o de la familia *Fabaceae* como de la especie *Glycine* por ejemplo la especie y género *Glycine max*, que presentan un alto contenido de ácido oleico. Puesto que estos organismos presentan sólo un contenido bajo de ácido linoleico (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681), es ventajoso el uso de las mencionadas Δ -12-desaturasas para la preparación del producto de partida, ácido linoleico.

Los ácidos nucleicos usados en el procedimiento provienen ventajosamente de plantas como algas, por ejemplo algas de la familia de las *Prasinophyceae* como de las especies *Heteromastix*, *Mammella*, *Mantoniella*, *Micromonas*, *Nephroselmis*, *Ostreococcus*, *Prasinocladus*, *Prasinococcus*, *Pseudoscourfieldia*, *Pycnococcus*, *Pyramimonas*, *Scherffelia* o *Tetraselmis* como de las especies y géneros *Heteromastix longifillis*, *Mamiella gilva*, *Mantoniella squamata*, *Micromonas pusilla*, *Nephroselmis olivacea*, *Nephroselmis pyriformis*, *Nephroselmis rotya*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus* sp. *Prasinocladus ascus*, *Prasinocladus lubricus*, *Pycnococcus provasolii*, *Pyramimonas amyliifera*, *Pyramimonas disomata*, *Pyramimonas obovata*, *Pyramimonas orientalis*, *Pyramimonas parkeae*, *Pyramimonas spinifera*, *Pyramimonas* sp., *Tetraselmis apiculata*, *Tetraselmis carteriformis*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis convolutae*, *Tetraselmis desikacharyi*, *Tetraselmis gracilis*, *Tetraselmis hazeni*, *Tetraselmis impellucida*, *Tetraselmis inconspicua*, *Tetraselmis levis*, *Tetraselmis maculata*, *Tetraselmis marina*, *Tetraselmis striata*, *Tetraselmis subcordiformis*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis tetrabrachia*, *Tetraselmis tetrathele*, *Tetraselmis verrucosa*, *Tetraselmis verrucosa* fo. *Rubens* o *Tetraselmis* sp. Los ácidos nucleicos usados provienen ventajosamente de algas de la especie *Ostreococcus*. Otros organismos ventajosos son tierras diatomeas como *Thalassiosira*, *Phaeodactylum* o *Thraustochytrium* u hongos como *Thraustochytrium* o *Phytophthora*.

En el procedimiento, las secuencias de ácido nucleico antes mencionadas o sus derivados u homólogos que codifican polipéptidos ventajosamente todavía poseen la actividad enzimática de las proteínas codificadas por las secuencias de ácido nucleico. Estas secuencias son clonadas individualmente o en combinación con las secuencias que codifican la Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa en constructos de expresión y se usan para la introducción y para la expresión en las plantas. Gracias a su construcción, estos constructos de expresión permiten una síntesis óptima ventajosa de los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el procedimiento.

En una forma preferida de realización, el procedimiento comprende además el paso de la obtención de una célula o de una planta entera que contiene las secuencias de ácido nucleico usadas en el procedimiento, en cuyo caso se transforman la célula y/o la planta con una secuencia de ácido nucleico que codifica la Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa, un constructo génico o un vector, tal como se describen a continuación, solas o en combinación con otras secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas del metabolismo de ácido graso o de lípidos. En otra forma preferida de realización, este procedimiento comprende además el paso de la obtención de los aceites, lípidos o ácidos grasos libres de la célula o de la planta. El cultivo puede ser, por ejemplo, un cultivo de fermentación, por ejemplo en el caso del cultivo de células vegetales o un invernadero o cultivo de campo de una planta. La célula generada de esta manera o la planta generada de esta manera es ventajosamente una célula de un organismo productor de aceite como una planta oleaginosa tal como, por ejemplo, cacahuete, colza, canola, lino, cáñamo, cacahuete, soja, cártamo, cáñamo, girasol o borraja.

Por cultivo se entiende, por ejemplo, el cultivo en el caso de células, tejidos u órganos vegetales sobre o en un medio nutritivo o de toda la planta sobre o en un sustrato, por ejemplo en hidrocultivo, en tierra de maceta o en un suelo agrícola.

En el sentido de la invención, "transgénico" o "recombinante" significa con respecto a, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión (= constructo génico) o un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico acorde con la invención o un organismo transformado con las secuencias de ácido nucleico, casete de expresión o

vector acorde con la invención todas aquellas construcciones realizadas mediante métodos de ingeniería genética en las cuales

a) la secuencia de ácido nucleico según la invención, o

5 b) una secuencia genética de control, funcionalmente conectada con la secuencia de ácido nucleico según la invención, por ejemplo promotor, o

c) (a) y (b)

10 no se encuentran en su ambiente natural, genético o han sido modificados mediante métodos de ingeniería genética, en cuyo caso la modificación puede ser, por ejemplo una sustitución, adición, supresión, inversión o inserción de uno o de varios residuos de nucleótido. Ambiente natural genético significa el locus natural genómico o cromosómico en el organismo de origen o la existencia en una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica, al menos parcialmente de preferencia se retiene el ambiente natural, genético de la secuencia de ácido nucleico. El ambiente flaquea la secuencia de ácido nucleico al menos por un lado y tiene una longitud de secuencia de al menos 50 bp, de preferencia al menos 500 bp, de modo particularmente preferido al menos 1000 bp, de modo muy particularmente preferido al menos 5000 bp. Un casete de expresión que existe naturalmente, por ejemplo la combinación existente naturalmente del promotor natural de las secuencias de ácido nucleico acorde con la invención con los correspondientes genes de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa se modifica en un casete de expresión transgénico si este cambia por medio de un procedimiento no natural, sintético ("artificial") como, por ejemplo, un tratamiento mutagénico. Procedimientos correspondientes se encuentran descritos, por ejemplo, en las publicaciones US 5,565,350 o WO 00/15815.

20 Por plantas transgénicas en el sentido de la invención, tal como se ha mencionado antes, debe entenderse que los ácidos nucleicos usados en el procedimiento no están en su sitio natural en el genoma de la planta; en tal caso, los ácidos nucleicos pueden expresarse de manera homóloga o heteróloga. Pero transgénico también significa, tal como se ha mencionado, que los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se encuentran en su sitio natural en el genoma de la planta, aunque la secuencia cambie frente a la secuencia natural y/o que las secuencias de regulación de las secuencias naturales hayan cambiado. Por transgénicas se entiende preferiblemente la expresión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en sitios no naturales en el genoma; es decir que se presenta una expresión homóloga o preferiblemente heteróloga de los ácidos nucleicos.

30 Como organismos hospederos para los ácidos nucleicos, el casete de expresión o el vector usados en el procedimiento en teoría son adecuadas todas las plantas que son capaces de sintetizar ácidos grasos, especialmente ácidos grasos insaturados o que son adecuadas para la expresión de genes recombinantes. Ejemplos son plantas como *Arabidopsis*, Asteraceae como *Calendula* o plantas de cultivo como soja, cacahuete, ricino, girasol, maíz, algodón, lino, colza, coco, palma de aceite, cártamo (*Carthamus tinctorius*) o almendra de cacao. Se prefieren plantas que pueden sintetizar de manera natural aceites en grandes cantidades, tales como soja, colza, coco, palma de aceite, cártamo, lino, mostaza, ricino, caléndula, cacahuete, almendra de cacao o girasol.

En el contexto de la invención las plantas incluyen células vegetales y determinados tejidos, órganos y partes de plantas en todas sus formas de manifestación, tales como anteras, fibras, pelo radicular, tallos, embriones, callos, cotiledones, peciolos, material cosechado, tejidos vegetales, tejidos reproductivos y cultivos celulares que se derivan de las plantas propiamente transgénicas y/o que se pueden usar para producir las plantas transgénicas.

40 Las plantas transgénicas que comprenden los ácidos grasos poliinsaturados, sintetizados en el procedimiento, pueden comercializarse de manera ventajosa en forma directa sin tener que aislar los aceites, lípidos o ácidos grasos sintetizados. Por plantas en el procedimiento se entienden plantas completas tales como todas las partes de la planta, órganos de la planta o partes de la planta como hojas, tallos, semillas, raíces, tubérculos, anteras, fibras, pelo radicular, tallos, embriones, callos, cotiledones, peciolos, material cosechado, tejidos vegetales, tejidos reproductivos, cultivos celulares que se derivan de las plantas transgénicas y/o usan para producir las plantas transgénicas. La simiente comprende aquí todas las partes de la simiente tales como vainas, células epidérmicas y de semillas, endospermo y tejido embrional. Pero los compuestos preparados en el procedimiento también pueden aislarse de los organismos, ventajosamente de plantas, en forma de sus aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres. Los ácidos grasos poliinsaturados preparados mediante este procedimiento pueden obtenerse cosechando los organismos ya sea del cultivo en el cual crecen o del campo. Esto puede efectuarse mediante prensado o extracción de las partes de la planta, preferiblemente de las semillas de la planta. En tal caso, los aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres pueden obtenerse prensando mediante el llamado golpeado en frío o prensado en frío sin introducir calor. Para permitir que las partes de la planta, especialmente las semillas, se abran más fácilmente, estas se triturar previamente, se evaporan o tuestan. Las semillas tratadas previamente de esta manera pueden pensarse a continuación o extraerse con disolventes tales como hexano caliente. A continuación el disolvente se retira. De esta manera, pueden aislarse más del 96 % de los compuestos preparados en el procedimiento. A continuación, los productos obtenidos de esta manera son tratados adicionalmente, es decir son refinados. En tal caso, primero se retiran, por ejemplo, los murciélagos vegetales y las sustancias suspendidas. La

remoción de mucílagos puede efectuarse de modo enzimático o, por ejemplo, de modo químico/físico adicionando ácido, tal como ácido fosfórico. A continuación, los ácidos grasos libres se retiran tratando con una base, por ejemplo hidróxido de sodio. Para retirar el álcali remanente en el producto, el producto obtenido se lava cuidadosamente con agua y se seca. Con el fin de retirar los colorantes contenidos todavía en el producto, los productos se someten a un blanqueamiento, por ejemplo, con una tierra de blanqueo o carbón activado. Al final, el producto se desodoriza con vapor de agua, por ejemplo.

Una forma de realización es el uso de los aceites, lípidos, ácidos grasos y/o de la composición de ácido graso que se haya producido de acuerdo con el procedimiento o los que se hayan obtenido mezclando estos aceites, lípidos y/o ácidos grasos con aceites, lípidos o ácidos grasos de origen animal, microbiano o vegetal, en productos de alimento para animales, productos de alimento para humanos, productos cosméticos o farmacéuticos. Los aceites, lípidos, ácidos grasos preparados en el procedimiento pueden usarse de manera conocida por el experto en la materia para mezclarse con otros aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos de origen animal, como por ejemplo aceites de pescado.

Por el término "aceite", "lípidos" o "grasa" se entiende una mezcla de ácidos grasos que contiene ácido(s) insaturados, saturados, de preferencia esterificados, ventajosamente enlazados en triglicéridos. Se prefiere que el aceite, el lípidos o la grasa tengan una alta fracción de ácido(s) poliinsaturado(s) libre(s) o ventajosamente esterificado(s), principalmente ácido linoleico, ácido γ linoléico, ácido dihomo- γ -linoléico, ácido araquidónico, ácido α -linoléico, ácido estearidónico, ácido eicosatetraenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico, de manera particularmente ventajosa ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico o ácido docosahexaenoico. La fracción de ácidos grasos insaturados esterificados es de aproximadamente 30 %, más preferiblemente es una fracción de 50 %, aún más preferiblemente es una fracción de 60 %, 70 %, 80 % o más. Para la determinación, la fracción de ácido graso puede determinarse mediante cromatografía de gases, por ejemplo, transfiriendo los ácidos grasos a los ésteres metílicos mediante transesterificación. El aceite, el lípidos o la grasa pueden contener otros ácidos grasos saturados o insaturados, por ejemplo ácido calendúlico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, etc. Dependiendo del organismo de partida principalmente, puede variar la fracción de los diferentes ácidos grasos en el aceite o la grasa.

Los ácidos grasos poliinsaturados, preparados en el procedimiento, que tienen ventajosamente al menos cuatro enlaces dobles, tal como se ha descrito antes son, por ejemplo, esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos u otros ésteres de ácido graso, preferiblemente triacilglicéridos.

A partir de los ácidos grasos poliinsaturados preparados en el procedimiento que tienen ventajosamente al menos cinco o seis enlaces dobles, los ácidos grasos poliinsaturados contenidos pueden liberarse y aislarse mediante un tratamiento con álcali, por ejemplo, con KOH o NaOH, por ejemplo, o mediante hidrólisis ácida ventajosamente en presencia de un alcohol como metanol o etanol o mediante una disociación enzimática, por medio de separación de fases, por ejemplo, y acidificación subsiguiente por medio de H_2SO_4 , por ejemplo. La liberación de los ácidos grasos también puede efectuarse directamente sin el tratamiento previamente descrito.

Los ácidos nucleicos usados en el procedimiento, después de introducirse en un organismo, pueden encontrarse ventajosamente en una célula vegetal o en una planta ya sea sobre un plásmido separado o integrados ventajosamente en el genoma de la célula hospedera. Al integrarse al genoma, la integración puede ser aleatoria puede efectuarse por medio de recombinación de modo que el gen nativo se reemplace por la copia introducida, por lo cual se modula por parte de la célula la producción del compuesto deseado, o usando un gen en trans de modo que el gen está unido funcionalmente a una unidad de expresión funcional que contiene al menos una secuencia que garantiza la expresión de un gen y al menos una secuencia que garantiza la poliadenilación de un gen funcionalmente transcrito. Los ácidos nucleicos se introducen a los organismos mediante cassettes de multiexpresión o constructos para la expresión multiparalela, ventajosamente a las plantas para la expresión, multiparalela específica de semillas, de genes.

Los musgos y las algas son los únicos sistemas vegetales conocidos que preparan cantidades considerables de ácidos grasos poliinsaturados, como ácido araquidónico (ARA) y/o ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). Los musgos contienen PUFAs en lípidos de membrana mientras que las algas, los organismos relacionados con las algas y algunos hongos también acumulan cantidades considerables de PUFAs en la fracción de triacilglicerina. Por lo tanto, son adecuadas las moléculas de ácido nucleico que se aíslan de tales cepas, que también acumulan PUFAs en la fracción de triacilglicerina, de modo particularmente ventajoso para el procedimiento y, por lo tanto, para la modificación del sistema de producción de lípidos y de PUFA en un hospedero, principalmente en plantas, tales como plantas oleaginosas, por ejemplo colza, canola, lino, mostaza, soja, girasol, borraja. Por lo tanto pueden usarse ventajosamente en el procedimiento.

Como sustratos de los ácidos nucleicos usados en el procedimiento, que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y ω -3-desaturasa, y/o los otros ácidos nucleicos usados tales como los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos del metabolismo de ácido graso o de lípidos, seleccionados del grupo acilo-CoA-deshidrogenasa(s), acilo-ACP[= acil carrier protein]-

- desaturasa(s), acilo-ACP-tioesterasa(s), ácido graso-acilo-transferasa(s), acilo-CoA:lisofosfolípido-aciltransferasa(s), ácido graso-sintasa(s), ácido graso-hidroxilasa(s), acetil-coenzima A-carboxilasa(s), acilo-coenzima A-oxidasa(s), ácido graso-desaturasa(s), ácido graso-acetilenasa(s), lipoxigenase(s), triacilglicerol-lipasa(s), alenóxido-sintasa(s), hidroperóxido-liasa(s) o ácido graso-elongasa(s) son ventajosamente adecuados los ácidos grasos de C₁₆, C₁₈ o C₂₀.
- 5 En calidad de sustratos en el procedimiento, se prefieren los ácidos grasos convertidos en forma de sus ésteres de acilo-CoA y/o sus ésteres de fosfolípido.
- Para la prepración de los PUFAs de cadena larga, los ácidos grasos poliinsaturados de C₁₈ tienen que desnaturalizarse primero por medio de la actividad enzimática de una desaturasa y a continuación tiene que alargarse en al menos dos átomos de carbono por medio de una elongasa. Después de un ciclo de elongación, esta actividad enzimática conduce a ácidos grasos de C₂₀ y después de dos ciclos de elongación a ácidos grasos de C₂₂. La actividad de las desaturasas y elongasas usadas en los procedimientos conduce a ácidos grasos de C₂₀ y/o de C₂₂ con al menos cuatro enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente a ácidos grasos de C₂₀ con al menos cuatro enlaces dobles, de modo particularmente preferido a ácidos grasos de C₂₀ y/o C₂₂ con al menos cinco o seis enlaces dobles, de modo muy particularmente preferido con seis enlaces dobles en la molécula. Como productos del procedimiento particularmente se prefieren: el ácido araquidónico, y el ácido eicosapentaenoico y/o el docosahesaenoico. Los ácidos grasos de C₂₀ y/o C₂₂ con al menos cuatro enlaces dobles en el ácido graso pueden alargarse mediante la actividad enzimática acorde con la invención en forma de los ácidos grasos libres o en forma de los ésteres tales como fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, monoacilglicerina, diacilglicerina o triacilglicerina.
- 10 La actividad de las desaturasas y elongasas usadas en los procedimientos conduce a ácidos grasos de C₂₀ y/o de C₂₂ con al menos cuatro enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente a ácidos grasos de C₂₀ con al menos cuatro enlaces dobles, de modo particularmente preferido a ácidos grasos de C₂₀ y/o C₂₂ con al menos cinco o seis enlaces dobles, de modo muy particularmente preferido con seis enlaces dobles en la molécula. Como productos del procedimiento particularmente se prefieren: el ácido araquidónico, y el ácido eicosapentaenoico y/o el docosahesaenoico. Los ácidos grasos de C₂₀ y/o C₂₂ con al menos cuatro enlaces dobles en el ácido graso pueden alargarse mediante la actividad enzimática acorde con la invención en forma de los ácidos grasos libres o en forma de los ésteres tales como fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, monoacilglicerina, diacilglicerina o triacilglicerina.
- 15 El sitio preferido de biosíntesis de los ácidos grasos, aceites, lípidos o grasas en las plantas ventajosamente usadas es, por ejemplo, en términos generales en las semillas o en las capas celulares de las semillas, de modo que es concebible una expresión específica para la semilla de los ácidos nucleicos usados en el procedimiento. Sin embargo, es claro que la biosíntesis de ácidos grasos, aceites o lípidos no tiene que limitarse al tejido de las semillas sino también puede efectuarse, de manera específica al tejido, en todas las partes restantes de la planta, por ejemplo en las células epidérmicas o en los tubérculos.
- 20 Usando los ácidos nucleicos de la invención que codifican una Δ -6-desaturasa, una Δ -6-elongasa, una Δ -5-desaturasa, una Δ -12-desaturasa y una ω -3-desaturasa, los ácidos grasos poliinsaturados preparados en el procedimiento pueden incrementarse al menos el 5 %, preferiblemente en al menos 10 %, de modo particularmente preferido en al menos 20 % y de modo muy particularmente preferido en al menos 50 % frente a la planta de tipo silvestre que no contiene los ácidos nucleicos de modo recombinante.
- 25 Gracias al procedimiento, los ácidos grasos poliinsaturados preparados en las plantas usadas en el procedimiento pueden incrementarse de dos maneras. La combinación de ácidos grasos poliinsaturados libres y/o la fracción de los ácidos grasos poliinsaturados esterificados, producidos por medio del procedimiento, puede incrementarse ventajosamente. Gracias al procedimiento, la combinación de ácidos grasos poliinsaturados esterificados se incrementa ventajosamente en las plantas transgénicas.
- 30 Los ácidos grasos obtenidos en el procedimiento también son adecuados como material de partida para la síntesis química de otros productos valiosos. Por ejemplo, pueden usarse en combinación entre sí, o solos para la preparación de fármacos, productos alimenticios, alimentos para animales o cosméticos.
- Otro objeto son secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-desaturasa, seleccionadas del grupo de:
- 35 a) una secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia representada en SEQ ID NO: 1,
- b) secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 2, o
- c) los derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 1 que codifica polipéptidos con al menos 70 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 2 y presentan una actividad de Δ -6-desaturasa.
- 40 Otro objeto son secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-elongasa, seleccionadas del grupo de:
- a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7,
- b) secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, o
- 50 c) derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 que codifican polipéptidos con al menos 70 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 y presentan una actividad de Δ -6-elongasa.

Otro objeto son secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -5-desaturasa seleccionadas del grupo de:

a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 9,

b) secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 10, o

5 c) derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 9 que codifican polipéptidos con al menos 40 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 10 y presentan una actividad de Δ -5-desaturasa.

Otro objeto son secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de ω -3-desaturasa, seleccionadas del grupo:

a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 23,

10 b) secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 24, o

c) derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 23 que codifican polipéptidos con al menos 40 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 24 y presentan una actividad de ω -3-desaturasa.

Otro objeto son secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -12-desaturasa, seleccionadas del grupo de:

15 a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 25, o

b) secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 26, o

c) derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 25 que codifican polipéptidos con al menos 40 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 26 y presentan una actividad de Δ -12-desaturasa.

20 Otro objeto de la invención son constructos génicos que contienen secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 25 de acuerdo con la invención, en cuyo caso el ácido nucleico se encuentra enlazado funcionalmente con una o varias señales de regulación. Adicionalmente, otros genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de sustancia lipídica seleccionados del grupo de CoA-deshidrogenasa(s) de acilo, ACP[= acyl carrier protein]-desaturasa(s) de acilo, ACP-tioesterasa(s) de acilo, transferasa(s) de acilo-ácido graso, CoA:lisofofolípido de acilo- transferasa(s) de acilo, sintasa(s) de ácido graso, hidroxilasa(s) de ácido graso, A-carboxilasa(s) de acetilo-coenzima, A-oxidasa(s) de acilo-coenzima, desaturasa(s) de ácido graso, acetilenasas de ácido graso, lipoxigenasas de ácido graso, lipasas de triacilglicerol, sintasas de alenóxido, liasas de hidroperóxido o elongasa(s) de ácido graso pueden estar contenidos en el constructo génico. Adicionalmente ventajosamente se encuentran contenidos genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de sustancia lipídica seleccionados del grupo de la Δ -4-desaturasa, Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa o Δ -5-elongasa.

30 Todas las secuencias de ácido nucleico usadas en el procedimiento provienen ventajosamente de un organismo, tal como una planta o un microorganismo. Las secuencias de ácido nucleico provienen preferiblemente de algas como *Ostreococcus*, hongos como *Phytophthora* o diatomeas como *Thalassiosira*.

35 Las secuencias de ácido nucleico usadas en el procedimiento, que codifican proteínas con actividad de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa, se introducen ventajosamente solas o preferiblemente en combinación en un casete de expresión (= constructo de ácido nucleico), que hace posible la expresión de los ácidos nucleicos en una planta. En el constructo de ácido nucleico pueden estar contenidas más de una secuencia de ácido nucleico de una actividad enzimática tal como, por ejemplo, de una Δ -6-desaturasa, de una Δ -6-elongasa, de una Δ -5-desaturasa, de una Δ -5-elongasa, de una Δ -4-desaturasa, de una Δ -12-desaturasa y/o de una ω -3-desaturasa.

40 Para la introducción, los ácidos nucleicos usados en el procedimiento se someten ventajosamente, de manera conocida, a una amplificación y a una ligazón. De preferencia, se procede de conformidad con el protocolo de la polimerasa de Pfu-ADN o de una mezcla de polimerasa de Pfu/Taq-ADN. Los cebadores se seleccionan de conformidad con la secuencia que va a amplificarse. De manera conveniente, el/los cebador(es) se seleccionan de tal manera que el amplificado comprende toda la secuencia codogénica del codón de inicio hasta el codón de parada. Después de la amplificación se analiza el amplificado de manera adecuada. Por ejemplo, el análisis puede efectuarse después de la separación por electroforesis respecto de la calidad y de la cantidad. Después de esto, el amplificado puede purificarse de acuerdo con un protocolo estándar (por ejemplo Qiagen). Una alícuota del amplificado purificado se encuentra disponible luego para la subsiguiente clonación. Vectores de clonación adecuados son conocidos en términos generales por el experto en la materia. Estos incluyen principalmente

45

50 vectores que son replicables en sistemas microbianos, es decir ante todo vectores que garantizan una clonación eficiente en levaduras u hongos, y hacen posible la transformación estable de plantas. Pueden mencionarse

principalmente diferentes sistemas de vector, adecuados para la transformación mediada por T-ADN, binarios y cointegrados. Sistemas de vector de este tipo por lo regular se caracterizan porque incluyen al menos los genes vir necesarios para la transformación mediada por *Agrobacterium* así como las secuencias de limitantes de T-ADN (T-ADN). De preferencia, estos sistemas de vectores también comprenden otras regiones cis-reguladoras, tales como

5 promotores y terminadores y/o marcadores de selección con los cuales pueden identificarse organismos transformados de manera correspondiente. Mientras que en el caso de sistemas co-integrados de vector los genes vir y las secuencias de T-ADN están dispuestos en el mismo vector, los sistemas binarios se basan en al menos dos vectores de los cuales uno porta genes vir, pero ningún T-ADN y un segundo porta T-ADN aunque ningún gen vir. De esta manera, los últimos vectores son relativamente pequeños, fáciles de manipular y de replicar tanto en *E.-coli*

10 como también en *Agrobacterium*. Estos vectores binarios incluyen vectores de las series pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. De acuerdo con la invención preferiblemente se usan Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV y pCAMBIA. Un resumen de vectores binarios y su uso es dado por Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446-451. Para la preparación de vector los vectores pueden linealizarse primero con endonucleasa(s) de restricción y luego modificarse enzimáticamente de manera adecuada. A continuación, el vector se purifica y se emplea una alícuota para la clonación. En la clonación el amplificado, enzimáticamente cortado y purificado en caso de requerirse, es clonado con fragmentos de vector preparados de modo similar con el empleo de ligasa. En este caso, un constructo de ácido nucleico o un constructo de vector o de plásmido determinados pueden presentar uno o incluso varios segmentos de gen codogénicos. Los segmentos de gen codogénicos se encuentran preferiblemente conectados funcionalmente en estos constructos consecuencias reguladoras. Las secuencias reguladoras incluyen

15 principalmente secuencias vegetales tales como los promotores y terminadores antes descritos. Los constructos pueden propagarse de manera estable ventajosamente en microorganismos, principalmente *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, en condiciones selectivas y permitir una transferencia de ADN heterólogo en plantas o microorganismos.

Usando ventajosamente los vectores de clonación, los ácidos nucleicos usados en el procedimiento, los ácidos nucleicos de la invención y los constructos de ácido nucleico se introducen en los organismos, tales como en microorganismos o ventajosamente en plantas y por lo tanto se usan en la transformación de la planta, como aquellas que se divulgan y se citan en: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), capítulo 6/7, páginas 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, volumen 1, Engineering and Utilization, editores: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, editores: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225). Los ácidos nucleicos usados en el procedimiento, los ácidos nucleicos de la invención y los constructos de ácidos nucleicos y/o vectores pueden usarse para modificación mediante ingeniería genética de un amplio espectro de organismos, ventajosamente de plantas de modo que estas se vuelven productores mejores y/o más eficientes de PUFAs.

25

30

35

Existe una serie de mecanismos por medio de los cuales es posible una modificación de la proteína de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -12-desaturasa y ω -3-desaturasa así como de las otras proteínas usadas en el procedimiento tales como las proteínas de Δ -5-elongasa o Δ -4-desaturasa, de modo que el rendimiento, la producción y/o la eficiencia de la producción de los ácidos grasos ventajosamente poliinsaturados en una planta, preferiblemente en una planta oleaginosa, pueden influenciarse directamente debido a esta proteína modificada. La cantidad o la actividad de las proteínas o genes de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y ω -3-desaturasa pueden incrementarse de tal modo que se preparen cantidades mayores de los productos génicos y, por lo tanto, en últimas cantidades mayores de los ácidos poliinsaturados preparados en el procedimiento que tienen al menos cuatro enlaces dobles. También es posible una síntesis de novo en una planta que carece de la actividad y la capacidad para la biosíntesis de compuestos antes de la introducción del/de los gen/genés correspondiente(s). Esto aplica de manera análoga para la combinación con otras desaturasas o elongasas u otras enzimas del metabolismo de ácido graso y de lípidos. El uso de diferentes secuencias divergentes, es decir de secuencias diferentes a nivel de secuencia de ADN, también puede ser ventajoso en este caso o el uso de promotores para la expresión génica que permite otra expresión génica temporal dependiendo, por ejemplo, del grado de madurez de una semilla o del tejido que acumula aceite.

40

45

50

Introduciendo un gen de Δ -6-desaturasa, un gen de Δ -6-elongasa, un gen de Δ -5-desaturasa, un gen de Δ -5-elongasa, un gen de Δ -4-desaturasa, un gen de Δ -12-desaturasa y/o un gen de Δ -3-desaturasa en una planta, sólo o en combinación con otros genes en una célula puede incrementar no solo el flujo de la biosíntesis hacia el producto final, sino también puede incrementar la composición de triacilglicerina correspondiente o crearla de novo. La cantidad o la actividad de otros genes igualmente pueden incrementarse en la importación de nutrientes que se necesitan para la biosíntesis de uno o varios ácidos grasos, aceites, lípidos polares y/o neutros, de modo que se incrementa la concentración de estos precursores, cofactores o compuestos intermedios dentro de las células o dentro de los compartimientos de almacenamiento, por lo cual sigue mejorando la capacidad de las células para producción de PUFAs, tal como se describe en lo sucesivo. Optimizando la actividad o incrementando la cantidad de uno o varios genes de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa, que participan en la biosíntesis de estos compuestos, o destruyendo la actividad de uno o varios genes que participan en la síntesis de estos compuestos, puede ser posible incrementar el rendimiento, la producción y/o la eficiencia de la producción de moléculas de ácido graso y de lípidos.

55

60

Las moléculas de ácido nucleico aisladas, usadas en el procedimiento, codifican proteínas o partes de estas, en cuyo caso las proteínas o la proteína individual o las partes de la misma contienen una secuencia de aminoácidos que es suficientemente homóloga a una secuencia de aminoácidos que se representa en las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26, de tal modo que las proteínas o partes de las mismas todavía presentan una actividad de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa. De preferencia, las proteínas o las partes de la misma que son codificadas por la molécula de ácido nucleico/de las moléculas de ácido nucleico todavía tienen su actividad enzimática y la capacidad de participar en el metabolismo de compuestos necesarios para la síntesis de membranas celulares o corpúsculos de lípido en plantas o en el transporte de moléculas a través de estas membranas. Las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico son idénticas ventajosamente en al menos aproximadamente 40 %, de preferencia al menos aproximadamente 50 % o 60 % y más preferiblemente en al menos aproximadamente 70 %, 80 % o 90 % y de la manera más preferida en al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26. En el contexto de la invención, por homología o por homólogos debe entenderse identidad o idénticos.

La homología fue calculada por toda la región de aminoácidos o de secuencias de ácido nucleico. El experto en la materia tiene a disponibilidad una serie de programas que se basan en diferentes algoritmos para la comparación de diferentes secuencias. En tal caso, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman proporcionan resultados particularmente confiables. Para la comparación de secuencias fue usado el programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) o los programas Gap y BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) y Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), los cuales están contenidos en el paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU 53711 (1991)]. Los valores de homología de secuencia indicados en porcentaje fueron determinados con el programa GAP por toda la región de secuencias con las siguientes configuraciones: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 y Average Mismatch: 0.000. Sino se indica algo diferente, estas configuraciones siempre se han usado como configuraciones estándar para comparaciones de secuencia.

Por actividad enzimática esencial de las Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa usadas en el procedimiento debe entenderse que estas todavía presentan, frente a las proteínas/enzimas codificadas por la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 y sus derivados, en comparación, al menos una actividad enzimática de al menos 10 %, preferiblemente 20 %, de modo particularmente preferido 30 % y muy particularmente 40 % y, por lo tanto, pueden participar en el metabolismo de los compuestos necesarios para la síntesis de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, tales como diacilglicéridos y/o triacilglicéridos, en una planta o en las células vegetales, o en el transporte de moléculas a través de membranas, en cuyo caso se tienen en cuenta cadenas de carbono de C₂₀ o de C₂₂ en la molécula de ácido graso que tienen enlaces dobles en al menos cuatro, cinco o seis posiciones.

Los ácidos nucleicos que pueden usarse ventajosamente en el procedimiento provienen de bacterias, hongos, diatomeas, animales, tales como *Caenorhabditis* o *Oncorhynchus* o plantas tales como algas o musgos, tales como de las especies *Shewanella*, *Physcomitrella*, *Thraustochytrium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Ceratodon*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Isochrysis*, *Aleurita*, *Muscarioides*, *Mortierella*, *Borago*, *Phaeodactylum*, *Cryptocodinium*, especialmente de las especies y géneros *Oncorhynchus mykiss*, *Thalassiosira pseudonona*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus sp.*, *Ostreococcus tauri*, *Euglena gracilis*, *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Fusarium gramineum*, *Cryptocodinium cohnii*, *Ceratodon purpureus*, *Isochrysis galbana*, *Aleurita farinosa*, *Thraustochytrium sp.*, *Muscarioides vialii*, *Mortierella alpina*, *Borago officinalis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Caenorhabditis elegans* o de modo particularmente ventajoso de *Oncorhynchus mykiss*, *Thalassiosira pseudonona* o *Cryptocodinium cohnii*.

Como alternativa en el procedimiento pueden usarse secuencias de nucleótidos que codifican una Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa y que hibridan ventajosamente en condiciones severas con una secuencia de nucleótidos tal como se representa en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25.

Las secuencias de ácido nucleico usadas en el procedimiento se introducen ventajosamente en un casete de expresión que permite la expresión de los ácidos nucleicos en organismos como microorganismos o plantas.

En tal caso, las secuencias de ácido nucleico que codifican la Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa, se conectan funcionalmente con una o más señales de regulación, ventajosamente para incrementar la expresión génica. Estas secuencias reguladoras deben permitir la expresión dirigida de los genes y de la expresión de proteína. Esto puede significar, por ejemplo, dependiendo de

la planta hospedera, que el gen se expresa y/o se sobreexpresa sólo después de inducción, o que se expresa y/o se sobreexpresa inmediatamente. Estas secuencias reguladoras son, por ejemplo, secuencias a las que se enlazan inductores o represores y regulan de esta manera la expresión del ácido nucleico. Adicional a estas nuevas secuencias de regulación o en lugar de estas secuencias, la regulación natural de estas secuencias todavía puede estar presente antes de los genes estructurales propios y, dado el caso, puede haber sido modificada genéticamente de modo que la regulación natural se elimina y la expresión de los genes se ha incrementado. Pero el casete de expresión (= constructo de expresión = constructo génico) también puede sintetizarse de manera más sencilla; es decir que no se han insertado señales de regulación adicionales antes de la secuencia de ácido nucleico o sus derivados y el promotor natural no ha sido retirado con su regulación. En lugar de esto, la secuencia de regulación natural ha mutado de tal manera que ya no se efectúa una regulación y/o no se intensifican la expresión génica. Estos promotores modificados también pueden introducirse en forma de secuencias parciales (= promotor con partes de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención) solos antes del gen natural para intensificar la actividad. Además, ventajosamente, el constructo génico también puede contener una o varias de las llamadas "secuencias promotoras" funcionalmente conectadas con el promotor, las cuales hacen posible una expresión elevada de la secuencia de ácido nucleico. En el extremo 3' de las secuencias de ADN también pueden insertarse secuencias ventajosas adicionales como otros elementos reguladores o terminadores. Los genes de Δ -6-desaturasa-, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa pueden estar contenidos en una o varias copias en el casete de expresión (= constructo génico). De manera ventajosa, respectivamente se encuentra presente sólo una copia de los genes en el casete de expresión. Este constructo génico o los constructos génicos pueden expresarse juntos en la planta hospedera. En este caso, el constructo génico o los constructos génicos pueden insertarse en uno o varios vectores y pueden estar presentes libremente en la célula o sino pueden insertarse en el genoma. Para la inserción de otros genes en el genoma hospedero es ventajoso si los genes que se van a expresar se encuentran presentes juntos en un constructo génico.

En este caso, las secuencias reguladoras o los factores reguladores pueden influir positivamente, tal como se ha descrito antes, de preferencia en la expresión génica de los genes introducidos y de esta manera incrementarla. De esta manera puede efectuarse un refuerzo de los elementos reguladores, de manera ventajosa al nivel de transcripción usando señales fuertes de transcripción como promotores y/o "enhancer". Además, también es posible una intensificación de la traducción mejorando la estabilidad del ARNm, por ejemplo.

Otra forma de realización de la invención son uno o varios constructos génicos. Los constructos génicos pueden contener una o varias secuencias que se definen mediante SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 o sus derivados y codifican polipéptidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26. Las mencionadas proteínas de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa conducen en este caso de manera ventajosa a una desaturación o elongación de ácidos grasos, en cuyo caso el sustrato presenta ventajosamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles presenta ventajosamente 18, 20 o 22 átomos de carbono en la molécula de ácido graso. Lo mismo se aplica para sus homólogos, derivados o análogos que se encuentran unidos funcionalmente a una o varias señales de regulación, ventajosamente para incrementar la expresión génica.

Las secuencias ventajosas de regulación que pueden usarse para la preparación de las secuencias de ácido nucleico usadas en el procedimiento y para su introducción subsiguiente en plantas, se presentan por ejemplo en promotores tales como el promotor *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *SP6*, λ -PR o λ -PL y se aplican ventajosamente en bacterias Gram-negativas. Otras secuencias ventajosas de regulación se presentan, por ejemplo, en los promotores Gram-positivos *amy* y *SPO2*, en los promotores de levadura o de hongo *ADC1*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* o en los promotores vegetales *CaMV/35S* [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294], *PRP1* [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* o en el promotor de ubiquitina o faseolina. En este contexto igualmente de manera ventajosa se encuentran promotores inducibles, tales como los promotores descritos en las publicaciones EP-A-0 388 186 (inducibles por sulfonamida de bencilo), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., inducibles por tetraciclina), EP-A-0 335 528 (inducible por ácido abscísico) o WO 93/21334 (inducible por etanol o ciclohexenol). Otros promotores vegetales adecuados son el promotor de *FBPasa* citosólica o el promotor *ST-LSI* de la patata (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), el promotor de la fosforibosilpírofosfatamidotransferasa de *glycine max* (Número de acceso del Genbank U87999) o el promotor específico de nodos descrito en la publicación EP-A-0 249 676. Promotores particularmente ventajosos son promotores que hacen posible la expresión en tejidos que participan en la biosíntesis de ácidos grasos. Muy particularmente ventajosos son los promotores específicos de semillas tal como el promotor *USP* de acuerdo con la realización pero también otros promotores como el promotor de *LeB4*, *DC3*, faseolina o napina. Otros promotores particularmente ventajosos son promotores específicos de semillas que pueden usarse para plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas y que se describen en las publicaciones US 5.608.152 (promotor de napina de colza), WO 98/45461 (promotor de oleosina de *Arabidopsis*), US 5.504.200 (promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris*), WO 91/13980 (promotor *Bce4* de *Brassica*), de Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233-239 (promotor *LeB4* de una leguminosa), en cuyo caso estos promotores son adecuados para dicotiledóneas. Los siguientes promotores son adecuados, por ejemplo, para monocotiledóneas: promotor *lpt-2* o *lpt-1* de la cebada (publicaciones

WO 95/15389 y WO 95/23230), promotor de hordeina de la cebada y otros promotores adecuados, descritos en la publicación WO 99/16890.

5 En teoría es posible usar todos los promotores naturales juntos con sus secuencias reguladoras tales como las mencionadas antes para el nuevo procedimiento. Igualmente es posible ventajoso usar promotores sintéticos, en adición o solos, particularmente si son mediadores de una expresión específica de semillas, tal como se describe por ejemplo en la publicación WO 99/16890.

10 Con el fin de lograr un contenido particularmente alto de PUFAs antes en plantas transgénicas, los genes de biosíntesis de PUFA deben expresarse ventajosamente en plantas oleaginosas de modo específico para las semillas. Con este fin, pueden usarse promotores específicos para semillas o aquellos promotores que son activos en el embrión y/o en la endosperma. En teoría pueden aislarse promotores específicos de semillas tanto de las plantas dicotiledóneas como de las monocotiledóneas. Promotores ventajosos preferidos se listan a continuación: USP (= desconocido seed protein o proteína desconocida de semilla) y vicilina (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., Mol. Gen Genet., 1991, 225(3)], napina (colza) [US 5,608,152], proteína portadora de acilo (colza) [US 5.315.001 y WO 92/18634], oleosina (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 y WO 93/20216], faseolina (*Phaseolus vulgaris*) [US 15 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], leguminosas B4 (promotor de LegB4) [Bäumlein et al., Plant J., 2,2, 1992], Lpt2 y Lpt1 (cebada) [WO 95/15389 y WO95/23230], promotores específicos de semilla a partir de arroz, maíz y trigo [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 y aleuraina [US 5.677.474], Bce4 (colza) [US 5.530.149], glicinina (soja) [EP 571 741], fosfoenol-piruvatcarboxilasa (soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (soja) [WO 98/08962], isocitratliasa (colza) [US 5,689,040] o α -amilasa (cebada) [EP 781 849].

20 La expresión génica vegetal también puede facilitarse mediante un promotor químicamente inducible (véase un resumen en Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Los promotores químicamente inducibles son particularmente adecuados cuando se desea que la expresión génica deba tener lugar de una manera específica en el tiempo. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) y un promotor inducible por etanol.

25 Con el fin de asegurar la integración estable de los genes de biosíntesis a la planta transgénica por varias generaciones, cada uno de los ácidos nucleicos que codifican la Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa, y que se usan en el procedimiento deben expresarse bajo el control de un promotor separado, preferiblemente un promotor que difiere de los otros promotores, puesto que los motivos de secuencia de repetición pueden conducir a la inestabilidad del ADN-T o a eventos de recombinación. En este caso, el casete de expresión se construye ventajosamente de tal manera que un promotor es seguido por un sitio de disociación adecuado, ventajosamente en un polylinker (poli-conector), para inserción del ácido nucleico que va expresarse y, si es apropiado, se posiciona una secuencia terminadora detrás del polylinker. Esta secuencia se repite varias veces, preferiblemente tres, cuatro o cinco veces de modo que hasta 30 cinco genes puedan combinarse en un constructo e introducirse a la planta transgénica con el fin de expresarse. La secuencia se repite ventajosamente hasta tres veces o tantas veces como se requiere. Para para la expresión, las secuencias de ácido nucleico se insertan detrás del promotor por medio de un sitio de corte adecuado, por ejemplo en el polylinker. De manera ventajosa, cada secuencia de ácido nucleico tiene su propio promotor y, dado el caso, su propio terminador. Constructos ventajosos de este tipo se divulgan a manera de ejemplo en las publicaciones DE 10102337 o DE 10102338. Pero también es posible insertar varias secuencias de ácido nucleico detrás de un 35 promotor y, dado el caso, antes de un terminador. En este caso, el sitio de inserción o la secuencia de los ácidos nucleicos insertados en el casete de expresión no son de importancia decisiva, es decir que una secuencia de ácido nucleico pueda insertarse en la primera o en la última posición en el casete sin que su expresión se vea influenciada esencialmente por esto. En el casete de expresión pueden usarse ventajosamente diferentes promotores tales como, por ejemplo, el promotor de USP, LegB4 o DC3 y diferentes terminadores. Pero también es posible usar sólo un tipo de promotor en el casete. Sin embargo, esto puede conducir a eventos de recombinación no deseados.

45 Como se ha descrito antes, la transcripción de los genes que han sido introducidos debe terminarse ventajosamente por secuencias terminadoras adecuadas en el extremo 3' de los genes de biosíntesis que han sido introducidos (detrás del codón de parada). Un ejemplo de una secuencia que puede usarse en este contexto es la secuencia terminadora OCS1. Tal como es el caso con los promotores, deben usarse diferentes secuencias terminadoras para cada gen.

50 Tal como se ha descrito antes, el constructo génico también puede comprender otros genes que van a introducirse en los organismos. Es posible y ventajoso introducir y expresar en las plantas hospederas genes de regulación tales como genes para inductores, represores o enzimas que debido a su actividad enzimática intervienen en la 55 regulación de uno o más genes de una ruta de biosíntesis. Estos genes pueden ser de origen heterólogo o de origen homólogo. Además, otros genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido pueden estar presentes ventajosamente en un constructo de ácido nucleico o un constructo génico; sin embargo, estos genes también pueden encontrarse en otro o en varios otros constructos de ácido nucleico. Los genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido que se usan ventajosamente son un gen seleccionado del grupo que 60 consiste en CoA-deshidrogenasa(s) de acilo, ACP[= acyl carrier protein]-desaturasa(s) de acilo, ACP-tioesterasa(s)

de acilo, transferasa(s) de ácido graso-acilo, acilo-CoA:Lisofosfolípido-aciltransferasa(s), sintasa(s) de ácido graso, hidroxilasa(s) de ácido graso, A-carboxilasa(s) de coenzima de acetilo, coenzima A-oxidasa(s) acilo, desaturasa(s) de ácido graso, acetilasa(s) de ácido graso, lipoxigenasa(s) de ácido graso, lipasa(s) de triacilglicerol, sintasa(s) de alenóxido, liasa(s) de hidroperóxido o elongasa(s) de ácido graso o sus combinaciones. Secuencias de ácido nucleico particularmente ventajosas son genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido, seleccionados del grupo de la acilo-CoA:lisofosfolípido-aciltransferasa, Δ -4-desaturasa, Δ -8-desaturasa, Δ -5-elongasa y/o Δ -9-elongasa.

En este caso, los ácidos nucleicos o genes antes mencionados pueden clonarse en casete de expresión como aquellos mencionados antes, en combinación con otras elongasas y desaturasas, y usarse para transformar plantas con la ayuda de *Agrbacterium*.

Aquí los factores o las secuencias reguladoras, tal como se han descrito antes, tienen preferiblemente efecto positivo, y por lo tanto incrementan la expresión de los genes que han sido introducidos. Por lo tanto, una intensificación de los elementos reguladores puede tener lugar ventajosamente a nivel transcripcional usando señales fuertes de transcripción tales como promotores y/o "enhancer". Sin embargo, una intensificación de la traducción también es posible, por ejemplo mejorando la estabilidad del ARNm. En teoría, los casetes de presión pueden usarse directamente para introducción a las plantas o sino para introducirse en un vector.

Estos vectores ventajosos, preferiblemente vectores de expresión, comprenden los ácidos nucleicos que codifican la Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa y que se usan en el procedimiento, o un constructo de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico usado ya sea solo o en combinación con otros genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido, tales como las acilo-CoA:lisofosfolípido-aciltransferasas, Δ -4-desaturasas, Δ -8-desaturasas, Δ -5-elongasas y/o Δ -9-elongasas. Tal como se usa aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al cual está enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", un bucle de ADN bicatenario circular con el cual pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en cuyo caso segmentos adicionales de ADN pueden ligarse al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera a la cual han sido introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos con origen de replicación bacteriana). Otros vectores se integran ventajosamente en el genoma de una célula hospedera cuando se introducen a la célula hospedera y de esta manera se replican junto con el genoma hospedero. Además, determinados vectores pueden controlar la expresión de genes con los cuales se encuentran enlazados de manera funcional. Estos vectores se denominan aquí "vectores de expresión". Habitualmente, los vectores de expresión que son adecuados para las técnicas de recombinación de ADN tienen la forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" pueden usarse de modo intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector que se usa de modo más frecuente. Sin embargo, la invención también pretende cubrir otras formas de vectores de expresión tales como los vectores virales, los cuales ejercen funciones similares. Además, el término "vector" también debe abarcar otros vectores que son conocidos por el experto en la materia, tales como fatuos, virus como SV40, CMV, TMV, transposones, elementos IS, fásmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineales o circulares.

Los vectores de expresión recombinantes que se usan ventajosamente en el procedimiento comprende los ácidos nucleicos descritos más adelante o el constructo génico descrito antes en una forma que es adecuada para expresar los ácidos nucleicos usados en una célula hospedera, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes comprende una o más secuencias reguladoras seleccionadas sobre la base de las células hospederas usadas para la expresión; la(s) secuencia(s) reguladora(s) está(n) enlazada(s) funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico que va expresarse. En un vector de expresión recombinante, "enlazado de manera funcional" significa que la secuencia de nucleótidos de interés esta enlazada con la secuencia(s) reguladora(s) de tal manera que es posible la expresión de la secuencia de nucleótidos y están enlazadas entre sí de tal manera que ambas secuencias desempeñan la función predicha que se atribuye a la secuencia (por ejemplo en un sistema de transcripción/traducción in vitro, o en una célula hospedera si el vector se introduce a la célula hospedera). El término "secuencia reguladora" debe comprender promotores, enhancer y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Estas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzimology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), o véase: Gruber y Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, editores: Glick y Thompson, capítulo 7, 89-108, incluyendo las referencias citadas allí. Las secuencias reguladoras comprenden aquellas que controlan la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula hospedera y aquellas que controlan la expresión directa de la secuencia de nucleótidos solamente en células hospederas específicas en condiciones específicas. El experto en la materia conoce que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedera que va a transformarse, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc.

Los vectores de expresión recombinantes usados puede diseñarse para la expresión de Δ -6-desaturasas, Δ -6-elongasas, Δ -5-desaturasas, Δ -5-elongasas, Δ -4-desaturasas, Δ -12-desaturasas y/o ω -3-desaturasas en células procariontas o eucariotas. Esto es ventajoso puesto que los pasos intermedios de la construcción del vector se llevan a cabo con frecuencia en microorganismos para mayor simplicidad. Por ejemplo, los genes de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa en células

bacterianas, células de insectos (usando vectores de expresión de Baculovirus), células de levaduras y otras células de hongos (véase Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", en: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, editores, páginas 396-428: Academic Press: San Diego; y van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F., et al., editores, páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falcitore et al., 1999, *Marine Biotechnology*.1, 3:239-251), usando vectores en un método de transformación tal como se describe en la publicación WO 98/01572, y preferiblemente en células de plantas multicelulares (véase Schmidt, R. y Willmitzer, L. (1988) "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*:583-586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, capítulo 6/7, páginas 71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, vol. 1, Engineering and Utilization, editores: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225 (y las referencias citadas allí)). Células hospederas adecuadas se discuten además en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Como una alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse in vitro, usando por ejemplo secuencias reguladoras de promotor T7 y polimerasa T7.

En la mayoría de los casos, la expresión de proteínas en procariontes se efectúa con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que controlan la expresión de proteínas de fusión o de no fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos son, entre otros, pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., y Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), en los cuales se fusionan S-transferasa de glutatona (GST), proteína que enlaza maltosa E y proteína A con la proteína objetivo recombinante.

Ejemplos de vectores adecuados inducibles de expresión de *E. coli* son, entre otros, pTrc (Amann et al. (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11 d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión del gen objetivo a partir del vector pTrc se basa en la transcripción por la polimerasa de ARN del hospedero de un promotor de fusión híbrido-trp-lac. La expresión del gen objetivo desde el vector pET11 d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7-gn10-lac que es proporcionado por una polimerasa de ARN viral (T7 gn1). Esta polimerasa viral es proporcionada por las cepas hospederas BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) por un λ -profago residente que alberga un gen T7 gn1 bajo el control de transcripción del promotor lacUV 5.

Otros vectores que son adecuados para organismos procariontes son conocidos por el experto en la materia; estos vectores son, por ejemplo, en *E. coli* pLG338, pACYC184, la serie pBR, como pBR322, la serie pUC, tales como pUC18 o pUC19, la serie M113mp, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 o pBdCl, en *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en *Bacillus* pUB110, pC194 o pBD214, en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667.

En otra forma de realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para expresión en la levadura *S. cerevisiae* comprenden pYeDesaturasac1 (Baldari et al. (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) así como pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y procedimientos para la construcción de vectores que son adecuados para usar en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, comprenden aquellos que se describen detalladamente en: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", en: *Applied Molecular Genetics of fungi*, J.F. Peberdy et al., editores, páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, o en: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Editores, páginas 396-428: Academic Press: San Diego]. Otros vectores adecuados de levadura son, por ejemplo, pAG-1, YEep6, YEep13 o pEMBLYe23.

Como una alternativa, la Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa pueden expresarse en células de insecto usando vectores de expresión de Baculovirus. Los vectores de Baculovirus que se encuentran disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo células Sf9) comprenden la serie pAc (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Los vectores antes mencionados son sólo un pequeño resumen de vectores adecuados que son posibles. Otros plásmidos se conocen por parte del experto en la materia y se describe, por ejemplo, en: *Cloning Vectors* (Editores Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariontes y eucariotas véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Finalmente los genes de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa pueden expresarse en células vegetales o en plantas completas (por ejemplo

espermatofitos tales como cultivos agrícolas). Ejemplos de vectores vegetales de expresión comprenden aquellos que se describen detalladamente en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., y Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; y Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721; *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; en: *Transgenic Plants*, vol. 1, Engineering and Utilization, Editores: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, páginas 15-38.

Un casete de expresión vegetal contiene preferiblemente secuencias reguladoras que son capaces de controlar la expresión de genes en células vegetales y que están enlazadas de modo funcional de tal manera que cada secuencia puede desempeñar su función tal como una terminación de la transcripción, por ejemplo señales de poliadenilación. Señales de poliadenilación preferidas son aquellas que se derivan de ADN T de *Agrobacterium tumefaciens*, tal como el gen 3 del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984) 835ff.), que se conoce como sintasa de octopina equivalentes funcionales de la misma, pero todas las otras secuencias terminadoras que están funcionalmente activas en plantas también son adecuadas.

Puesto que la expresión del gen vegetal con mucha frecuencia no se limita al nivel de transcripción, un casete de expresión vegetal contiene preferiblemente otras secuencias que están enlazadas de manera funcional, tal como los enhancers de traducción, por ejemplo la secuencia de overdrive, que intensifica la secuencia líder no traducida 5' del virus mosaico del tabaco, la cual incrementa la proporción de proteínas/ARN (Gallie et al., 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711).

Tal como se ha descrito antes, la expresión del gen vegetal tiene que estar enlazada de modo funcional con un promotor adecuado que realiza la expresión del gen en el momento correcto, de una manera específica para la célula o para el tejido. Los promotores útiles son promotores constitutivos (Benfey et al., *EMBO J.* 8 (1989) 2195-2202), como aquellos que se derivan de virus vegetales tales como 35S CAMV (Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (véase también US 5352605 y WO 84/02913) o promotores vegetales tales como el promotor de la subunidad pequeña del Rubisco, la cual se describe en la publicación US 4,962,028.

Otras secuencias preferidas para usar en el enlace funcional en casetes de expresión del gen vegetal son secuencias targeting (de selección de un objetivo), que se requieren para controlar el producto génico en su compartimiento celular correspondiente (véase un resumen en Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996) 285-423 y las referencias citadas allí), por ejemplo en las vacuolas, en el núcleo, todo tipo de plástidos, tales como aminoplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, los oleoplastos, las peroxisomas y todos los compartimientos de las células vegetales.

Tal como se ha descrito antes, la expresión génica vegetal también puede facilitarse por medio de un promotor químicamente inducible (véase resumen en Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108). Los promotores químicamente inducibles son particularmente adecuados si se desea que la expresión génica se efectúe de una manera específica en el tiempo. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2, 397-404) y un promotor inducible por etanol.

Los promotores que reaccionan a condiciones de estrés biótico o abiótico también son adecuados; por ejemplo, el promotor del gen PRP1 inducido por patógeno (Ward et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993) 361-366), el promotor hsp80 inducible por calor, de tomate (US 5.187.267), el promotor alfa-amilasa inducible por frío, de patata (WO 96/12814) o el promotor pinII inducible por lesión (EP-A-0 375 091).

Principalmente se prefieren aquellos promotores que producen expresión génica en tejidos y órganos en los cuales se efectúa la biosíntesis de ácidos grasos, lípidos y aceites, en células de semilla tales como las células del endospermo y de los embriones en desarrollo. Promotores adecuados son el promotor del gen de napina de colza (US 5,608,152), el promotor USP de *Vicia faba* (Baeumlein et al., *Mol Gen Genet*, 1991, 225 (3):459-67), el promotor de oleosina de *Arabidopsis* (WO 98/45461), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), el promotor Bce4 de *Brassica* (WO 91/13980) o el promotor B4 de legumina (LeB4; Baeumlein et al., 1992, *Plant Journal*, 2 (2):233-9) así como promotores que provocan la expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz etc. Promotores notables adecuados son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) o los promotores descritos en la publicación en WO 99/16890 del gen de hordeina de cebada, de glutelina de arroz, de oryzina de arroz, de prolamina de arroz, de gliadina de trigo, de glutelina de trigo, de zeina de maíz, de glutelina de avena, de kasirina de sorgo, de secalina de centeno.

Principalmente puede desearse provocar la expresión multiparalela de las Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa usadas en el procedimiento. Tales casetes de expresión pueden introducirse por medio de una transformación simultánea de varios constructos individuales de expresión o, preferiblemente, combinando varios casetes de expresión sobre un constructo. Varios vectores también pueden transformarse respectivamente con varios casetes de expresión y luego transferirse a la célula hospedera.

Otros promotores que igual son particularmente adecuados son aquellos que provocan una expresión específica de plástido ya que los plástidos constituyen el compartimiento en el cual se sintetizan los precursores y algunos productos finales de la biosíntesis del líquido. Promotores adecuados tales como el promotor de polimerasa de ARN viral se describen en las publicaciones WO 95/16783 y WO 97/06250, y el promotor clpP de *Arabidopsis*, se describe en la publicación WO 99/46394.

ADN vector puede introducirse en células procariontas o eucariotas por medio de técnicas de transformación convencional o de transfección. Los términos "transformación" y "transfección", conjugación y transducción, tal como se usan aquí deben comprender una gran cantidad de métodos conocidos en el estado de la técnica para la introducción de ácido nucleico ajeno (por ejemplo ADN) a una célula hospedera, incluyendo coprecipitación de fosfato de calcio o de cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, competencia natural, transferencia químicamente mediada, electroporación o bombardeo de partículas. Métodos adecuados para la transformación o transfección de células hospederas, que incluyen células vegetales, pueden encontrarse en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio tales como Methods in Molecular Biology, 1995, vol. 44, Agrobacterium protocols, editores: Gartland y Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Las células hospederas que son adecuadas teóricamente para asimilar los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, el producto génico de acuerdo con invención o el vector de acuerdo con la invención son todos organismos procariontas o eucariotas. Los organismos hospederos que se usan ventajosamente como hospederos intermediarios son microorganismos tales como hongos o levaduras. Se usan las plantas tales como plantas oleaginosas que contienen grandes cantidades de compuestos lipídicos, tales como colza, onagra, mostaza, cardo, cacahuete, canola, lino, soja, cártamo, girasol, borraja o plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, yuca, pimienta, Tagetes, plantas solanáceas tales como la patata, tabaco, la berenjena y tomate, las especies *Vicia*, guisantes, alfalfa, plantas arbustos (café, cacao, té), las especies *Salix*, árboles (palma de aceite, coco) y cultivos de forraje. Las plantas particularmente preferidas de acuerdo con la invención son plantas oleaginosas tales como soja, cacahuete, colza, canola, lino, mostaza, onagra, girasol, cártamo, árboles (palma de aceite, coco).

Otros objetos son las secuencias de ácido nucleico enumeradas a continuación que codifican Δ -6-desaturasas, Δ -6-elongasas, Δ -5-desaturasas, ω -3-desaturasas y/o Δ -12-desaturasas.

Las secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-desaturasa se seleccionan del grupo de:

- a) Una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 1,
- b) Secuencias de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 2, o
- c) Derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 1, la cual codifica polipéptidos con al menos 70 % de identidad a nivel de aminoácido con SEQ ID NO: 2 y presentan una actividad de Δ -6-desaturasa.

Secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-elongasa seleccionadas del grupo de:

- a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7,
- b) secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, o
- c) derivados de la secuencia representada en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 que codifican polipéptidos con al menos 70 % de identidad a nivel de aminoácido con SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 y presentan una actividad de Δ -6-elongasa.

Secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -5-desaturasa, seleccionadas del grupo de:

- a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 9,
- b) secuencias de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 10, o
- c) derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 9 que codifican polipéptidos con al menos 40 % de identidad a nivel de aminoácido con SEQ ID NO: 10 y presentan una actividad de Δ -5-desaturasa.

Secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de ω -3-desaturasa, seleccionadas del grupo de:

a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 23,

b) secuencias de ácido nucleico, que codifica una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 24, o

5 c) derivados de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 23 que codifican polipéptidos con al menos 40 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 24 y presentan una actividad de ω -3-desaturasa.

Secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos con actividad de Δ -12-desaturasa, seleccionadas del grupo de:

a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 25, o

10 b) secuencias de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia representada en SEQ ID NO: 26, o

c) derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 25 que codifican polipéptidos con al menos 40 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 26 y presentan una actividad de Δ -12-desaturasa.

Los ácidos nucleicos mencionados antes provienen de organismos tales como hongos, plantas tales como algas o diatomeas que pueden sintetizar PUFAs.

15 Las secuencias de ácido nucleico aisladas, antes mencionadas provienen ventajosamente de la especie de diatomeas *Thalassiosira* o de la familia de las Prasinophyceae como la especie *Ostreococcus*, de la clase de las Euglenophyceae como la especie *Euglenia* o Pythiaceae como la especie *Phytophthora*.

Secuencias de ácido nucleico particularmente preferidas se derivan de la especie y género *Phytophthora sojae*. En una forma de realización ventajosa, estas secuencias de ácido nucleico hacen posible la síntesis de EPA y/o ARA. La siguiente tabla representa tales secuencias ventajosas de ácido nucleico.

20

Gen	Función enzimática	Secuencia de proteína	SEQ ID
D6-Des(Ps)	Δ 6-Desaturasa	456 As	SEQ ID NO: 1
D6-Elo(Ps)	Δ 6-Elongasa	304 As	SEQ ID NO: 3
D6-Elo(Ps)_2	Δ 6-Elongasa	278 As	SEQ ID NO: 5
D6-Elo(Ps)_3	Δ 6-Elongasa	278 As	SEQ ID NO: 7
D5-Des(Ps)	Δ 5-Desaturasa	498 As	SEQ ID NO: 9
D12-Des(Ps)	Δ 12-Desaturasa	398 As	SEQ ID NO: 25
O3-Des(Ps)	ω 3-Desaturasa	363 As	SEQ ID NO: 23

Tal como se ha descrito antes, a los objetos pertenecen además secuencias aisladas de ácido nucleico que codifican polipéptidos con actividad de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, ω -3-desaturasa y Δ -12-desaturasa, en cuyo caso las Δ -6-desaturasas, Δ -6-elongasas, Δ -5-desaturasas, ω -3-desaturasas y/o Δ -12-desaturasas codificadas por estas secuencias de ácido nucleico convierten los ácidos grasos de C₁₈ o C₂₀ que tienen uno, dos, tres o cuatro enlaces dobles tales como C18:1 ^{Δ 9}, C18:2 ^{Δ 9,12} o C18:3 ^{Δ 9,12,15} en ácidos grasos poliinsaturados de C₂₀ que tienen tres o cuatro enlaces dobles tales como C20:3 ^{Δ 8,11,14} o C20:4 ^{Δ 8,11,14,17}. Los ácidos grasos se desaturan ventajosamente en los fosfolípidos o ésteres de ácido graso-CoA, ventajosamente en los ésteres de ácido graso-CoA.

25

30 En una forma ventajosa de realización, el término “(molécula de) ácido nucleico”, tal como se usa aquí, comprende además la secuencia no traducida en el extremo 3' y en el extremo 5' de la región del gen codificante: al menos 500, preferiblemente 200, de modo particularmente preferible 100 nucleótidos de la secuencia ubicados corriente arriba del extremo 5' de la región codificante y al menos 100, preferiblemente 50, de modo particularmente preferido 20 nucleótidos de la secuencia ubicados corriente abajo del extremo 3' de la región del gen codificante. Una molécula “aislada” de ácido nucleico preferiblemente no tiene secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico (por ejemplo secuencias que se localizan en el extremo 5' y 3' del ácido nucleico). En diversas formas de realización, las moléculas aisladas de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, ω -3-desaturasa y Δ -12-desaturasa pueden comprender, por ejemplo, menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico.

35

40

Las moléculas de ácido nucleico usadas en el procedimiento, por ejemplo una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ

ID NO: 25 o una parte de la misma pueden aislarse usando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencias suministrada en la presente. También con ayuda de algoritmo de comparación, por ejemplo, puede identificarse una secuencia homóloga o regiones homólogas, conservadas de secuencia sobre ADN o niveles de aminoácidos. Pueden usarse como sondas de hibridación, así como técnicas estándar de hibridación (tales como se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) para aislar otras secuencias de ácido nucleico que pueden usarse en el procedimiento. Además, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia completa de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 o una parte de la misma pueden aislarse mediante reacción de cadena de polimerasa, en cuyo caso se usan cebadores de oligonucleótidos a base de esta secuencia o partes de la misma (por ejemplo una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia completa o parte de la misma pueden aislarse mediante reacción de cadena de polimerasa usando cebadores de oligonucleótidos que han sido generados con base en la misma secuencia). Por ejemplo, pueden prepararse ARNm a partir de células (por ejemplo por medio del método de extracción de tiocianato de guanidinio de Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) y ADNc mediante transcriptasa inversa (por ejemplo Moloney-MLV-transcriptasa inversa que puede obtenerse de Gibco/BRL, Bethesda, MD, o AMV-transcriptasa inversa que puede obtenerse de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación por medio de reacción de cadena de polimerasa pueden generarse con base en una de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 o con ayuda de las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26. Un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede amplificarse mediante técnicas de amplificación de PCR estándar usando ADNc o, de modo alternativo, ADN genómico en calidad de matriz y cebadores de oligonucleótidos adecuados. Por lo tanto, el ácido nucleico amplificado puede clonarse en un vector adecuado y caracterizarse por medio de análisis de secuencia de ADN. Los oligonucleótidos que corresponden a una secuencia de nucleótidos de desaturasa pueden generarse mediante métodos sintéticos estándar, usando por ejemplo un sintetizador de ADN automático.

Homólogos de las secuencias de ácido nucleico usadas de las Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa con la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 significa, por ejemplo, variantes alérgicas con al menos aproximadamente 40 o 50 %, de preferencia al menos aproximadamente 60 o 70 %, más preferiblemente de al menos aproximadamente 70 o 80 %, 90 % o 95 % y todavía más preferiblemente de al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad o de homología a una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 o sus homólogos, derivados o análogos o partes de los mismos. Además, las moléculas aisladas de ácido nucleico de una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 o con una parte de la misma hibridan por ejemplo en condiciones severas. Por una parte de estos se entiende, de acuerdo con la invención, en este caso que al menos 25 pares de bases (= bp), 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp o 150 bp, preferiblemente al menos 175 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp o 300 bp, de manera particularmente preferida 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp o más pares de bases se usan para la hibridación. También es posible y ventajoso usar la secuencia completa. Las variantes alérgicas comprenden en particular variantes funcionales que pueden obtenerse mediante supresión, inserción o sustitución de nucleótidos de/a la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25, pero la intención es que la actividad enzimática de las proteínas sintetizadas, resultantes de estas, se mantenga ventajosamente para la inserción de uno o varios genes. Las proteínas que todavía poseen la actividad enzimática de las Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa, es decir que su actividad no se reduce esencialmente, significan proteínas con al menos 10 %, de preferencia 20 %, de modo particularmente preferido 30 %, de modo muy particularmente preferido 40 % de la actividad enzimática original, en comparación con la proteína codificada por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25. La homología ha sido calculada por toda la región de secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico. El experto en la materia tiene a disposición una serie de programas que se basan en diferentes algoritmos para la comparación de diversas secuencias. En este caso, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman ofrecen resultados particularmente confiables. Para las comparaciones de secuencia fue usado el programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) o los programas Gap y BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970) y Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)), que están contenidos en el paquete de software de GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)]. Los valores de homología de secuencia indicados antes en porcentajes han sido determinados por toda la región de secuencia usando el programa GAP y las siguientes

configuraciones: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 y Average Mismatch: 0.000. A menos que se especifique algo diferente, estas configuraciones se usaron siempre como configuraciones estándar para las comparaciones de secuencias.

5 Homólogos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 también significan, por ejemplo, homólogos bacterianos, de hongos y vegetales, secuencias truncadas, ADN monocatenario o ARN de la secuencia de ADN codificante y no codificante.

10 Homólogos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 también significan derivados tales como, por ejemplo, variantes de promotor. Los promotores ubicados corriente arriba de las secuencias de nucleótidos indicadas pueden modificarse mediante uno o varios intercambios de nucleótido, mediante inserción(es) y/o supresión(es), no obstante sin que la funcionalidad o la actividad de los promotores se obstaculicen. Además es posible que se incremente la actividad de los promotores mediante modificación de su secuencia o que se reemplacen enteramente por promotores más activos, incluso de organismos heterólogos.

15 La síntesis del lípido puede dividirse en dos secciones: la síntesis de ácidos grasos y su enlazamiento a sn-glicerín-3-fosfato así como la adición o modificación de un grupo polar de cabeza. Los lípidos habituales que se usan en membranas comprenden fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y fosfoglicéridos. La síntesis de ácidos grasos comienza con la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA por parte de la acetil-CoA-carboxilasa o wn acetil-ACP por parte de la acetiltransacilase. Después de una reacción de condensación, estas dos moléculas del producto forman
20 juntas acetoacetil-ACP, que se convierte mediante una serie de reacciones de condensación, reducción y deshidratación de modo que se obtiene una molécula de ácido graso saturado con la longitud de cadena deseada. La producción de los ácidos grasos insaturados a partir de estas moléculas se cataliza por parte de desaturasas específicas, ya sea de modo aeróbico por medio de oxígeno molecular, o de modo anaeróbico (respecto de la síntesis de ácidos grasos en microorganismos véase F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* and *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., páginas 612-636 y las referencias citadas allí; Lengeler et al. (Editores) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, y las referencias contenidas, así como Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 y las referencias contenidas). Los ácidos grasos preparados, enlazados a fosfolípidos, tienen que transferirse a continuación nuevamente a la combinación de ácido graso-CoA-éster para las otras elongaciones a partir de los fosfolípidos. Esto se hace posible mediante acilo-CoA:lisofosfolípido-
25 aciltransferasas. Además, estas chivas son capaces de transferir los ácidos grasos alargados desde los ésteres CoA de vuelta a los fosfolípidos. Dado el caso, la secuencia de reacción puede transcurrir repetidamente.

35 Precursores para la biosíntesis de PUFA son, por ejemplo, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linoléico. Los ácidos grasos de carbón C_{18} tienen que alargarse a C_{20} y C_{22} para obtener ácidos grasos del tipo de cadena eicosa y docosa. Con la ayuda de las desaturasas y/o elongasas usadas en el procedimiento, pueden prepararse ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico ventajosamente ácido eicosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico y a continuación puede prepararse y emplearse continuación en diversas aplicaciones respecto de alimentos, alimentos para animales, cosméticos o fármacos. Los ácidos grasos de C_{20} y/o C_{22} con al menos dos, ventajosamente al menos cuatro, cinco o seis enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente ácidos grasos de C_{20} o C_{22} ventajosamente con cinco o seis enlaces dobles en la molécula de ácido
40 graso, pueden prepararse usando las enzimas antes mencionadas. Los sustratos de las desaturasas y elongasas usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención son ácidos grasos de C_{16} , C_{18} o C_{20} tales como, por ejemplo, ácido linoleico, ácido γ -linoléico, ácido α -linoléico, ácido dihomo- γ -linoléico, ácido eicosatetraenoico o ácido estearidónico. Sustratos preferidos son ácido linoleico, ácido γ -linoléico y/o ácido α -linoléico, ácido dihomo- γ -linoléico y ácido araquidónico, ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico. Los ácidos grasos de C_{20} o C_{22} sintetizados que tienen al menos cuatro, cinco o seis enlaces dobles en el ácido graso se obtienen el procedimiento de acuerdo con la invención en forma de ácido graso libre o en forma de sus ésteres, por ejemplo en forma de sus glicéridos, ventajosamente de sus triglicéridos.

50 Por el término "glicérido" se entiende una glicerina escenificada con uno, dos o tres residuos de ácido carboxílico (mono-, di- o triglicérido). Por "glicéridos" también se entiende una mezcla de diferentes glicéridos. El triglicérido o la mezcla de glicéridos puede contener otras adiciones, por ejemplo ácidos grasos libres, antioxidantes, proteínas, carbohidratos, vitaminas y/u otras sustancias.

55 Por un "glicérido" en el sentido del procedimiento se entienden además derivados de la glicerina. Además de los glicéridos de ácido graso antes descritos, estos también incluyen glicerofosfolípidos y gliceroglicolípidos. Aquí se nombrarían preferiblemente, por ejemplo, los glicerofosfolípidos como lecitina (fosfatidilcolina), cardiolipina, fosfatidilglicerina, fosfatidilserina y alquilacilglicerofosfolípidos.

Además, los ácidos grasos tienen que transportarse a continuación a diferentes sitios de modificación e incorporarse al lípido de almacenamiento de triacilglicerina. Otro paso importante en la síntesis de lípido es la transferencia de ácidos grasos a grupos polares de cabeza, por ejemplo mediante glicerina-ácido graso-aciltransferasa (véase Frentzen, 1998, *Lipid*, 100(4-5):161-166).

Las publicaciones sobre biosíntesis de ácido graso vegetal y sobre la desaturación, el metabolismo de lípido y el transporte de membrana de los compuestos lipídicos, sobre la oxidación beta, la modificación de ácido graso y los cofactores, almacenamiento y síntesis de triacilglicerina, incluyendo la referencias de allí, véanse en los siguientes artículos: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Editores: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge y Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin y Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Editores: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, en: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Editores: Murata y Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

Los PUFAs preparados en el procedimiento comprenden un grupo de moléculas que los animales superiores ya no son capaces de sintetizar y por lo tanto tienen que ingerirse, o los cuales los animales superiores ya no son capaces de sintetizar por sí mismos en cantidad suficiente, por lo tanto, tienen que ingerir cantidades adicionales aunque pueden sintetizarse fácilmente por otros organismos tales como las bacterias que, por ejemplo, los datos ya no son capaces de sintetizar ácido araquidónico.

En el contexto de la invención, por fosfolípidos deben entenderse fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina y/o fosfatidilinositol, ventajosamente fosfatidilcolina. Los términos producción o productividad son conocidos en el campo especializado e incluyen la productividad dentro de una célula vegetal o de una planta, es decir el contenido de los ácidos grasos deseados, preparados en el procedimiento respecto del contenido de todos los ácidos grasos en esta célula o planta. Los términos biosíntesis por ruta de biosíntesis son conocidos en el campo especializado y comprenden la síntesis de un compuesto, de preferencia un compuesto orgánico por parte de una célula a partir de compuestos intermedios, por ejemplo en un procedimiento muy regulado de varios pasos. Los términos catabolismo o ruta catabólica en el campo especializado y comprenden la disociación de un compuesto, preferiblemente de un compuesto orgánico por parte de una célula en productos catabolitos (dicho en términos generales, moléculas más pequeñas o menos complejas), por ejemplo en un procedimiento muy regulado y de varios pasos. El término metabolismo es conocido en el campo especializado y comprende la totalidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en un organismo. El metabolismo es conocido el campo especializado y comprende la totalidad de reacciones bioquímicas que tienen lugar en un organismo. El metabolismo de un compuesto determinado (por ejemplo el metabolismo de un ácido graso) comprende entonces la totalidad de las rutas de biosíntesis, de modificación y de catabolismo de este compuesto en la célula que se refieren a este compuesto

En otra forma de realización, los derivados de la molécula de ácido nucleico representadas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 codifican proteínas con al menos al menos 40 %, ventajosamente alrededor de 50 o 60 %, de preferencia al menos aproximadamente 60 o 70 % y más preferiblemente al menos alrededor de 70 o 80 %, 80 a 90 %, 90 a 95 % y del modo más preferido al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de homología (homología en el sentido de la invención debe significar identidad) a una secuencia de aminoácido completa de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26. La homología ha sido calculada por toda la región de secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos. Para la comparación de secuencias fue usado el programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) o el programa Gap y BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) y Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), que están contenidos en el paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA 53711 (1991)]. Los valores de homología de secuencia indicados en porcentaje fueron determinados por toda la región de secuencia mediante el programa BestFit con las siguientes configuraciones: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 y Average Mismatch: 0.000. Sino se indica nada diferente, se usaron siempre como configuraciones estándar para comparaciones de secuencia.

La invención comprende además moléculas de ácido nucleico que difieren de una de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 (y partes de las mismas) debido al código genético degenerado y, por lo tanto, codifican la misma actividad de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, ω -3-desaturasa o Δ -12-desaturasa como aquellas que se codifican por las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25.

En adición a las Δ -6-desaturasas, Δ -6-elongasas, Δ -5-desaturasas, ω -3-desaturasas o Δ -12-desaturasas mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25, el experto en la materia reconoce que dentro de una población pueden existir polimorfismos de secuencias de ADN que conducen a modificaciones en las secuencias de aminoácidos de las Δ -6-desaturasas, Δ -6-elongasas, Δ -5-desaturasas, ω -3-desaturasas y/o Δ -12-desaturasas. Estos polimorfismos genéticos en el gen de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, ω -3-desaturasa y/o Δ -12-desaturasa pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación natural. Estas variantes naturales provocan habitualmente una varianza de 1 a 5 % en la secuencia de nucleótidos del gen de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, ω -3-desaturasa y/o Δ -12-desaturasa. Todas y cada una de estas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes

de estas en la Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, ω -3-desaturasa y/o Δ -12-desaturasa, que son el resultado de una variación natural y no modifican la actividad funcional, deben estar contenidos en el alcance de la invención.

Debido a su homología a los ácidos nucleicos de Δ -6-desaturasa-, Δ -6-elongasa-, Δ -5-desaturasa-, Δ -5-elongasa-, Δ -4-desaturasa-, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa divulgados aquí, las moléculas de ácido nucleico ventajosas para el procedimiento pueden aislarse usando las secuencias o una parte de las mismas como sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación estándar en condiciones severas de hibridación. En este caso, pueden usarse, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen una longitud de al menos 15 nucleótidos y se hibridan en condiciones severas con las moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25. También pueden usarse ácidos nucleicos de al menos 25, 50, 100, 250 o más nucleótidos. El término "hibridada en condiciones severas", tal como se usen la presente, debe describir condiciones de hibridación y de lavado en las cuales las secuencias de nucleótidos que son homólogos en al menos 60 % entre sí, permanecen hibridadas habitualmente unas con otras. Las condiciones son preferiblemente de tal tipo, que las secuencias que son homólogas unas a otras en al menos aproximadamente 65 %, más preferiblemente en al menos alrededor de 70 % y todavía más preferible en al menos aproximadamente 75 % o más, habitualmente permanecen hibridadas unas con otras. Estas condiciones severas son conocidas por el experto en la materia pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido, no limitante de condiciones de hibridación severas son hibridaciones en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (sodium chloride/sodiumcitrate = SSC) a aproximadamente 45°C, seguidas por uno o varios pasos de lavado en 0,2 x SSC, 0,1 % SDS a 50 a 65°C. El experto en la materia conoce que estas condiciones de hibridación difieren dependiendo del tipo del ácido nucleico y, si se encuentran presentes disolventes orgánicos, por ejemplo, respecto de la temperatura y de la concentración del regulador de pH. La temperatura varía por ejemplo en "condiciones de hibridación estándar" dependiendo del tipo del ácido nucleico entre 42 °C y 58 °C en regulador acuoso de pH con una concentración de 0,1 a 5 x SSC (pH 7,2). Si se encuentra presente disolvente orgánico en el regulador de pH mencionado antes, por ejemplo 50 % de formamida, la temperatura en condiciones estándar es de aproximadamente 42 °C. Las condiciones de hibridación para ADN: híbridos de ADN son preferiblemente de, por ejemplo, 0,1 x SSC y 20°C a 45°C, preferiblemente entre 30°C y 45°C. Las condiciones de hibridación para ADN: híbridos de ARN son preferiblemente, por ejemplo, de 0,1 x SSC y 30°C a 55°C, preferiblemente entre 45°C y 55°C. Las temperaturas de hibridación antes mencionadas son por ejemplo para un ácido nucleico con aproximadamente 100 bp (= pares de bases) de largo y un contenido G + C de 50 % en ausencia de formamida. El experto en la materia sabe cómo pueden determinarse las condiciones de hibridación requeridas por medio de manuales tales como los mencionados antes o de los siguientes manuales: Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames y Higgins (Editores) 1985, "Nucleic Acids hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Editores) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Para la determinación de la homología porcentual (= identidad) de dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo de una de las secuencias de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26) o de dos ácidos nucleicos (por ejemplo SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25) se describen las secuencias con el propósito de una comparación óptima entre sí (por ejemplo pueden introducirse vacíos en la secuencia de una proteína o de un ácido nucleico con el fin de generar una alineación óptima con la otra proteína o el otro ácido nucleico). Los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones correspondientes de aminoácidos o posiciones de nucleótidos son comparados luego. Si una posición en una secuencia es ocupada por el mismo residuo de aminoácido o el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la otra secuencia, entonces las moléculas son homólogas en esta posición (es decir, "homología" de aminoácido o ácido nucleico, tal como se usa aquí, corresponde a la "identidad" de aminoácido o de ácido nucleico). La homología porcentual entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas que son comunes a las secuencias (es decir, % de homología = cantidad de las posiciones idénticas/cantidad total de las posiciones x 100). Por lo tanto, los términos homología e identidad han de considerarse sinónimos. Los programas o algoritmos usados han sido descritos antes.

Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una de las Δ -6-desaturasas, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasas, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa que es homóloga a una secuencia de proteína de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26, puede generarse introduciendo una o varias sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos a una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25, de tal modo que se introduce en una o varias sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos a la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse a una de las secuencias de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID

NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25 mediante técnicas estándar tales como mutagénesis específica deposición y mutagénesis proporcionada por PCR. De preferencia se preparan acciones conserva activas de aminoácidos en uno o en varios de los residuos de aminoácidos no esenciales predichos. En una "sustitución conserva activa de aminoácidos" se intercambia el residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En el campo especializado han sido definidas familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias comprenden aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares descargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales de beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Un residuo de aminoácidos no esencial predicho en una Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa o ω -3-desaturasa se intercambia, por lo tanto, de preferencia por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. De modo alternativo, en otra forma de realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente por medio de toda o de una parte de la secuencia que codifica Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa o ω -3-desaturasa, por ejemplo mediante mutagénesis de saturación y los mutantes resultantes pueden cribarse según la actividad aquí descrita de Δ -6-desaturasa-, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa con el fin de identificar mutantes que mantienen la actividad de Δ -6-desaturasa, Δ -6-elongasa, Δ -5-desaturasa, Δ -5-elongasa, Δ -4-desaturasa, Δ -12-desaturasa y/o ω -3-desaturasa. Después de la mutagénesis de una de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25, la proteína codificada puede expresarse de modo recombinante y la actividad de la proteína puede determinarse, por ejemplo, usando el ensayo aquí descrito.

Otros objetos de la invención son un organismo transgénico no humano, ventajosamente una planta transgénica, que contienen los ácidos nucleicos SEQ ID NO: 25 de acuerdo con la invención o un constructo génico o un vector que contienen estas secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Esta invención es ilustrada con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

30 Ejemplo 1: Procedimientos generales de clonación

Los procedimientos de clonación tales como, por ejemplo, disociaciones de restricción, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos sobre membranas de nitrocelulosa y nylon, conexión de fragmentos de ADN, transformación de células de *Escherichia coli*, cultivo de bacterias y el análisis secuencial de ADN recombinante han sido realizados tal como se describe en Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6).

Ejemplo 2: Análisis de ADN recombinante:

La secuenciación de moléculas de ADN recombinantes se efectuó con un secuenciador de ADN de fluorescencia con láser de la compañía ABI de acuerdo con el método de Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 74, 5463-5467). Los fragmentos que resultan de una reacción en cadena de polimerasa fueron secuenciados y verificados para impedir errores de polimerasa en los constructos que iban a expresarse.

Ejemplo 3: Clonación de desaturasas y elongasas específicas para PUFA a partir de *Phytophthora sojae*

Para la búsqueda de nuevos genes con actividad de Δ -6-, Δ -5-, Δ -12-, ω 3-desaturasa y Δ -6-elongasa fue consultado un banco de datos genómicos de *Phytophthora sojae* (<http://genome.jgi-psf.org/sojae/sojae1.home.html>). Este banco de datos contiene secuencias crudas que cubren aproximadamente 90 % del ADN genómico del organismo. Para todas las actividades buscadas pudieron encontrarse genes candidatos aparentes. Preparan de caracterizando ADNc de estos genes candidatos, se encontraron sus marcos correctos de lectura abierta de codificación y se derivó la secuencia de aminoácidos. Esta es tal como sigue:

Gen	Función de enzima	Secuencia de proteína	SEQ ID
D6-Des(Ps)	Δ 6-Desaturasa	456 As	SEQ ID NO: 1
D6-Elo(Ps)	Δ 6-Elongasa	304 As	SEQ ID NO: 3
D6-Elo(Ps)_2	Δ 6-Elongasa	278 As	SEQ ID NO: 5
D6-Elo(Ps)_3	Δ 6-Elongasa	278 As	SEQ ID NO: 7
D5-Des(Ps)	Δ 5-Desaturasa	498 As	SEQ ID NO: 9
D12-Des(Ps)	Δ 12-Desaturasa	398 As	SEQ ID NO: 25
O3-Des(Ps)	ω 3-Desaturasa	363 As	SEQ ID NO: 23

5 Para la preparación de ADNc se aisló ARN total de *Phytophthora sojae* con ayuda del kit RNAeasy de la compañía Qiagen (Valencia, CA, EUA). Del ARN total se aisló poly-A+ ARN (ARNm) con ayuda de oligo-dT-celulosa (Sambrook et al., 1989). El ARN se sometió a transcripción inversa usando el kit Reverse Transcription System de Promega y el ADNc sintetizado fue clonado en el vector lambda ZAP (lambda ZAP Gold, Stratagene). De manera correspondiente a las indicaciones del fabricante, el ADNc fue desempaquetado para obtener ADN de plásmido. El banco de plásmidos fue revisado según los genes candidatos aparentes correspondientes (hibridación de clones bacterianos, Sambrook et al. 1989) y los clones positivos fueron secuenciados. Los clones de ADNc correspondientes se usaron luego para la PCR para clonar plásmidos de expresión.

10 **Ejemplo 4: Clonación de plásmido de expresión para expresión heteróloga de genes de *Phytophthora sojae* en levaduras**

15 Para la expresión heteróloga en levaduras se amplificaron las secuencias correspondientes por medio de PCR con cebadores específicos correspondientes y se clonaron en el vector de expresión de levadura pYES2.1-tOPO (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. En este caso sólo se amplificaron aquellos marcos de lectura abierta de los genes que codifican proteínas de PUFA. Adicionalmente, se añade una secuencia de Kozac (Cell 1986, 44:283-292) en 5':

Gen	Pares de bases	Cebador	SEQ ID
D5-Des(Ps)	1497 bp	Fwd : gccatggccccatcgagaccgac Rvs : ttagcccatgtggacggaca	SEQ ID NO: 27 SEQ ID NO: 28
D6-Des(Ps)	1371 bp	Fwd : accatggtggatggcccaagacca Rvs : ttacatggccgggaactcgagcagg	SEQ ID NO: 29 SEQ ID NO: 30
D12-Des(Ps)	1197 bp	Fwd : gccatggcgcgacctgaaccgg Rvs : tagagctgttctttaga	SEQ ID NO: 31 SEQ ID NO: 32
03-Des(Ps)	1092 bp	Fwd: gccatggcgtccaagcaggagca Rvs: tcagtggccttagtcttggcgcc	SEQ ID NO: 33 SEQ ID NO: 34
D6-Elo(Ps)	915 bp	Fwd: aagatggagacgacctcgcgcg Rvs: ttactgcttcttggcgaccgagcg	SEQ ID NO: 35 SEQ ID NO: 36
D6-Elo(Ps)_2	837 bp	Fwd: gccatggcgtcggagctgctgca Rvs: ttagaggttcttggccgg	SEQ ID NO: 37 SEQ ID NO: 38
D6-Elo(Ps)_3	837 bp	Fwd: accatgtcggccgacctgctgc Rvs: ttagagcttcttggcc	SEQ ID NO: 39 SEQ ID NO: 40

Composición de la mezcla de PCR (50 µl):

5,00 µl de ADNc plantilla

20 5,00 µl de 10x regulador de pH (polimerasa Advantage)+ MgCl₂ de 25mM

5,00 µl de dNTP de 2mM

1,25 µl de cada cebador (10 µmol/µl del 5'-ATG y del cebador 3'-stop)

0,50 µl de polimerasa Advantage

Se emplea la polimerasa Advantage de Clontech.

25 Condiciones de reacción de la PCR:

Temperatura de fijación: 1 min 55°C

Temperatura de desnaturalización: 1 min 94°C

Temperatura de elongación: 2 min 72°C

Cantidad de los ciclos: 35

30 Los productos de PCR son incubados con el plásmido pYES2.1-tOPO (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Luego, las reacciones de incubación se transforman en células de *E. coli* DH5α (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los clones positivos se identifican mediante PCR (véase reacción antes) y el ADN del plásmido se aísla (Qiagen Dneasy). Los plásmidos resultantes se verifican mediante secuenciación y se

transforman mediante electroporación (1500 V) en la cepa de *Saccharomyces INVSc1* (Invitrogen). Para control, pYES2.1 (vector vacío) se transforma en paralelo. La selección de la levadura transformada se lleva a cabo en placas de agar con medio mínimo completo (CMDum) con 2 % de glucosa, pero sin uracilo. Después de la selección, en cada caso se seleccionan tres transformantes para la expresión funcional subsiguiente.

- 5 Para la expresión de los genes de *Phytophthora sojae* se inoculan primero precultivos respectivamente de 5 ml de medio líquido CMDum con 2 % (p/v) de rafinosa pero sin uracilo con los transformantes seleccionados y es incubado durante 2 días a 30°C, 200 rpm. Luego se inoculan 5 ml de medio líquido Cmdum (sin uracilo) con 2 % de rafinosa y 300 µM de diferentes ácidos grasos con los precultivos a una OD₆₀₀ de 0,05. La expresión es inducida adicionando 2 % (p/v) de galactosa. Los cultivos son incubados por otras 96 horas a 20 °C.

10 Ejemplo 5: Clonación de plásmido de expresión para la expresión específica de semillas en plantas

Para la transformación de plantas fueron generados otros vectores de transformación con base en pSUN-USP. Para este fin, se insertaron sitios de corte NotI en el extremo 5' y 3' de las secuencias de codificación usando los pares de cebadores siguientes (véase la siguiente tabla).

Composición de la mezcla de PCR (50 µl):

- 15 5,00 µl de ADNc plantilla
 5,00 µl de 10x regulador de pH (polimerasa Advantage)+ MgCl₂ de 25mM
 5,00 µl de dNTP de 2mM
 1,25 µl de cada cebador (10 µmol/µl)
 0,50 µl de polimerasa Advantage

- 20 Fue empleada polimerasa Advantage de Clontech.

Condiciones de reacción de la PCR:

Temperatura de fijación: 1 min 55°C

Temperatura de desnaturalización: 1 min 94°C

Temperatura de elongación: 2 min 72°C

- 25 Cantidad de ciclos: 35

Gen	Pares de bases	Cebador	SEQ ID
D5-Des(Ps)	1497 bp	Fwd : gcggccgcgcatggccccatcgagaccgac Rvs : gcggccgcttagcccatgtggacggaca	SEQ ID NO: 41 SEQ ID NO: 42
D6-Des(Ps)	1371 bp	Fwd : gcgccgcaccatgggtgatggcccaagacca Rvs : gcgccgcttacatggccgggaactcgagcagg	SEQ ID NO: 43 SEQ ID NO: 44
D12-Des(Ps)	1197 bp	Fwd : gcgccgcgcatggcgatcctgaaccgg Rvs : gcgccgctagagctgttctttaga	SEQ ID NO: 45 SEQ ID NO: 46
03-Des(Ps)	1092 bp	Fwd: gcgccgcgcatggcgccaagcaggagca Rvs: gcgccgctcagttggccttagtcttggcgcc	SEQ ID NO: 47 SEQ ID NO: 48
D6-Elo(Ps)	915 bp	Fwd: gcgccgcaagatggagacacctcgcgcg Rvs: gcgccgcttactgctcttcttggcgaccgagcg	SEQ ID NO: 49 SEQ ID NO: 50
D6-Elo(Ps)_2	837 bp	Fwd: gcgccgcgcatggcgctggagctgctgca Rvs: gcgccgcttagaggttcttcttggccgg	SEQ ID NO: 51 SEQ ID NO: 52
D6-Elo(Ps)_3	837 bp	Fwd: gcgccgcaccatgctggccgacctgctgc Rvs: gcgccgcttagagcttcttcttggc	SEQ ID NO: 53 SEQ ID NO: 54

Los productos de PCR se incuban con la enzima de restricción NotI por 4 horas a 37 °C. El vector de expresión vegetal pSUN300-USP se incuban de la misma manera. A continuación, los productos de PCR y el vector que es de 7624 bp de tamaño, se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y se recortan los fragmentos correspondientes de ADN. El ADN se purifica por medio del kit de purificación en gel (Gel purification Kit) de Qiagen de acuerdo con los datos del fabricante. A continuación, se ligan el vector y los productos de PCR.

- 30

Para este propósito se usa el Rapid Ligation Kit de Roche. Los plásmidos resultantes se verifican mediante secuenciación.

- 5 pSUN300 es un derivado del plásmido pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994). pSUN-USP se origina de pSUN300, insertando en pSUN300 un promotor USP como fragmento de EcoRI. La señal de poliadenilación es la del gen OCS del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (terminador ocs, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982). El promotor USP corresponde a nucleótidos 1 a 684 (Genbank Accession X56240), en cuyo caso parte de la región no codificante del gen USP está contenido en el promotor. El fragmento del promotor que tiene un tamaño de 684 pares de base fue aplicado mediante reacción de PCR siguiendo métodos estándar con la ayuda de un cebador sintetizado y por medio de un cebador estándar T7 disponible comercialmente (Stratagene) (secuencias del cebador: 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCCGGATCTGCTGGCTATGAA-3') [SEQ ID NO: 55].
- 10
- 15 El fragmento de PCR fue recortado con EcoRI/Sall e insertado en el vector pSUN300 con el terminador OCS. Esto dio lugar al plásmido con la denominación pSUN-USP, que puede emplearse para la transformación de plantas por medio de *Agrobacterium tumefaciens*.

Ejemplo 6: Expresión de genes de *Phytophthora sojae* en levaduras

- 20 Se analizan levaduras, según el ejemplo 4, que habían sido transformadas con el plásmido pYES2.1 o los plásmidos pYES-d4Des(Ps), pYESd5Des(Ps), pYES-d6Des(Ps), pYES-d12Des(Ps), pYES-o3Des(Ps), pYES-d6Elo(Ps), pYES-d6Elo-2(Ps) y pYESd6Elo-3(Ps) de la siguiente manera:

- 25 Las células de levadura de los cultivos principales fueron cosechadas mediante centrifugación (100 x g, 5 min, 20°C) y se lavaron con NaHCO₃ de 100 mM, pH 8,0, con el fin de retirar el medio restante y los ácidos grasos. Iniciando con los sedimentos de células de levadura, se prepararon ésteres metílicos de ácido graso (FAMES) mediante metanólisis ácida. Con este fin se incubaron sedimentos celulares por una hora 80 °C, junto con 2 ml de ácido sulfúrico metanólico de 1 N y 2 % (v/v) de dimetoxipropano. La extracción de los FAMES se efectúa mediante extracción doble con éter de petróleo (PE). Para retirar ácidos grasos no derivatizados se lavaron las bases orgánicas en cada caso una vez con 2 ml de NaHCO₃ de 100 mM, pH 8,0 y 2 ml de Aqua dest. a continuación, las fases de PE fueron secadas con Na₂SO₄, se evaporaron bajo argón y se recogieron en 100 µl de PE. Las muestras se separan en una columna capilar DB-23 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6850 con detector de ionización de llama. Las condiciones para el análisis de GLC son tal como sigue: la temperatura de la estufa fue programada desde 50 °C hasta 250 °C, con una velocidad de 5 °C/minuto y finalmente 10 minutos a 250 °C (sosteniendo).
- 30

- 35 La identificación de las señales se efectúa comparando los tiempos de retención con el estándar correspondiente de ácido graso (Sigma). La metodología se describe, por ejemplo, en Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 y Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Ejemplo 7: Caracterización funcional de genes de *Phytophthora sojae*:

- 40 La actividad y la especificidad de sustrato de los genes individuales pueden determinarse después de expresión y alimentación de diversos ácidos grasos. Los sustratos alimentados encuentran presentes en grandes cantidades en todas las levaduras transgénicas, lo cual demuestra la asimilación de estos ácidos grasos en las levaduras. Las levaduras transgénicas revelan la síntesis de ácidos grasos nuevos, los productos de los genes. Esto significa que los genes de *Phytophthora sojae* pueden expresarse funcionalmente.

- 45 La especificidad de sustrato desaturasas y elongasas puede determinarse después de expresión en levadura alimentando por medio de diversas levaduras. Las descripciones para la determinación de las actividades individuales se encuentran en la publicación WO 93/11245 para o3-desaturasas, WO 94/11516 para Δ12-desaturasas, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 y WO 99/27111 para Δ6-desaturasas, Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561-31566 para Δ4-desaturasas, Hong et al. 2002, *Lipids* 37,863-868 para Δ5-desaturasas, para Elongasen in Zank, T.K. et al. *Plant Journal* 31:255-268, 2002.

- 50 La actividad de las desaturasas y elongasas individuales se calcula a partir de la tasa de conversión usando la fórmula [(sustrato)/(sustrato + producto)*100].

Ejemplo 8: Generación de plantas transgénicas

- a) Generación de plantas transgénicas de colza (modificada de acuerdo con Moloney et al., 1992, *Plant Cell Reports*, 8:238-242)

Para generar plantas transgénicas de colza se transforman vectores binarios tales como los plásmidos pSUN generados según el ejemplo 5 con genes de *Phytophthora sojae* en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Para la transformación de plantas de colza (Var. Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Alemania), se utiliza una dilución 1:50 de un cultivo de una noche de una colonia de agrobacterias transformada positivamente en medio Murashige-Skoog (Murashige y Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) con 3 % de sacarosa (medio 3MS). Los peciolos o hipocotiledóneos de plantas de colza estériles recién germinadas (de aproximadamente 1 cm²) fueron incubados con dilución de agrobacterias de 1:50 durante 5-10 minutos en una placa de Petri. Esto fue seguido por 3 días de co-incubación en la oscuridad a 25 °C en medio 3MS con 0,8 % de Bacto-Agar. El cultivo continuó después de 3 días con un ciclo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad y luego continuó con un ritmo semanal en medio MS suplementado con 500 mg/l de Claforan (Cefotaxima-sodio), 50 mg/l kanamicina, 20 µM de bencilaminopurina (BAP) y 1,6 g/l de glucosa. Los brotes crecientes fueron transferidos a medio MS con 2 % de sacarosa, 250 mg/l de Claforan y 0,8 % de Bacto-Agar. Si después de tres semanas no se formaron raíces, entonces en calidad de hormona de crecimiento se adicionó al medio ácido 2-indolbutírico para enraizar.

Los brotes regenerados fueron obtenidos en medio 2MS con kanamicina y Claforan, después de enraizamiento se transfirieron a la tierra y después de cultivar se hicieron crecer durante dos semanas en una cámara climatizada o en un invernadero, se dejaron florecer, se cosecharon las semillas maduras y se analizaron mediante análisis de lípidos para expresión de los genes de desaturasa y/o elongasa tal como se describe, por ejemplo, por Qiu et al. 2001, J. Biol. Chem. 276, 31561-31566.

20 b) Preparación de plantas transgénicas de lino

La preparación de plantas transgénicas de lino puede generarse, por ejemplo, de acuerdo con el método de Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 35(6):456-465 mediante bombardeo de partículas. Las transformaciones facilitadas con agrobacterias pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285.

25 Ejemplo 9: Extracción de lípidos de las semillas

El efecto de la modificación genética en plantas, hongos, algas, ciliados o en la producción de un compuesto deseado (tal como un ácido graso) puede determinarse cultivando los microorganismos modificados o la planta modificada en condiciones adecuadas (tales como las descritas antes) y analizando el medio y/o los componentes celulares para la producción elevada del producto deseado (es decir de los lípidos o de un ácido graso). Estas técnicas de análisis se conocen por el experto en la materia y comprenden espectroscopía, cromatografía de capa delgada, diversos tipos de métodos de tinción, métodos enzimáticos y microbiológicos y cromatografía analítica tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A2, pp. 89-90 y pp. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, vol. 3, capítulo III: "Product recovery and purification", pp. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., y Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., y Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. B3; capítulo 11, pp. 1-27, VCH: Weinheim; y Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Además de los procedimientos antes descritos, los lípidos vegetales se extraen del material vegetal tal como se describe por parte de Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, y Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145. El análisis cualitativo y cuantitativo de lípidos o de ácidos grasos es descrito por Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Escocia: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

En adición a la medición del producto final de la fermentación, también es posible analizar otros componentes de las rutas metabólicas que se usan para la producción del compuesto deseado, tales como intermediarios y productos secundarios con el fin de determinar la eficiencia total de producción del compuesto.

Los procedimientos analíticos comprenden medir la cantidad de nutrientes en el medio (por ejemplo azúcares, hidrocarburos, fuentes de nitrógeno, fosfato y otros iones), medir la composición de la biomasa y el crecimiento, analizar la producción de metabolitos convencionales de rutas biosintéticas y medir gases que se generan durante la fermentación. Los métodos estándar para estas mediciones se describen en Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes y P.F. Stanbury, Editores, IRL Press, S. 103-129; 131-163 y 165-192 (ISBN: 0199635773) en las referencias bibliográficas indicadas allí.

Un ejemplo es el análisis de ácidos grasos (abreviaturas: FAME, ésteres metílicos de ácido graso; GC-MS, cromatografía de gases-líquidos/espectrometría de masas; TAG, triacilglicerina; TLC, cromatografía de capa delgada).

5 La detección inequívoca para la presencia de productos de ácido graso puede obtenerse analizando organismos recombinantes usando métodos analíticos estándar: GC, GC-MS o TLC, tal como se describen en varias ocasiones por Christie y en las referencias bibliográficas allí (1997, en: *Advances on Lipid Methodology*, cuarta edición: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, *Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren* [Métodos de cromatografía de gases-espectrometría de masas], *Lipide* 33:343-353).

10 El material que va analizarse puede reventarse mediante tratamiento con ultrasonido, molienda en el molino de vidrio, nitrógeno líquido y molienda o mediante otros procedimientos aplicables. Después de reventar, el material tiene que centrifugarse. El sedimento se resuspende en agua destilada, se calienta por 10 minutos a 100 °C, se enfría sobre hielo y nuevamente se centrifuga, seguido de extracción en ácido sulfúrico de 0,5 M en metanol con 2 % de dimetoxipropano durante 1 hora a 90 °C, lo cual conduce a compuestos hidrolizados de aceite y de líquido que dan lugar a los lípidos transmetilados. Estos ésteres metílicos de ácido graso son extraídos en éter de petróleo y finalmente se someten a un análisis de GC usando una columna capilar (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-15 52 CB, 25 microm, 0,32 mm) a un gradiente de temperatura entre 170°C y 240°C durante 20 min y 5 min a 240°C. La identidad de los ésteres metílicos de ácido graso obtenidos tiene que definirse usando estándares que se encuentran disponibles de fuentes comerciales (es decir Sigma).

20 El material vegetal se homogeneiza primero de manera mecánica mediante el mortero con el fin de hacerlo más accesible a una extracción.

25 Luego se calienta durante 10 minutos a 100 °C y después de enfriar sobre hielo nuevamente se sedimenta. El sedimento celular se hidroliza por una hora a 90 °C con ácido sulfúrico metanólico de 1 M y 2 % de dimetoxipropano y los lípidos son transmetilados. Los ésteres metílicos de ácido graso (FAME) resultantes son extraídos en éter de petróleo. Los FAME extraídos se analizan mediante cromatografía líquida de gases con una columna capilar (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) y un gradiente de temperatura de 170°C a 240°C en 20 min y 5 min a 240°C. La identidad de los ésteres metílicos se confirma comparando con los estándares correspondientes de FAME (Sigma). La identidad de la posición del enlace doble puede analizarse adicionalmente mediante derivatización química adecuada de las mezclas de FAME, por ejemplo en derivados de 4,4-dimetoxiazolina (Christie, 1998) por medio de GC-MS.

30 Equivalentes:

El experto en la materia reconoce o puede establecer muchos equivalentes de las formas específicas de realización de acuerdo con la invención, descritas en la presente, usando solamente experimentos rutinarios. Estos equivalentes deben abarcarse por las reivindicaciones de la patente.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> BASF Plant Science GmbH

<120> Procedimiento para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados de C₂₀ y C₂₂ con al menos cuatro enlaces dobles en plantas transgénicas

<130> 2005/0115

<140> PF 56465

40 <141> 2005-03-22

<160> 55

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1371

45 <212> ADNN

<213> *Phytophthora sojae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1371)

<223> Delta-6-desaturasa

<400> 1

ES 2 635 013 T3

atg	gtg	gat	ggc	ccc	aag	acc	aag	cgc	ctc	atc	tcg	tgg	cag	gag	atc	48
Met	Val	Asp	Gly	Pro	Lys	Thr	Lys	Arg	Leu	Ile	Ser	Trp	Gln	Glu	Ile	
1			5					10					15			
cag	cag	cac	tcg	acg	tac	gcc	aac	gcg	tgg	atc	gtc	atc	cac	cac	aag	96
Gln	Gln	His	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asn	Ala	Trp	Ile	Val	Ile	His	His	Lys	
			20					25					30			
gtc	tac	gac	atc	tcc	aag	tgg	gac	tcg	cac	ccg	ggc	ggc	atg	gtc	atg	144
Val	Tyr	Asp	Ile	Ser	Lys	Trp	Asp	Ser	His	Pro	Gly	Gly	Met	Val	Met	
		35					40					45				
ctc	tcg	cag	gcc	ggc	gag	gac	gcc	acc	gac	atc	ttc	acc	gtg	tgc	cac	192
Leu	Ser	Gln	Ala	Gly	Glu	Asp	Ala	Thr	Asp	Ile	Phe	Thr	Val	Cys	His	

ES 2 635 013 T3

50	55	60	
ccg acg agc tcc tgg aag ctg ctg gag cag ttc tac atc ggc gac gtg Pro Thr Ser Ser Trp Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Ile Gly Asp Val 65 70 75 80			240
gac gag agc acg gcc ccg ggc acg acc ggc ctc tcg gag gag cag aag Asp Glu Ser Thr Ala Pro Gly Thr Thr Gly Leu Ser Glu Glu Gln Lys 85 90 95			288
gcc aag aag gcc aag acg aac gag ttc atc agc gcc tac cgc cgc ctg Ala Lys Lys Ala Lys Thr Asn Glu Phe Ile Ser Ala Tyr Arg Arg Leu 100 105 110			336
cgc atc aag atc aag ggc atg ggc ctc tac gac gcg tcc atg gtc tac Arg Ile Lys Ile Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser Met Val Tyr 115 120 125			384
tac gcg tgg aag atc ctc agc acc ttc ggc att tgg atg gcc tcc gtg Tyr Ala Trp Lys Ile Leu Ser Thr Phe Gly Ile Trp Met Ala Ser Val 130 135 140			432
gcg atc tgc tac cac ttc gac agc tgg ccc atg tac atg ctc gcg gcc Ala Ile Cys Tyr His Phe Asp Ser Trp Pro Met Tyr Met Leu Ala Ala 145 150 155 160			480
tgc gtc atg ggg ctc ttc tgg cag cag tcg ggc tgg ctc gcg cac gac Cys Val Met Gly Leu Phe Trp Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp 165 170 175			528
gtg ctg cac cac caa gtg tgg gac aac cac atg atc ggc aac gtc atg Val Leu His His Gln Val Trp Asp Asn His Met Ile Gly Asn Val Met 180 185 190			576
ggc gtc atc atc ggc gac gtc tgg atg ggc ttc agc gtg cag tgg tgg Gly Val Ile Ile Gly Asp Val Trp Met Gly Phe Ser Val Gln Trp Trp 195 200 205			624
aag aac aag cac aac ttc cac cac gcc gtg ccc aac ctc atc ggc gac Lys Asn Lys His Asn Phe His His Ala Val Pro Asn Leu Ile Gly Asp 210 215 220			672
gaa aag acc aag tac ctc ggc gac ccg gac atc gac acc atg ccc ctg Glu Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu 225 230 235 240			720
ctg gcc tgg agc aag cac atg gcc tcg cgc gcg tac gag tcg tcg tgg Leu Ala Trp Ser Lys His Met Ala Ser Arg Ala Tyr Glu Ser Ser Trp 245 250 255			768
ggc ccc ttc ttc gtg agc cac cag gcc gtc atc tac ttc ccg ctg ctg Gly Pro Phe Phe Val Ser His Gln Ala Val Ile Tyr Phe Pro Leu Leu 260 265 270			816
ctc ttc gcg cgc ttc agc tgg ctg ctg cag agc tac tac tac gtc ttc Leu Phe Ala Arg Phe Ser Trp Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Tyr Val Phe 275 280 285			864
aag ggc ttc gcc ttc ggc aag tac gac ccc gtg gac ctc ccg aac ggc Lys Gly Phe Ala Phe Gly Lys Tyr Asp Pro Val Asp Leu Pro Asn Gly 290 295 300			912
gag aag ctc ggc ctc tcg ctg cac tac ctc tgg aac gtg ctg ctg ccg Glu Lys Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Trp Asn Val Leu Leu Pro 960			

ES 2 635 013 T3

305		310		315		320	
gtg ctc acc ggc atg tcg gtg gcc cag ggc ctg gcc ttc ttc atg ctc							1008
Val Leu Thr Gly Met Ser Val Ala Gln Gly Leu Ala Phe Phe Met Leu							
		325		330		335	
tcg cag atg tcg tgc ggc gcc ttc ctg gcc gcc gtc ttc agc gtc ggc							1056
Ser Gln Met Ser Cys Gly Ala Phe Leu Ala Ala Val Phe Ser Val Gly							
		340		345		350	
cac aac ggc atg tcg gtg tac gag cgc gac cag aag ccc gac ttc tgg							1104
His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Asp Gln Lys Pro Asp Phe Trp							
		355		360		365	
cag ctg cag gtc acc acc acg cgc aac atc acg ccg ggc ttc ttc atg							1152
Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Thr Pro Gly Phe Phe Met							
		370		375		380	
gac tgg ttc tgc ggc ggc ctc aac tac cag atc gag cac cac ttg ttc							1200
Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe							
		385		390		400	
ccc atg atg ccg cgc cac aac ctg cag aag gtc aac ccg ctc gtc aag							1248
Pro Met Met Pro Arg His Asn Leu Gln Lys Val Asn Pro Leu Val Lys							
		405		410		415	
tcg ctc tgc aag cag tac gac gtc aag ttc cac gag acg ggc ttc tac							1296
Ser Leu Cys Lys Gln Tyr Asp Val Lys Phe His Glu Thr Gly Phe Tyr							
		420		425		430	
cgc gga ctc gtc gag gtc gtg gac gag ctg gcc gac atc agc aag gag							1344
Arg Gly Leu Val Glu Val Val Asp Glu Leu Ala Asp Ile Ser Lys Glu							
		435		440		445	
ttc ctg ctc gag ttc ccg gcc atg taa							1371
Phe Leu Leu Glu Phe Pro Ala Met							
		450		455			

<210> 2

<211> 456

<212> PRT

5 <213> Phytophthora sojae

<400> 2

ES 2 635 013 T3

Glu Lys Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Trp Asn Val Leu Leu Pro
 305 310 315 320

Val Leu Thr Gly Met Ser Val Ala Gln Gly Leu Ala Phe Phe Met Leu
 325 330 335

Ser Gln Met Ser Cys Gly Ala Phe Leu Ala Ala Val Phe Ser Val Gly
 340 345 350

His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Asp Gln Lys Pro Asp Phe Trp
 355 360 365

Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Thr Pro Gly Phe Phe Met
 370 375 380

Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe
 385 390 395 400

Pro Met Met Pro Arg His Asn Leu Gln Lys Val Asn Pro Leu Val Lys
 405 410 415

Ser Leu Cys Lys Gln Tyr Asp Val Lys Phe His Glu Thr Gly Phe Tyr
 420 425 430

Arg Gly Leu Val Glu Val Val Asp Glu Leu Ala Asp Ile Ser Lys Glu
 435 440 445

Phe Leu Leu Glu Phe Pro Ala Met
 450 455

<210> 3

<211> 915

<212> ADN

5 <213> Phytophthora sojae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(915)

<223> Delta-6-elongasa

10 <400> 3

ES 2 635 013 T3

atg gag acg acc ttc gcg cgc acg ccc aag ctg cac gac gag gtg cgg	48
Met Glu Thr Thr Phe Ala Arg Thr Pro Lys Leu His Asp Glu Val Pro	
1 5 10 15	
gcg ctg cgc tgg atg tac cgg tcc cag tac gag cgc gac tgg cta cac	96
Ala Leu Arg Trp Met Tyr Pro Ser Gln Tyr Glu Arg Asp Trp Leu His	
20 25 30	
tat gcc tgg aac cga cgg ccc act aac ttc tct cgt atc ttc cgc cag	144
Tyr Ala Trp Asn Arg Arg Pro Thr Asn Phe Ser Arg Ile Phe Arg Gln	
35 40 45	
gcc atc tcg tgg gag ccg gcc ttc tgc atg gag tcg ctg ccc atg gcc	192
Ala Ile Ser Trp Glu Pro Gly Phe Cys Met Glu Ser Leu Pro Met Ala	
50 55 60	
gtg gcg ctg tgc gcc gcc tac tgc gtg ctg tgc ttc gcc ggc cgc cgc	240
Val Ala Leu Cys Ala Ala Tyr Cys Val Leu Cys Phe Ala Gly Arg Arg	
65 70 75 80	
gtc atg cgc gac ctc aag ccc ttc aac ctc aaa gtc cgg ctc gcg ctc	288
Val Met Arg Asp Leu Lys Pro Phe Asn Leu Lys Val Pro Leu Ala Leu	
85 90 95	
tgg aac ctg gcg ctg gcc acg ttc agc gcc atc gcc gcc tcc agg acg	336
Trp Asn Leu Ala Leu Ala Thr Phe Ser Ala Ile Gly Ala Ser Arg Thr	
100 105 110	
gtg ccc ttc ctc atc aac acc gtc tac cgc cgc gcc gtg tac cac tcg	384
Val Pro Phe Leu Ile Asn Thr Val Tyr Arg Arg Gly Val Tyr His Ser	
115 120 125	
gtg tgc gcg ccg ccc acg ccg cac tac gcc cac gcc ccc gtg gcg ctc	432
Val Cys Ala Pro Pro Thr Pro His Tyr Gly His Gly Pro Val Ala Leu	
130 135 140	
tgg gtc atg ctc ttc atc ttc tcc aag gtg ccg gag ctc gtg gac acg	480
Trp Val Met Leu Phe Ile Phe Ser Lys Val Pro Glu Leu Val Asp Thr	
145 150 155 160	
gcc ttc atc gtg ctg cgc aag aag ccg ctc atc ttc ctg cac tgg tac	528
Ala Phe Ile Val Leu Arg Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu His Trp Tyr	
165 170 175	
cac cac atc acc gtg ctg ctc ttc tgc tgg cac gcg ttc gcc acg ctc	576
His His Ile Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala Phe Ala Thr Leu	
180 185 190	
tcg gct agc gcc ctg tac ttc gtg gcc atg aac tac tcg gtg cac gcc	624
Ser Ala Ser Gly Leu Tyr Phe Val Ala Met Asn Tyr Ser Val His Ala	
195 200 205	
atc atg tac ttc tac tac ttc ctg acg gcg tgc gcc tac cga ccg cgc	672
Ile Met Tyr Phe Tyr Tyr Phe Leu Thr Ala Cys Gly Tyr Arg Pro Arg	
210 215 220	
tgg gct cgc ctc gtg acg atc ttc cag ctg agc cag atg gcc gtg gcc	720
Trp Ala Arg Leu Val Thr Ile Phe Gln Leu Ser Gln Met Gly Val Gly	
225 230 235 240	
gtc gcc gtg tgc gcc ctc aac gtg tac tac atg aag cag gcc gcc acg	768
Val Ala Val Cys Gly Leu Asn Val Tyr Tyr Met Lys Gln Gly Ala Thr	
245 250 255	
tgc agc gtg gac ccg gac aac ctc aag tgg gcc atc atc atg tac tcg	816
Cys Ser Val Asp Pro Asp Asn Leu Lys Trp Gly Ile Ile Met Tyr Ser	

ES 2 635 013 T3

	260		265		270		
agc tac ttt gcg ctc ttc ctc aag ttc ttc atc gag cgc tac ctg ctg							864
Ser Tyr Phe Ala Leu Phe Leu Lys Phe Phe Ile Glu Arg Tyr Leu Leu							
	275		280	.	285		
cgc agc gcc aag aag ccc gcc gcc gct gcg gtc gcc aag aag acg cag							912
Arg Ser Ala Lys Lys Pro Ala Ala Ala Ala Val Ala Lys Lys Thr Gln							
	290		295		300		
taa							915

<210> 4

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Phytophthora sojae

<400> 4

ES 2 635 013 T3

Met Glu Thr Thr Phe Ala Arg Thr Pro Lys Leu His Asp Glu Val Pro
1 5 10 15

Ala Leu Arg Trp Met Tyr Pro Ser Gln Tyr Glu Arg Asp Trp Leu His
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Arg Arg Pro Thr Asn Phe Ser Arg Ile Phe Arg Gln
35 40 45

Ala Ile Ser Trp Glu Pro Gly Phe Cys Met Glu Ser Leu Pro Met Ala
50 55 60

Val Ala Leu Cys Ala Ala Tyr Cys Val Leu Cys Phe Ala Gly Arg Arg
65 70 75 80

Val Met Arg Asp Leu Lys Pro Phe Asn Leu Lys Val Pro Leu Ala Leu
85 90 95

Trp Asn Leu Ala Leu Ala Thr Phe Ser Ala Ile Gly Ala Ser Arg Thr
100 105 110

Val Pro Phe Leu Ile Asn Thr Val Tyr Arg Arg Gly Val Tyr His Ser
115 120 125

Val Cys Ala Pro Pro Thr Pro His Tyr Gly His Gly Pro Val Ala Leu
130 135 140

Trp Val Met Leu Phe Ile Phe Ser Lys Val Pro Glu Leu Val Asp Thr
145 150 155 160

Ala Phe Ile Val Leu Arg Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu His Trp Tyr
165 170 175

His His Ile Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala Phe Ala Thr Leu
180 185 190

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

Ile Met Tyr Phe Tyr Tyr Phe Leu Thr Ala Cys Gly Tyr Arg Pro Arg
210 215 220

Trp Ala Arg Leu Val Thr Ile Phe Gln Leu Ser Gln Met Gly Val Gly
225 230 235 240

Val Ala Val Cys Gly Leu Asn Val Tyr Tyr Met Lys Gln Gly Ala Thr
245 250 255

Cys Ser Val Asp Pro Asp Asn Leu Lys Trp Gly Ile Ile Met Tyr Ser
260 265 270

Ser Tyr Phe Ala Leu Phe Leu Lys Phe Phe Ile Glu Arg Tyr Leu Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Lys Lys Pro Ala Ala Ala Ala Val Ala Lys Lys Thr Gln
290 295 300

<210> 5

<211> 837

<212> ADN

<213> Phytophthora sojae

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(837)

<223> Delta-6-elongasa

<400> 5

ES 2 635 013 T3

atg gcg tcg gag ctg ctg cag agt tac tac gag tgg gcg aat gcc acc	48
Met Ala Ser Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Glu Trp Ala Asn Ala Thr	
1 5 10 15	
gag atc aag gtg ctc gac tgg gtg gac ccc gaa ggc ggc tgg aag gtc	96
Glu Ile Lys Val Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val	
20 25 30	
cac ccc atg gcg gac tac ccg ctc gcc aac ttc gcc agc gtg ttc gcc	144
His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ala Ser Val Phe Ala	
35 40 45	
atc tgc gtc ggc tac ctg ctc ttc gtc atc ttc ggc acg gcc ctg atg	192
Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met	
50 55 60	
aag atg ggc atc ccc gcc atc aag acg agc ccc atc cag ttc atc tac	240
Lys Met Gly Ile Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Ile Gln Phe Ile Tyr	
65 70 75 80	
aac ccc atc cag gtc atc gcc tgc tcc tac atg ttc gtg gag acc gcc	288
Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Phe Val Glu Thr Ala	
85 90 95	
atc cag gcc tac cgc aat ggg tac tcg cca gct ccg tgc aac gcc ttc	336
Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Ser Pro Ala Pro Cys Asn Ala Phe	
100 105 110	
aag acg gac gcg ccc gtc atg ggc aac gtg ctc tac ctg ttc tac ctg	384
Lys Thr Asp Ala Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu	
115 120 125	
tcc aag atg ctg gac ctg tgc gac acc ttc ttc atc gtc gtg ggc aag	432
Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Phe Phe Ile Val Val Gly Lys	
130 135 140	
aaa tgg gcg cag ctc tcg ttc ctg cac gtg tac cac cac ctc tcg gtg	480
Lys Trp Arg Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Leu Ser Val	
145 150 155 160	
ctg ctc atg tac tac atc gtc ttc cgc gtg gcg cag gac ggc gac tcg	528
Leu Leu Met Tyr Tyr Ile Val Phe Arg Val Ala Gln Asp Gly Asp Ser	
165 170 175	
tac gcg tcc gtc gtg ctc aac ggc ttc gtg cac acc atc atg tac acg	576
Tyr Ala Ser Val Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr	
180 185 190	
tac tac ttc gtg agc gcg cac acg ccg gac att tgg tgg aag cgc tac	624
Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asp Ile Trp Trp Lys Arg Tyr	
195 200 205	
ctg acg ctc att cag ttg gtg cag ttc gtg acc atg aac gtg cag ggc	672
Leu Thr Leu Ile Gln Leu Val Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly	
210 215 220	
tac ctc atg tac tcg cgc cag tgc cca ggc atg ccg ccc aag atc ccg	720
Tyr Leu Met Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Ile Pro	
225 230 235 240	
ctc atc tat ctg gcc tac gtg cag tcg ctc ttc tgg ctg ttc gtc aac	768
Leu Ile Tyr Leu Ala Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Val Asn	
245 250 255	
ttc tac gtg cgc tcg tac gtg ctc gcc ccc aag aag acc aag gcg tcc	816
Phe Tyr Val Arg Ser Tyr Val Leu Ala Pro Lys Lys Thr Lys Ala Ser	
260 265 270	
ccg gcc aag aag aac ctc taa	837
Pro Ala Lys Lys Asn Leu	

<210> 6

<211> 278

<212> PRT

<213> Phytophthora sojae

<400> 6

ES 2 635 013 T3

Met Ala Ser Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Glu Trp Ala Asn Ala Thr
 1 5 10 15

Glu Ile Lys Val Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val
 20 25 30

His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ala Ser Val Phe Ala
 35 40 45

Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met
 50 55 60

Lys Met Gly Ile Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Ile Gln Phe Ile Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Phe Val Glu Thr Ala
 85 90 95

Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Ser Pro Ala Pro Cys Asn Ala Phe
 100 105 110

Lys Thr Asp Ala Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu
 115 120 125

Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Phe Phe Ile Val Val Gly Lys
 130 135 140

Lys Trp Arg Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Leu Ser Val
 145 150 155 160

Leu Leu Met Tyr Tyr Ile Val Phe Arg Val Ala Gln Asp Gly Asp Ser
 165 170 175

Tyr Ala Ser Val Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr
 180 185 190

Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asp Ile Trp Trp Lys Arg Tyr
 195 200 205

Leu Thr Leu Ile Gln Leu Val Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly
 210 215 220

Tyr Leu Met Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Ile Pro
 225 230 235 240

Leu Ile Tyr Leu Ala Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Val Asn
 245 250 255

Phe Tyr Val Arg Ser Tyr Val Leu Ala Pro Lys Lys Thr Lys Ala Ser
 260 265 270

Pro Ala Lys Lys Asn Leu
 275

<211> 837

<212> ADN

<213> Phytophthora sojae

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(837)

<223> Delta-6-elongasa

<400> 7

ES 2 635 013 T3

atg tcg gcc gac ctg ctg cag agc tac tac gac tgg acc aac gcc acc Met Ser Ala Asp Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Asp Trp Thr Asn Ala Thr 1 5 10 15	48
gag gcc aag ctg ctc gac tgg gtg gac ccc gaa ggc ggc tgg aag gtc Glu Ala Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val 20 25 30	96
cac ccc atg gcc gac tac ccg ctc gcc aac ttc gcc agc gtc tac gcc His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ala Ser Val Tyr Ala 35 40 45	144
atc tgc gtc ggc tac ctg ctc ttc gtc atc ttc gcc acg gcc ctg atg Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met 50 55 60	192
aag atg ggc atc ccc gcc atc aag acg agc ccc atc cag ttc atc tac Lys Met Gly Ile Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Ile Gln Phe Ile Tyr 65 70 75 80	240
aac ccc atc cag gtc atc gcc tgc tcc tac atg tgc gtg gag gcc gcc Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala 85 90 95	288
atc cag gcc tac cgc aac ggc tac agc gcg gcg ccc tgc aac gcc ttc Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Ser Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe 100 105 110	336
aag gcg gac gcg ccc gtc atg ggc aac gtg ctc tac ctg ttc tac ctg Lys Ala Asp Ala Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu 115 120 125	384
tcc aag atg ctg gac ctg tgc gac acg gtc ttc atc atc ctc gcc aag Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys 130 135 140	432
aag tgg aag cag ctc tcc atc ctg cac gtg tac cac cac ctg acc gtg Lys Trp Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val 145 150 155 160	480
ctc ttc gtc tac tac gtg acg ttc cgc gcc gcc cag gac ggc gac tcg Leu Phe Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser 165 170 175	528
tac gcc acc atc gtg ctc aac ggc ttc gtg cac acc atc atg tac acg Tyr Ala Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr 180 185 190	576
tac tac ttc gtg agc gcg cac acg cgc aac att tgg tgg aag aag tac Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr 195 200 205	624
ctc acg cgc atc cag ctc atc cag ttc gtg acc atg aac gtg cag ggc Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly 210 215 220	672
tac ctg acg tac tcg cgc cag tgc ccg ggc atg ccc ccc aag gtg ccg Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro 225 230 235 240	720
ctc atg tac ctc gtg tac gtg cag tcg ctc ttc tgg ctc ttc atg aac Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn 245 250 255	768
ttc tac atc cgc gcg tac gtc ttc gcc ccc aag aag ccc gcc gtc gag Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu 260 265 270	816
gac gcc aag aag aag ctc taa Asp Ala Lys Lys Lys Leu 275	837

<211> 278

<212> PRT

<213> *Phytophthora sojae*

<400> 8

ES 2 635 013 T3

Met Ser Ala Asp Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Asp Trp Thr Asn Ala Thr
1 5 10 15

Glu Ala Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val
20 25 30

His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ala Ser Val Tyr Ala
35 40 45

Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met
50 55 60

Lys Met Gly Ile Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Ile Gln Phe Ile Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala
85 90 95

Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Ser Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe
100 105 110

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

Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys
130 135 140

Lys Trp Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val
145 150 155 160

Leu Phe Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser
165 170 175

Tyr Ala Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr
180 185 190

Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr
195 200 205

Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly
210 215 220

Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro
225 230 235 240

Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn
245 250 255

Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu
260 265 270

Asp Ala Lys Lys Lys Leu
275

<210> 9

<211> 1497

5 <212> ADN

<213> Phytophthora sojae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1497)

5 <223> Delta-5-desaturasa

<400> 9

ES 2 635 013 T3

Glu	Phe	Pro	Gln	Tyr	Lys	Pro	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Lys	Glu	Cys	Cys		
130						135					140						
gag	cgc	gtg	cac	cag	tac	ttt	aag	gac	aac	aac	ctg	gac	ccg	cgc	agc	480	
Glu	Arg	Val	His	Gln	Tyr	Phe	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Asp	Pro	Arg	Ser		
145				150					155						160		
ccg	tac	tcg	ggc	atg	tgg	cgc	atg	atg	atc	gtc	gct	gcg	ctc	ggc	gcc	528	
Pro	Tyr	Ser	Gly	Met	Trp	Arg	Met	Met	Ile	Val	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala		
			165						170					175			
atc	tcg	tac	ctg	ggc	atg	aac	cag	ctg	ctc	tcg	gac	aac	atc	tac	gcg	576	
Ile	Ser	Tyr	Leu	Gly	Met	Asn	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Asn	Ile	Tyr	Ala		
			180					185						190			
cac	tac	gcg	tgg	ggc	gcc	ctc	ttc	ggc	gtg	tgc	cag	gcg	ctg	ccg	ctg	624	
His	Tyr	Ala	Trp	Gly	Ala	Leu	Phe	Gly	Val	Cys	Gln	Ala	Leu	Pro	Leu		
		195					200					205					
ctc	cac	gtg	atg	cac	gac	gcg	tcg	cac	gcc	gcc	atc	acc	agc	agc	ccc	672	
Leu	His	Val	Met	His	Asp	Ala	Ser	His	Ala	Ala	Ile	Thr	Ser	Ser	Pro		
	210					215					220						
acg	ggc	tgg	agg	ctc	att	ggc	cgc	ttc	gcg	atg	gac	tgg	gtg	gcc	ggc	720	
Thr	Gly	Trp	Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Phe	Ala	Met	Asp	Trp	Val	Ala	Gly		
225				230					235					240			
gcc	aac	atg	gta	tcg	tgg	ctc	aac	cag	cac	ggt	gtg	ggc	cac	cac	atc	768	
Ala	Asn	Met	Val	Ser	Trp	Leu	Asn	Gln	His	Val	Val	Gly	His	His	Ile		
			245					250						255			
tac	aca	aac	gtg	gcc	ggc	gct	gac	ccc	gac	ctt	ccc	gtg	gac	ttc	aag	816	
Tyr	Thr	Asn	Val	Ala	Gly	Ala	Asp	Pro	Asp	Leu	Pro	Val	Asp	Phe	Lys		
			260					265						270			
agc	gac	gtg	cgc	cgc	att	gtg	tac	cgt	cag	gtg	ctg	ctg	ccc	atc	tac	864	
Ser	Asp	Val	Arg	Arg	Ile	Val	Tyr	Arg	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ile	Tyr		
		275				280						285					
aag	ttc	cag	cac	ttg	tac	ctg	ccg	ccg	ctg	tac	ggc	gtg	ctc	ggc	ctc	912	
Lys	Phe	Gln	His	Leu	Tyr	Leu	Pro	Pro	Leu	Tyr	Gly	Val	Leu	Gly	Leu		
	290					295					300						
aag	ttc	cgc	gtg	cag	gac	att	ttc	gag	acg	ttc	atc	tcg	ctc	acg	aac	960	
Lys	Phe	Arg	Val	Gln	Asp	Ile	Phe	Glu	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Thr	Asn		
305				310						315					320		
ggt	ccg	ctg	cgc	gtg	aac	ccg	cac	tca	gtc	ggc	gac	tgg	gtc	gag	atg	1008	
Gly	Pro	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	His	Ser	Val	Gly	Asp	Trp	Val	Glu	Met		
			325						330					335			
atc	ctg	tcc	aag	gcc	ttc	tgg	gcg	ttc	tac	cgc	atc	tac	atc	ccg	ctg	1056	
Ile	Leu	Ser	Lys	Ala	Phe	Trp	Ala	Phe	Tyr	Arg	Ile	Tyr	Ile	Pro	Leu		
			340					345						350			
gtc	gtg	ctg	cag	gtg	gac	tcg	tcc	cgc	ttc	tgg	ggc	gtc	ttc	ttc	ctg	1104	
Val	Val	Leu	Gln	Val	Asp	Ser	Ser	Arg	Phe	Trp	Gly	Val	Phe	Phe	Leu		
		355					360							365			
gcc	gag	ttc	atg	acg	ggc	tgg	tac	ctg	gcc	ttc	aac	ttc	cag	gtg	agc	1152	
Ala	Glu	Phe	Met	Thr	Gly	Trp	Tyr	Leu	Ala	Phe	Asn	Phe	Gln	Val	Ser		
	370					375					380						

ES 2 635 013 T3

cac gtc tcc acg gcc tgc gaa tac ccg ggc ggt gac gag gag gtg acg	1200
His Val Ser Thr Ala Cys Glu Tyr Pro Gly Gly Asp Glu Glu Val Thr	
385 390 395 400	
gcc atc gag gac gag tgg gct gtc tcg cag atc aag tcg tcg gtg gac	1248
Ala Ile Glu Asp Glu Trp Ala Val Ser Gln Ile Lys Ser Ser Val Asp	
405 410 415	
tac ggc cac ggc tcg ttc ctc acg gcg ttc ctc acg ggc gcg ctg aac	1296
Tyr Gly His Gly Ser Phe Leu Thr Ala Phe Leu Thr Gly Ala Leu Asn	
420 425 430	
tac cag gtg acc cac cac ctc ttc ccg ggc gtc tcg cag tac cac tac	1344
Tyr Gln Val Thr His His Leu Phe Pro Gly Val Ser Gln Tyr His Tyr	
435 440 445	
ccg gcc atc gcg ccg atc atc atc gac gtg tgc aac aaa tac aag atc	1392
Pro Ala Ile Ala Pro Ile Ile Ile Asp Val Cys Asn Lys Tyr Lys Ile	
450 455 460	
aag tac acg gtg ctc ccc acg ttc acg gag gcg ctg gcc ggc cac ttc	1440
Lys Tyr Thr Val Leu Pro Thr Phe Thr Glu Ala Leu Ala Gly His Phe	
465 470 475 480	
gac cac ctc gtc gtc atg ggc aag atg ggc aag ccc gtg tcc gtc cac	1488
Asp His Leu Val Val Met Gly Lys Met Gly Lys Pro Val Ser Val His	
485 490 495	
atg ggc taa	1497
Met Glv	

<210> 10

<211> 498

<212> PRT

5 <213> Phytophthora sojae

<400> 10

ES 2 635 013 T3

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

His Gln Arg Lys Gly Ala Ala Ser Ala Asp Lys Asp Ala Thr Tyr Thr
 20 25 30

Trp Gln Asp Val Ala Lys His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Ile
 35 40 45

Ile Arg Gly Val Val Tyr Asp Val Thr Asp Thr Leu Lys Thr Pro Gln
50 55 60

Ser Lys Ile Leu Thr Cys Ser Cys Val Met Ala Pro Pro Glu Trp Ala

ES 2 635 013 T3

Gly Pro Leu Arg Val Asn Pro His Ser Val Gly Asp Trp Val Glu Met
 325 330 335

Ile Leu Ser Lys Ala Phe Trp Ala Phe Tyr Arg Ile Tyr Ile Pro Leu
 340 345 350

Val Val Leu Gln Val Asp Ser Ser Arg Phe Trp Gly Val Phe Phe Leu
 355 360 365

Ala Glu Phe Met Thr Gly Trp Tyr Leu Ala Phe Asn Phe Gln Val Ser
 370 375 380

His Val Ser Thr Ala Cys Glu Tyr Pro Gly Gly Asp Glu Glu Val Thr
 385 390 395 400

Ala Ile Glu Asp Glu Trp Ala Val Ser Gln Ile Lys Ser Ser Val Asp
 405 410 415

Tyr Gly His Gly Ser Phe Leu Thr Ala Phe Leu Thr Gly Ala Leu Asn
 420 425 430

Tyr Gln Val Thr His His Leu Phe Pro Gly Val Ser Gln Tyr His Tyr
 435 440 445

Pro Ala Ile Ala Pro Ile Ile Ile Asp Val Cys Asn Lys Tyr Lys Ile
 450 455 460

Lys Tyr Thr Val Leu Pro Thr Phe Thr Glu Ala Leu Ala Gly His Phe
 465 470 475 480

Asp His Leu Val Val Met Gly Lys Met Gly Lys Pro Val Ser Val His
 485 490 495

Met Gly

<210> 11

<211> 903

<212> ADN

5 <213> Ostreococcus tauri

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<223> Delta-5-elongasa

10 <400> 11

ES 2 635 013 T3

atg tct gct tct gga gct ttg ttg cct gct att gct ttc gct gct tac	48
Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr	
1 5 10 15	
gct tac gct acc tac gct tat gct ttc gag tgg tct cat gct aac gga	96
Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly	
20 25 30	
atc gat aac gtg gat gct aga gag tgg att gga gct ttg tct ttg aga	144
Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg	
35 40 45	
ctc cct gca att gct acc acc atg tac ctc ttg ttc tgc ctt gtg gga	192
Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly	
50 55 60	
cct aga ttg atg gct aag agg gag gct ttt gat cct aag gga ttc atg	240
Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met	
65 70 75 80	
ctc gct tac aac gct tac caa acc gct ttc aac gtt gtg gtg ctc gga	288
Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly	
85 90 95	
atg ttc gct aga gag atc tct gga ttg gga caa cct gtt tgg gga tct	336
Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser	
100 105 110	
act atg cct tgg agc gat agg aag tcc ttc aag att ttg ttg gga gtg	384
Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val	
115 120 125	
tgg ctc cat tac aac aat aag tac ctc gag ttg ttg gat act gtg ttc	432
Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe	
130 135 140	
atg gtg gct agg aaa aag acc aag cag ctc tct ttc ttg cat gtg tac	480
Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr	
145 150 155 160	
cat cat gct ttg ttg att tgg gct tgg tgg ctt gtt tgt cat ctc atg	528
His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met	
165 170 175	
gct acc aac gat tgc atc gat gct tat ttc gga gct gct tgc aac tct	576
Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser	
180 185 190	
ttc atc cac atc gtg atg tac tcc tac tac ctc atg tct gct ttg gga	624
Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly	
195 200 205	
att aga tgc cct tgg aag aga tat atc acc cag gct cag atg ttg caa	672
Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln	
210 215 220	
ttc gtg atc gtg ttc gct cat gct gtt ttc gtg ctc aga caa aag cac	720

ES 2 635 013 T3

Phe	Val	Ile	Val	Phe	Ala	His	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Arg	Gln	Lys	His	
225					230					235					240	
tgc	cct	ggt	act	ttg	cct	tgg	gca	caa	atg	ttc	gtg	atg	aca	aat	atg	768
Cys	Pro	Val	Thr	Leu	Pro	Trp	Ala	Gln	Met	Phe	Val	Met	Thr	Asn	Met	
				245					250					255		
ttg	gtg	ctc	ttc	gga	aac	ttc	tac	ctc	aag	gct	tac	tct	aac	aag	tct	816
Leu	Val	Leu	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Ser	Asn	Lys	Ser	
			260					265					270			
agg	gga	gat	gga	gct	tct	tct	ggt	aag	cct	gct	gag	act	act	aga	gca	864
Arg	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Thr	Arg	Ala	
		275					280					285				
cct	tct	gtg	aga	aga	acc	agg	tcc	agg	aag	atc	gat	tga				903
Pro	Ser	Val	Arg	Arg	Thr	Arg	Ser	Arg	Lys	Ile	Asp					
	290					295					300					

<210> 12

<211> 300

<212> PRT

5 <213> *Ostreococcus tauri*

<400> 12

ES 2 635 013 T3

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly
 20 25 30

Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg
 35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly
 50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met
 65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly
 85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser
 100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val
 115 120 125

Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe
 130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr
 145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met
 165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser
 180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly
 195 200 205

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln
 210 215 220

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His
 225 230 235 240

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met
 245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser
 260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala
 275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp
 290 295 300

<210> 13

<211> 903

<212> ADN

<213> *Ostreococcus tauri*

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<223> Delta-5-elongasa

<400> 13

ES 2 635 013 T3

atg agc gcc tcc ggt gcg ctg ctg ccc gcg atc gcg ttc gcc gcg tac	48
Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr	
1 5 10 15	
gcg tac gcg acg tac gcc tac gcc ttt gag tgg tcg cac gcg aat ggc	96
Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly	
20 25 30	
atc gac aac gtc gac gcg cgc gag tgg atc ggt gcg ctg tcg ttg agg	144
Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg	
35 40 45	
ctc ccg gcg atc gcg acg acg atg tac ctg ttg ttc tgc ctg gtc gga	192
Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly	
50 55 60	
ccg agg ttg atg gcg aag cgc gag gcg ttc gac ccg aag ggg ttc atg	240
Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met	
65 70 75 80	
ctg gcg tac aat gcg tat cag acg gcg ttc aac gtc gtc gtg ctc ggg	288
Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly	
85 90 95	
atg ttc gcg cga gag atc tcg ggg ctg ggg cag ccc gtg tgg ggg tca	336
Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser	
100 105 110	
acc atg ccg tgg agc gat aga aaa tcg ttt aag atc ctc ctc ggg gtg	384
Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val	
115 120 125	
tgg ttg cac tac aac aac aaa tat ttg gag cta ttg gac act gtg ttc	432
Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe	
130 135 140	
atg gtt gcg cgc aag aag acg aag cag ttg agc ttc ttg cac gtt tat	480
Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr	
145 150 155 160	
cat cac gcc ctg ttg atc tgg gcg tgg tgg ttg gtg tgt cac ttg atg	528
His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met	
165 170 175	
gcc acg aac gat tgt atc gat gcc tac ttc gcc gcg gcg tgc aac tcg	576
Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser	
180 185 190	
ttc att cac atc gtg atg tac tcg tat tat ctc atg tcg gcg ctc ggc	624
Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly	
195 200 205	
att cga tgc ccg tgg aag cga tac atc acc cag gct caa atg ctc caa	672
Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln	
210 215 220	
ttc gtc att gtc ttc gcg cac gcc gtg ttc gtg ctg cgt cag aag cac	720
Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His	
225 230 235 240	
tgc ccg gtc acc ctt cct tgg gcg caa atg ttc gtc atg acg aac atg	768
Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met	
245 250 255	
ctc gtg ctc ttc ggg aac ttc tac ctc aag gcg tac tcg aac aag tcg	816
Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser	
260 265 270	
gcg ggc gac ggc gcg agt tcc gtg aaa cca gcc gag acc acg cgc gcg	864
Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala	
275 280 285	
ccc agc gtg cga cgc acg cga tct cga aaa att gac taa	903
Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp	
290 295 300	

ES 2 635 013 T3

<211> 300

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 14

ES 2 635 013 T3

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr
1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly
20 25 30

Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg
35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly
50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met
65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly
85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser
100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val
115 120 125

Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe
130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr
145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met
165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser
180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly
195 200 205

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln
210 215 220

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His
225 230 235 240

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met
245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser
260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala
275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp
290 295 300

<210> 15

<211> 1512

<212> ADN

<213> *Thalassiosira pseudonana*

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1512)

<223> Delta-4-desaturasa

<400> 15

ES 2 635 013 T3

atg tgc aac ggc aac ctc cca gca tcc acc gca cag ctc aag tcc acc	48
Met Cys Asn Gly Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ala Gln Leu Lys Ser Thr	
1 5 10 15	
tcg aag ccc cag cag caa cat gag cat cgc acc atc tcc aag tcc gag	96
Ser Lys Pro Gln Gln Gln His Glu His Arg Thr Ile Ser Lys Ser Glu	
20 25 30	
ctc gcc caa cac aac acg ccc aaa tca gca tgg tgt gcc gtc cac tcc	144
Leu Ala Gln His Asn Thr Pro Ser Lys Ser Ala Trp Cys Ala Val His Ser	
35 40 45	
act ccc gcc acc gac cca tcc cac tcc aac aac aaa caa cac gca cac	192
Thr Pro Ala Thr Asp Pro Ser His Ser Asn Asn Lys Gln His Ala His	
50 55 60	
cta gtc ctc gac att acc gac ttt gcg tcc cgc cat cca ggg gga gac	240
Leu Val Leu Asp Ile Thr Asp Phe Ala Ser Arg His Pro Gly Gly Asp	
65 70 75 80	
ctc atc ctc ctc gct tcc gcc aaa gac gcc tcg gtg ctg ttt gaa aca	288
Leu Ile Leu Leu Ala Ser Gly Lys Asp Ala Ser Val Leu Phe Glu Thr	
85 90 95	
tac cat cca cgt gga gtt ccg acg tct ctc att caa aag ctg cag att	336
Tyr His Pro Arg Gly Val Pro Thr Ser Leu Ile Gln Lys Leu Gln Ile	
100 105 110	
gga gtg atg gag gag gag gcg ttt cgg gat tcg ttt tac agt tgg act	384
Gly Val Met Glu Glu Glu Ala Phe Arg Asp Ser Phe Tyr Ser Trp Thr	
115 120 125	
gat tct gac ttt tat act gtg ttg aag agg agg gtt gtg gag cgg ttg	432
Asp Ser Asp Phe Tyr Thr Val Leu Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Leu	
130 135 140	
gag gag agg ggg ttg gac agg agg gga tcg aaa gag att tgg atc aag	480
Glu Glu Arg Gly Leu Asp Arg Arg Gly Ser Lys Glu Ile Trp Ile Lys	
145 150 155 160	
gct ttg ttc ttg ttg gtt gga ttt tgg tac tgt ttg tac aag atg tat	528
Ala Leu Phe Leu Leu Val Gly Phe Trp Tyr Cys Leu Tyr Lys Met Tyr	
165 170 175	
act acg tcg gat atc gat cag tac ggt att gcc att gcc tat tct att	576
Thr Thr Ser Asp Ile Asp Gln Tyr Gly Ile Ala Ile Ala Tyr Ser Ile	
180 185 190	
gga atg gga acc ttt gcg gca ttc atc gcc acg tgt att caa cac gat	624
Gly Met Gly Thr Phe Ala Ala Phe Ile Gly Thr Cys Ile Gln His Asp	
195 200 205	
gga aat cac ggt gca ttc gct cag aac aag tta ctc aac aag ttg gct	672
Gly Asn His Gly Ala Phe Ala Gln Asn Lys Leu Leu Asn Lys Leu Ala	
210 215 220	
ggg tgg acg ttg gat atg att ggt gcg agt gcg ttt acg tgg gag ctt	720
Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Phe Thr Trp Glu Leu	
225 230 235 240	
cag cac atg ctg ggg cat cat cca tat acg aat gtg ttg gat ggg gtg	768
Gln His Met Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Val Leu Asp Gly Val	
245 250 255	
gag gag gag agg aag gag agg ggg gag gat gtt gct ttg gaa gaa aag	816
Glu Glu Glu Arg Lys Glu Arg Gly Glu Asp Val Ala Leu Glu Glu Lys	
260 265 270	
gat cag gat ttt gaa gtt gcc aca tcc gga cga tta tat cat att gat	864

ES 2 635 013 T3

```

Asp Gln Asp Phe Glu Val Ala Thr Ser Gly Arg Leu Tyr His Ile Asp
      275                               280                               285

gcc aat gta cgt tat ggt tcg gta tgg aat gtc atg agg ttt tgg gct      912
Ala Asn Val Arg Tyr Gly Ser Val Trp Asn Val Met Arg Phe Trp Ala
      290                               295                               300

atg aag gtc att acg atg gga tat atg atg gga tta cca atc tac ttt      960
Met Lys Val Ile Thr Met Gly Tyr Met Met Gly Leu Pro Ile Tyr Phe
305                               310                               315

cat gga gta ctg agg gga gtt gga ttg ttt gtt att ggg cat ttg gcg      1008
His Gly Val Leu Arg Gly Val Gly Leu Phe Val Ile Gly His Leu Ala
      325                               330                               335

tgt gga gag ttg ttg gcg acg atg ttt att gtg aat cac gtc att gag      1056
Cys Gly Glu Leu Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His Val Ile Glu
      340                               345                               350

ggt gtg agt tat gga acg aag gat ttg gtt ggt ggt gcg agt cat gta      1104
Gly Val Ser Tyr Gly Thr Lys Asp Leu Val Gly Gly Ala Ser His Val
      355                               360                               365

gat gag aag aag att gtc aag cca acg act gta ttg gga gat aca cca      1152
Asp Glu Lys Lys Ile Val Lys Pro Thr Thr Val Leu Gly Asp Thr Pro
      370                               375                               380

atg gta aag act cgc gag gag gca ttg aaa agc aac agc aat aac aac      1200
Met Val Lys Thr Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Asn Ser Asn Asn Asn
385                               390                               395                               400

aag aag aag gga gag aag aac tcg gta cca tcc gtt cca ttc aac gac      1248
Lys Lys Lys Gly Glu Lys Asn Ser Val Pro Ser Val Pro Phe Asn Asp
      405                               410                               415

tgg gca gca gtc caa tgc cag acc tcc gtg aat tgg tct cca ggc tca      1296
Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr Ser Val Asn Trp Ser Pro Gly Ser
      420                               425                               430

tgg ttc tgg aat cac ttt tct ggg gga ctc tct cat cag att gag cat      1344
Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly Gly Leu Ser His Gln Ile Glu His
      435                               440                               445

cac ttg ttc ccc agc att tgt cat aca aac tac tgt cat atc cag gat      1392
His Leu Phe Pro Ser Ile Cys His Thr Asn Tyr Cys His Ile Gln Asp
      450                               455                               460

gtt gtg gag agt acg tgt gct gag tac gga gtt ccg tat cag agt gag      1440
Val Val Glu Ser Thr Cys Ala Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ser Glu
465                               470                               475                               480

agt aat ttg ttt gtt gct tat gga aag atg att agt cat ttg aag ttt      1488
Ser Asn Leu Phe Val Ala Tyr Gly Lys Met Ile Ser His Leu Lys Phe
      485                               490                               495

ttg ggt aaa gcc aag tgt gag tag      1512
Leu Gly Lys Ala Lys Cys Glu
      500

```

<210> 16

<211> 503

<212> PRT

5 <213> Thalassiosira pseudonana

<400> 16

ES 2 635 013 T3

Met Cys Asn Gly Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ala Gln Leu Lys Ser Thr
1 5 10 15

Ser Lys Pro Gln Gln Gln His Glu His Arg Thr Ile Ser Lys Ser Glu
20 25 30

Leu Ala Gln His Asn Thr Pro Lys Ser Ala Trp Cys Ala Val His Ser
35 40 45

Thr Pro Ala Thr Asp Pro Ser His Ser Asn Asn Lys Gln His Ala His
50 55 60

Leu Val Leu Asp Ile Thr Asp Phe Ala Ser Arg His Pro Gly Gly Asp
65 70 75 80

Leu Ile Leu Leu Ala Ser Gly Lys Asp Ala Ser Val Leu Phe Glu Thr
85 90 95

Tyr His Pro Arg Gly Val Pro Thr Ser Leu Ile Gln Lys Leu Gln Ile
100 105 110

Gly Val Met Glu Glu Glu Ala Phe Arg Asp Ser Phe Tyr Ser Trp Thr
115 120 125

Asp Ser Asp Phe Tyr Thr Val Leu Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Leu
130 135 140

Glu Glu Arg Gly Leu Asp Arg Arg Gly Ser Lys Glu Ile Trp Ile Lys
145 150 155 160

Ala Leu Phe Leu Leu Val Gly Phe Trp Tyr Cys Leu Tyr Lys Met Tyr
165 170 175

Thr Thr Ser Asp Ile Asp Gln Tyr Gly Ile Ala Ile Ala Tyr Ser Ile
180 185 190

Gly Met Gly Thr Phe Ala Ala Phe Ile Gly Thr Cys Ile Gln His Asp
195 200 205

Gly Asn His Gly Ala Phe Ala Gln Asn Lys Leu Leu Asn Lys Leu Ala
210 215 220

ES 2 635 013 T3

Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Phe Thr Trp Glu Leu
 225 230 235 240

Gln His Met Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Val Leu Asp Gly Val
 245 250 255

Glu Glu Glu Arg Lys Glu Arg Gly Glu Asp Val Ala Leu Glu Glu Lys
 260 265 270

Asp Gln Asp Phe Glu Val Ala Thr Ser Gly Arg Leu Tyr His Ile Asp
 275 280 285

Ala Asn Val Arg Tyr Gly Ser Val Trp Asn Val Met Arg Phe Trp Ala
 290 295 300

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

His Gly Val Leu Arg Gly Val Gly Leu Phe Val Ile Gly His Leu Ala
 325 330 335

Cys Gly Glu Leu Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His Val Ile Glu
 340 345 350

Gly Val Ser Tyr Gly Thr Lys Asp Leu Val Gly Gly Ala Ser His Val
 355 360 365

Asp Glu Lys Lys Ile Val Lys Pro Thr Thr Val Leu Gly Asp Thr Pro
 370 375 380

Met Val Lys Thr Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Asn Ser Asn Asn Asn
 385 390 395 400

Lys Lys Lys Gly Glu Lys Asn Ser Val Pro Ser Val Pro Phe Asn Asp
 405 410 415

Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr Ser Val Asn Trp Ser Pro Gly Ser
 420 425 430

Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly Gly Leu Ser His Gln Ile Glu His
 435 440 445

His Leu Phe Pro Ser Ile Cys His Thr Asn Tyr Cys His Ile Gln Asp
 450 455 460

Val Val Glu Ser Thr Cys Ala Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ser Glu
 465 470 475 480

Ser Asn Leu Phe Val Ala Tyr Gly Lys Met Ile Ser His Leu Lys Phe
 485 490 495

Leu Gly Lys Ala Lys Cys Glu
 500

<210> 17

<211> 1611

5 <212> ADN

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1611)

5 <223> Delta-4-desaturasa

<400> 17

ES 2 635 013 T3

atg tac ctc gga cgc ggc cgt ctc gag agc ggg acg acg cga ggg atg	48
Met Tyr Leu Gly Arg Gly Arg Leu Glu Ser Gly Thr Thr Arg Gly Met	
1 5 10 15	
atg cgg acg cac ggc cgg cga cgg tcg acg acg tcg aat ccg tgc gcg	96
Met Arg Thr His Ala Arg Arg Pro Ser Thr Thr Ser Asn Pro Cys Ala	
20 25 30	
cgg tca cgc gtg cgt aag acg acg gag cga tcg ctc gcg cga gtg cga	144
Arg Ser Arg Val Arg Lys Thr Thr Glu Arg Ser Leu Ala Arg Val Arg	
35 40 45	
cga tcg acg agt gag aag gga agc gcg ctc gtg ctc gag cga gag agc	192
Arg Ser Thr Ser Glu Lys Gly Ser Ala Leu Val Leu Glu Arg Glu Ser	
50 55 60	
gaa cgg gag aag gag gag gga ggg aaa gcg cga gcg gag gga ttg cga	240
Glu Arg Glu Lys Glu Glu Gly Gly Lys Ala Arg Ala Glu Gly Leu Arg	
65 70 75 80	
ttc caa cgc ccg gac gtc gcc gcg ccg ggg gga gcg gat cct tgg aac	288
Phe Gln Arg Pro Asp Val Ala Ala Pro Gly Gly Ala Asp Pro Trp Asn	
85 90 95	
gac gag aag tgg aca aag acc aag tgg acg gta ttc aga gac gtc gcg	336
Asp Glu Lys Trp Thr Lys Thr Lys Trp Thr Val Phe Arg Asp Val Ala	
100 105 110	
tac gat ctc gat cct ttc ttc gct cga cac ccc gga gga gac tgg ctc	384
Tyr Asp Leu Asp Pro Phe Phe Ala Arg His Pro Gly Gly Asp Trp Leu	
115 120 125	
ctg aac ttg gcc gtg gga cga gac tgc acc gcg ctc atc gaa tcc tat	432
Leu Asn Leu Ala Val Gly Arg Asp Cys Thr Ala Leu Ile Glu Ser Tyr	

ES 2 635 013 T3

130	135	140	
cac ttg cga cca gag gtg gcg acg gct cgt ttc aga atg ctg ccc aaa			480
His Leu Arg Pro Glu Val Ala Thr Ala Arg Phe Arg Met Leu Pro Lys			
145	150	155	160
ctc gag gat ttt ccc gtc gag gcc gtg ccc aag tcc ccg aga ccg aac			528
Leu Glu Asp Phe Pro Val Glu Ala Val Pro Lys Ser Pro Arg Pro Asn			
	165	170	175
gat tcc ccg tta tac aac aac att cgc aac cga gtc cgc gaa gag ctc			576
Asp Ser Pro Leu Tyr Asn Asn Ile Arg Asn Arg Val Arg Glu Glu Leu			
	180	185	190
ttc cca gag gag gga aag aat atg cac aga cag gcc gcc gac cac gcc			624
Phe Pro Glu Glu Gly Lys Asn Met His Arg Gln Gly Gly Asp His Gly			
	195	200	205
gac ggt gac gat tct ggg ttt cgc cgc ctt ttg ctt atg ccg tgt acc			672
Asp Gly Asp Asp Ser Gly Phe Arg Arg Leu Leu Leu Met Pro Cys Thr			
	210	215	220
tat tcc ctt ccg ggg gtt cct ttc cgg ctg cct cct cgg gtc tcg cgg			720
Tyr Ser Leu Pro Gly Val Pro Phe Arg Leu Pro Pro Arg Val Ser Arg			
	225	230	235
ggg cgt gga ttg gtc tca cga ttc agg cac tgc gcc aac cac gcc gcg			768
Gly Arg Gly Leu Val Ser Arg Phe Arg His Cys Ala Asn His Gly Ala			
	245	250	255
atg tct cct tcg ccg gcc gtt aac gcc gtc ctc ggt ttg acg aac gat			816
Met Ser Pro Ser Pro Ala Val Asn Gly Val Leu Gly Leu Thr Asn Asp			
	260	265	270
ctc atc gcc gcc tcg tcc ttg atg tgg aga tat cac cac caa gtc agc			864
Leu Ile Gly Gly Ser Ser Leu Met Trp Arg Tyr His His Gln Val Ser			
	275	280	285
cac cac att cat tgc aac gac aac gcc atg gat caa gac gtg tac acg			912
His His Ile His Cys Asn Asp Asn Ala Met Asp Gln Asp Val Tyr Thr			
	290	295	300
gcg atg cca tta ttg cgt ttc gac gct cgc cgg ccc aag tcc tgg tac			960
Ala Met Pro Leu Leu Arg Phe Asp Ala Arg Arg Pro Lys Ser Trp Tyr			
	305	310	315
cat cgc ttc cag cag tgg tac atg ttt tta gcg ttc ccg ttg ttg cag			1008
His Arg Phe Gln Gln Trp Tyr Met Phe Leu Ala Phe Pro Leu Leu Gln			
	325	330	335
gtt gcc ttc caa gtc gga gac att gcc gca ctg ttc acg cgt gat acc			1056
Val Ala Phe Gln Val Gly Asp Ile Ala Ala Leu Phe Thr Arg Asp Thr			
	340	345	350
gaa gcc gct aag ctt cac ggg gcg acg acg tgg gag ctt acc acg gtt			1104
Glu Gly Ala Lys Leu His Gly Ala Thr Thr Trp Glu Leu Thr Thr Val			
	355	360	365
gtc ctc ggt aag att gtg cac ttc ggt ctt ttg ttg ggg ccg ttg atg			1152
Val Leu Gly Lys Ile Val His Phe Gly Leu Leu Leu Gly Pro Leu Met			
	370	375	380
aac cac gcg gtg agt tct gtt ttg ctg ggg atc gtc ggt ttc atg gcg			1200
Asn His Ala Val Ser Ser Val Leu Leu Gly Ile Val Gly Phe Met Ala			

ES 2 635 013 T3

385		390		395		400	
tgc caa ggt ata gtt ctg gcg tgc acg ttt gct gtg agt cac aat gtc							1248
Cys Gln Gly Ile Val Leu Ala Cys Thr Phe Ala Val Ser His Asn Val							
		405		410		415	
gcg gag gcg aag ata cct gag gac acc gga gga gaa gcc tgg gag aga							1296
Ala Glu Ala Lys Ile Pro Glu Asp Thr Gly Gly Glu Ala Trp Glu Arg							
		420		425		430	
gat tgg ggt gtc cag cag ttg gtg act agc gcc gac tgg ggt gga aag							1344
Asp Trp Gly Val Gln Gln Leu Val Thr Ser Ala Asp Trp Gly Gly Lys							
		435		440		445	
ata ggt aac ttc ttc acg ggt ggc ctc aac ttg caa gtt gag cac cac							1392
Ile Gly Asn Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Leu Gln Val Glu His His							
		450		455		460	
ttg ttt ccg gcg att tgc ttc gtc cac tac ccg gac atc gcg aag atc							1440
Leu Phe Pro Ala Ile Cys Phe Val His Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Ile							
		465		470		475	480
gtg aag gaa gaa gcg gcc aag ctc aac atc cct tac gcg tct tac agg							1488
Val Lys Glu Glu Ala Ala Lys Leu Asn Ile Pro Tyr Ala Ser Tyr Arg							
		485		490		495	
act ctt cct ggt att ttc gtc caa ttc tgg aga ttt atg aag gac atg							1536
Thr Leu Pro Gly Ile Phe Val Gln Phe Trp Arg Phe Met Lys Asp Met							
		500		505		510	
ggc acg gct gag caa att ggt gaa gtt cca ttg ccg aag att ccc aac							1584
Gly Thr Ala Glu Gln Ile Gly Glu Val Pro Leu Pro Lys Ile Pro Asn							
		515		520		525	
ccg cag ctc gcg ccg aag ctc gct tag							1611
Pro Gln Leu Ala Pro Lys Leu Ala							
		530		535			

<210> 18

<211> 536

<212> PRT

5 <213> *Ostreococcus tauri*

<400> 18

ES 2 635 013 T3

Met Tyr Leu Gly Arg Gly Arg Leu Glu Ser Gly Thr Thr Arg Gly Met
1 5 10 15

Met Arg Thr His Ala Arg Arg Pro Ser Thr Thr Ser Asn Pro Cys Ala
20 25 30

Arg Ser Arg Val Arg Lys Thr Thr Glu Arg Ser Leu Ala Arg Val Arg
35 40 45

Arg Ser Thr Ser Glu Lys Gly Ser Ala Leu Val Leu Glu Arg Glu Ser
50 55 60

Glu Arg Glu Lys Glu Glu Gly Gly Lys Ala Arg Ala Glu Gly Leu Arg
65 70 75 80

Phe Gln Arg Pro Asp Val Ala Ala Pro Gly Gly Ala Asp Pro Trp Asn
85 90 95

Asp Glu Lys Trp Thr Lys Thr Lys Trp Thr Val Phe Arg Asp Val Ala
100 105 110

Tyr Asp Leu Asp Pro Phe Phe Ala Arg His Pro Gly Gly Asp Trp Leu
115 120 125

Leu Asn Leu Ala Val Gly Arg Asp Cys Thr Ala Leu Ile Glu Ser Tyr
130 135 140

His Leu Arg Pro Glu Val Ala Thr Ala Arg Phe Arg Met Leu Pro Lys
145 150 155 160

Leu Glu Asp Phe Pro Val Glu Ala Val Pro Lys Ser Pro Arg Pro Asn
165 170 175

Asp Ser Pro Leu Tyr Asn Asn Ile Arg Asn Arg Val Arg Glu Glu Leu
180 185 190

Phe Pro Glu Glu Gly Lys Asn Met His Arg Gln Gly Gly Asp His Gly
195 200 205

Asp Gly Asp Asp Ser Gly Phe Arg Arg Leu Leu Leu Met Pro Cys Thr
210 215 220

Tyr Ser Leu Pro Gly Val Pro Phe Arg Leu Pro Pro Arg Val Ser Arg
225 230 235 240

Gly Arg Gly Leu Val Ser Arg Phe Arg His Cys Ala Asn His Gly Ala
245 250 255

Met Ser Pro Ser Pro Ala Val Asn Gly Val Leu Gly Leu Thr Asn Asp
260 265 270

Leu Ile Gly Gly Ser Ser Leu Met Trp Arg Tyr His His Gln Val Ser
275 280 285

His His Ile His Cys Asn Asp Asn Ala Met Asp Gln Asp Val Tyr Thr
290 295 300

ES 2 635 013 T3

Ala Met Pro Leu Leu Arg Phe Asp Ala Arg Arg Pro Lys Ser Trp Tyr
 305 310 315 320

His Arg Phe Gln Gln Trp Tyr Met Phe Leu Ala Phe Pro Leu Leu Gln
 325 330 335

Val Ala Phe Gln Val Gly Asp Ile Ala Ala Leu Phe Thr Arg Asp Thr
 340 345 350

Glu Gly Ala Lys Leu His Gly Ala Thr Thr Trp Glu Leu Thr Thr Val
 355 360 365

Val Leu Gly Lys Ile Val His Phe Gly Leu Leu Leu Gly Pro Leu Met
 370 375 380

Asn His Ala Val Ser Ser Val Leu Leu Gly Ile Val Gly Phe Met Ala
 385 390 395 400

Cys Gln Gly Ile Val Leu Ala Cys Thr Phe Ala Val Ser His Asn Val
 405 410 415

Ala Glu Ala Lys Ile Pro Glu Asp Thr Gly Gly Glu Ala Trp Glu Arg
 420 425 430

Asp Trp Gly Val Gln Gln Leu Val Thr Ser Ala Asp Trp Gly Gly Lys
 435 440 445

Ile Gly Asn Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Leu Gln Val Glu His His
 450 455 460

Leu Phe Pro Ala Ile Cys Phe Val His Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Ile
 465 470 475 480

Val Lys Glu Glu Ala Ala Lys Leu Asn Ile Pro Tyr Ala Ser Tyr Arg
 485 490 495

Thr Leu Pro Gly Ile Phe Val Gln Phe Trp Arg Phe Met Lys Asp Met
 500 505 510

Gly Thr Ala Glu Gln Ile Gly Glu Val Pro Leu Pro Lys Ile Pro Asn
 515 520 525

Pro Gln Leu Ala Pro Lys Leu Ala
 530 535

<210> 19

<211> 1548

<212> ADN

5 <213> Thraustochytrium

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1548)

<223> Delta-4-desaturasa

<400> 19

ES 2 635 013 T3

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

ES 2 635 013 T3

aac aag gcg gcg ggc tgg acc ctc gac atg atc ggc gcg agt gcg atg Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met 195 200 205	624
acc tgg gag atg cag cac gtt ctt ggc cac cac ccg tac acc aac ctc Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu 210 215 220	672
atc gag atg gag aac ggt ttg gcc aag gtc aag ggc gcc gac gtc gac Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp 225 230 235 240	720
ccg aag aag gtc gac cag gag agc gac ccg gac gtc ttc agt acg tac Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr 245 250 255	768
ccg atg ctt cgc ctg cac ccg tgg cac cgc cag ccg ttt tac cac aag Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys 260 265 270	816
ttc cag cac ctg tac gcc ccg ttt atc ttt ggg tct atg acg att aac Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Phe Ile Phe Gly Ser Met Thr Ile Asn 275 280 285	864
aag gtg att tcc cag gat gtc ggg gtt gtg ctg cgc aag cgc ctg ttc Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe 290 295 300	912
cag atc gac gcc aac tgc cgg tat ggc agc ccc tgg tac gtg gcc cgc Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Tyr Val Ala Arg 305 310 315 320	960
ttc tgg atc atg aag ctc ctc acc acg ctc tac atg gtg gcg ctt ccc Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro 325 330 335	1008
atg tac atg cag ggg cct gct cag ggc ttg aag ctt ttc ttc atg gcc Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala 340 345 350	1056
cac ttc acc tgc gga gag gtc ctc gcc acc atg ttt att gtc aac cac His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His 355 360 365	1104
atc atc gag ggc gtc agc tac gct tcc aag gac gcg gtc aag ggc gtc Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val 370 375 380	1152
atg gct ccg ccg cgc act gtg cac ggt gtc acc ccg atg cag gtg acg Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr 385 390 395 400	1200
caa aag gcg ctc agt gcg gcc gag tcg gcc aag tcg gac gcc gac aag Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Ala Lys Ser Asp Ala Asp Lys 405 410 415	1248
acg acc atg atc ccc ctc aac gac tgg gcc gct gtg cag tgc cag acc Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr 420 425 430	1296
tct gtg aac tgg gct gtc ggg tcg tgg ttt tgg aac cac ttt tcg ggc Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly 435 440 445	1344

ES 2 635 013 T3

```

ggc ctc aac cac cag att gag cac cac tgc ttc ccc caa aac ccc cac    1392
Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His
   450                               455                               460

acg gtc aac gtc tac atc tcg ggc atc gtc aag gag acc tgc gaa gaa    1440
Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu
465                               470                               475                               480

tac ggc gtg ccg tac cag gct gag atc agc ctc ttc tct gcc tat ttc    1488
Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe
                               485                               490                               495

aag atg ctg tcg cac ctc cgc acg ctc ggc aac gag gac ctc acg gcc    1536
Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala
                               500                               505                               510

tgg tcc acg tga                                                    1548
Trp Ser Thr
   515

```

<210> 20

<211> 515

<212> PRT

5 <213> Thraustochytrium

<400> 20

ES 2 635 013 T3

Met Thr Val Gly Phe Asp Glu Thr Val Thr Met Asp Thr Val Arg Asn
 1 5 10 15

His Asn Met Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Thr Val Tyr
 20 25 30

Asp Ile Thr Lys Phe Ser Lys Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Met
 35 40 45

Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile
 50 55 60

Lys Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Lys Val Gly Lys Leu
 65 70 75 80

Pro Gln Gly Lys Lys Gly Glu Thr Ser His Met Pro Thr Gly Leu Asp
 85 90 95

Ser Ala Ser Tyr Tyr Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg
 100 105 110

Glu Arg Val Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Gly Leu Met Gln Arg Ala
 115 120 125

ES 2 635 013 T3

Arg Met Glu Leu Trp Ala Lys Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Phe Trp
 130 135 140

Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met
 145 150 155 160

Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys
 165 170 175

Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met
 180 185 190

Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met
 195 200 205

Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu
 210 215 220

Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp
 225 230 235 240

Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr
 245 250 255

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

Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Phe Ile Phe Gly Ser Met Thr Ile Asn
 275 280 285

Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe
 290 295 300

Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Tyr Val Ala Arg
 305 310 315 320

Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro
 325 330 335

Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala
 340 345 350

His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His
 355 360 365

Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val
 370 375 380

ES 2 635 013 T3

Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr
 385 390 395 400

Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Ala Lys Ser Asp Ala Asp Lys
 405 410 415

Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr
 420 425 430

Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly
 435 440 445

Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His
 450 455 460

Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu
 465 470 475 480

Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe
 485 490 495

Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala
 500 505 510

Trp Ser Thr
 515

<210> 21

<211> 1626

<212> ADN

5 <213> Euglena gracilis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1626)

<223> Delta-4-desaturasa

10 <400> 21

ES 2 635 013 T3

atg ttg gtg ctg ttt ggc aat ttc tat gtc aag caa tac tcc caa aag 48
 Met Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Lys Gln Tyr Ser Gln Lys
 1 5 10 15

aac ggc aag ccg gag aac gga gcc acc cct gag aac gga gcg aag ccg 96

Asn Gly Lys Pro Glu Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Gly Ala Lys Pro
 20 25 30

caa cct tgc gag aac ggc acg gtg gaa aag cga gag aat gac acc gcc 144
 Gln Pro Cys Glu Asn Gly Thr Val Glu Lys Arg Glu Asn Asp Thr Ala
 35 40 45

aac gtt cgg ccc acc cgt cca gct gga ccc ccg ccg gcc acg tac tac 192
 Asn Val Arg Pro Thr Arg Ser Ala Gly Pro Pro Pro Ala Thr Tyr Tyr
 50 55 60

gac tcc ctg gca gtg tcg ggg cag ggc aag gag cgg ctg ttc acc acc 240
 Asp Ser Leu Ala Val Ser Gly Gln Gly Lys Glu Arg Leu Phe Thr Thr
 65 70 75 80

gat gag gtg agg cgg cac atc ctc ccc acc gat ggc tgg ctg acg tgc 288
 Asp Glu Val Arg Arg His Ile Leu Pro Thr Asp Gly Trp Leu Thr Cys
 85 90 95

cac gaa gga gtc tac gat gtc act gat ttc ctt gcc aag cac cct ggt 336
 His Glu Gly Val Tyr Asp Val Thr Asp Phe Leu Ala Lys His Pro Gly
 100 105 110

ggc ggt gtc atc acg ctg ggc ctt gga agg gac tgc aca atc ctc atc 384
 Gly Gly Val Ile Thr Leu Gly Leu Gly Arg Asp Cys Thr Ile Leu Ile
 115 120 125

gag tca tac cac cct gct ggg cgc ccg gac aag gtg atg gag aag tac 432
 Glu Ser Tyr His Pro Ala Gly Arg Pro Asp Lys Val Met Glu Lys Tyr
 130 135 140

cgc att ggt acg ctg cag gac ccc aag acg ttc tat gct tgg gga gag 480
 Arg Ile Gly Thr Leu Gln Asp Pro Lys Thr Phe Tyr Ala Trp Gly Glu
 145 150 155 160

tcc gat ttc tac cct gag ttg aag cgc cgg gcc ctt gca agg ctg aag 528
 Ser Asp Phe Tyr Pro Glu Leu Lys Arg Arg Ala Leu Ala Arg Leu Lys
 165 170 175

gag gct ggt cag gcg cgg cgc ggc ggc ctt ggg gtg aag gcc ctc ctg 576
 Glu Ala Gly Gln Ala Arg Arg Gly Gly Leu Gly Val Lys Ala Leu Leu
 180 185 190

gtg ctc acc ctc ttc ttc gtg tcg tgg tac atg tgg gtg gcc cac aag 624
 Val Leu Thr Leu Phe Phe Val Ser Trp Tyr Met Trp Val Ala His Lys
 195 200 205

tcc ttc ctc tgg gcc gcc gtc tgg ggc ttc gcc ggc tcc cac gtc ggg 672
 Ser Phe Leu Trp Ala Ala Val Trp Gly Phe Ala Gly Ser His Val Gly
 210 215 220

ctg agc atc cag cac gat ggc aac cac ggc gcg ttc agc cgc aac aca 720
 Leu Ser Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly Ala Phe Ser Arg Asn Thr
 225 230 235 240

ctg gtg aac cgc ctg gcg ggg tgg ggc atg gac ttg atc gcc gcg tcg 768
 Leu Val Asn Arg Leu Ala Gly Trp Gly Met Asp Leu Ile Gly Ala Ser
 245 250 255

tcc acg gtg tgg gag tac cag cac gtc atc ggc cac cac cag tac acc 816
 Ser Thr Val Trp Glu Tyr Gln His Val Ile Gly His His Gln Tyr Thr
 260 265 270

ES 2 635 013 T3

aac ctc gtg tgc gac acg cta ttc agt ctg cct gag aac gat ccg gac 864
 Asn Leu Val Ser Asp Thr Leu Phe Ser Leu Pro Glu Asn Asp Pro Asp
 275 280 285

gtc ttc tcc agc tac ccg ctg atg cgc atg cac ccg gat acg gcg tgg 912
 Val Phe Ser Ser Tyr Pro Leu Met Arg Met His Pro Asp Thr Ala Trp
 290 295 300

cag ccg cac cac cgc ttc cag cac ctg ttc gcg ttc cca ctg ttc gcc 960
 Gln Pro His His Arg Phe Gln His Leu Phe Ala Phe Pro Leu Phe Ala
 305 310 315 320

ctg atg aca atc agc aag gtg ctg acc agc gat ttc gct gtc tgc ctc 1008
 Leu Met Thr Ile Ser Lys Val Leu Thr Ser Asp Phe Ala Val Cys Leu
 325 330 335

agc atg aag aag ggg tcc atc gac tgc tcc tcc agg ctc gtc cca ctg 1056
 Ser Met Lys Lys Gly Ser Ile Asp Cys Ser Ser Arg Leu Val Pro Leu
 340 345 350

gag ggg cag ctg ctg ttc tgg ggg gcc aag ctg gcg aac ttc ctg ttg 1104
 Glu Gly Gln Leu Leu Phe Trp Gly Ala Lys Leu Ala Asn Phe Leu Leu
 355 360 365

cag att gtg ttg cca tgc tac ctc cac ggg aca gct atg ggc ctg gcc 1152
 Gln Ile Val Leu Pro Cys Tyr Leu His Gly Thr Ala Met Gly Leu Ala
 370 375 380

ctc ttc tct gtt gct cac ctt gtg tgc ggg gag tac ctc gcg atc tgc 1200
 Leu Phe Ser Val Ala His Leu Val Ser Gly Glu Tyr Leu Ala Ile Cys
 385 390 395 400

ttc atc atc aac cac atc agc gag tct tgt gag ttt atg aat aca agc 1248
 Phe Ile Ile Asn His Ile Ser Glu Ser Cys Glu Phe Met Asn Thr Ser
 405 410 415

ttt caa acc gcc gcc cgg agg aca gag atg ctt cag gca gca cat cag 1296
 Phe Gln Thr Ala Ala Arg Arg Thr Glu Met Leu Gln Ala Ala His Gln
 420 425 430

gca gcg gag gcc aag aag gtg aag ccc acc cct cca ccg aac gat tgg 1344
 Ala Ala Glu Ala Lys Lys Val Lys Pro Thr Pro Pro Pro Asn Asp Trp
 435 440 445

gct gtg aca cag gtc caa tgc tgc gtg aat tgg aga tca ggt ggc gtg 1392
 Ala Val Thr Gln Val Gln Cys Cys Val Asn Trp Arg Ser Gly Gly Val
 450 455 460

ttg gcc aat cac ctc tct gga ggc ttg aac cac cag atc gag cat cat 1440
 Leu Ala Asn His Leu Ser Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His
 465 470 475 480

ctg ttc ccc agc atc tgc cat gcc aac tac ccc acc atc gcc cct gtt 1488
 Leu Phe Pro Ser Ile Ser His Ala Asn Tyr Pro Thr Ile Ala Pro Val
 485 490 495

gtg aag gag gtg tgc gag gag tac ggg ttg ccg tac aag aat tac gtc 1536
 Val Lys Glu Val Cys Glu Glu Tyr Gly Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Val
 500 505 510

acg ttc tgg gat gca gtc tgt ggc atg gtt cag cac ctc cgg ttg atg 1584
 Thr Phe Trp Asp Ala Val Cys Gly Met Val Gln His Leu Arg Leu Met
 515 520 525

ggt gct cca ccg gtg cca acg aac ggg gac aaa aag tca taa 1626
 Gly Ala Pro Pro Val Pro Thr Asn Gly Asp Lys Lys Ser
 530 535 540

<210> 22

<211> 541

<212> PRT

<213> *Euglena gracilis*

<400> 22

ES 2 635 013 T3

Met Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Lys Gln Tyr Ser Gln Lys
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Pro Glu Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Gly Ala Lys Pro
 20 25 30

Gln Pro Cys Glu Asn Gly Thr Val Glu Lys Arg Glu Asn Asp Thr Ala
 35 40 45

Asn Val Arg Pro Thr Arg Pro Ala Gly Pro Pro Pro Ala Thr Tyr Tyr
 50 55 60

Asp Ser Leu Ala Val Ser Gly Gln Gly Lys Glu Arg Leu Phe Thr Thr
 65 70 75 80

Asp Glu Val Arg Arg His Ile Leu Pro Thr Asp Gly Trp Leu Thr Cys
 85 90 95

His Glu Gly Val Tyr Asp Val Thr Asp Phe Leu Ala Lys His Pro Gly
 100 105 110

Gly Gly Val Ile Thr Leu Gly Leu Gly Arg Asp Cys Thr Ile Leu Ile
 115 120 125

Glu Ser Tyr His Pro Ala Gly Arg Pro Asp Lys Val Met Glu Lys Tyr
 130 135 140

Arg Ile Gly Thr Leu Gln Asp Pro Lys Thr Phe Tyr Ala Trp Gly Glu
 145 150 155 160

Ser Asp Phe Tyr Pro Glu Leu Lys Arg Arg Ala Leu Ala Arg Leu Lys
 165 170 175

ES 2 635 013 T3

Glu Ala Gly Gln Ala Arg Arg Gly Gly Leu Gly Val Lys Ala Leu Leu
 180 185 190

Val Leu Thr Leu Phe Phe Val Ser Trp Tyr Met Trp Val Ala His Lys
 195 200 205

Ser Phe Leu Trp Ala Ala Val Trp Gly Phe Ala Gly Ser His Val Gly
 210 215 220

Leu Ser Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly Ala Phe Ser Arg Asn Thr
 225 230 235 240

Leu Val Asn Arg Leu Ala Gly Trp Gly Met Asp Leu Ile Gly Ala Ser
 245 250 255

Ser Thr Val Trp Glu Tyr Gln His Val Ile Gly His His Gln Tyr Thr
 260 265 270

Asn Leu Val Ser Asp Thr Leu Phe Ser Leu Pro Glu Asn Asp Pro Asp
 275 280 285

Val Phe Ser Ser Tyr Pro Leu Met Arg Met His Pro Asp Thr Ala Trp
 290 295 300

Gln Pro His His Arg Phe Gln His Leu Phe Ala Phe Pro Leu Phe Ala
 305 310 315 320

Leu Met Thr Ile Ser Lys Val Leu Thr Ser Asp Phe Ala Val Cys Leu
 325 330 335

Ser Met Lys Lys Gly Ser Ile Asp Cys Ser Ser Arg Leu Val Pro Leu
 340 345 350

Glu Gly Gln Leu Leu Phe Trp Gly Ala Lys Leu Ala Asn Phe Leu Leu
 355 360 365

Gln Ile Val Leu Pro Cys Tyr Leu His Gly Thr Ala Met Gly Leu Ala
 370 375 380

Leu Phe Ser Val Ala His Leu Val Ser Gly Glu Tyr Leu Ala Ile Cys
 385 390 395 400

Phe Ile Ile Asn His Ile Ser Glu Ser Cys Glu Phe Met Asn Thr Ser
 405 410 415

Phe Gln Thr Ala Ala Arg Arg Thr Glu Met Leu Gln Ala Ala His Gln
 420 425 430

ES 2 635 013 T3

Ala Ala Glu Ala Lys Lys Val Lys Pro Thr Pro Pro Pro Asn Asp Trp
435 440 445

Ala Val Thr Gln Val Gln Cys Cys Val Asn Trp Arg Ser Gly Gly Val
450 455 460

Leu Ala Asn His Leu Ser Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His
465 470 475 480

Leu Phe Pro Ser Ile Ser His Ala Asn Tyr Pro Thr Ile Ala Pro Val
485 490 495

Val Lys Glu Val Cys Glu Glu Tyr Gly Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Val
500 505 510

Thr Phe Trp Asp Ala Val Cys Gly Met Val Gln His Leu Arg Leu Met
515 520 525

Gly Ala Pro Pro Val Pro Thr Asn Gly Asp Lys Lys Ser
530 535 540

<210> 23

<211> 1092

<212> ADN

5 <213> Phytophthora sojae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1092)

<223> Omega-3-desaturasa

10 <400> 23

ES 2 635 013 T3

50	55	60	
gcg ctg gac gcc gcg ctc tgc acg ggc tac gtg ctg ctg cag gcc atc			240
Ala Leu Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu Leu Gln Gly Ile			
65	70	75	80
gtg ttc tgg ggc ttc ttc acc gtg ggc cat gac gcc ggc cac gcc gcc			288
Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala			
	85	90	95
ttc tcg cgc tac cac ctg ctc aac ttc gtg atc ggc acc ttc atc cac			336
Phe Ser Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Ile Gly Thr Phe Ile His			
	100	105	110
tcg ctc atc ctg acg ccc ttc gag tcg tgg aag ctc acg cac cgc cac			384
Ser Leu Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His			
	115	120	125
cac cac aag aac acg ggc aac atc gac cgc gac gag atc ttc tac ccg			432
His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Ile Phe Tyr Pro			
	130	135	140
cag cgc aag gcc gac gac cac ccg ctc tcg cgt aac ctc atc ctg gcg			480
Gln Arg Lys Ala Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala			
	145	150	155
ctg ggc gcc gcg tgg ttc gcc tac ctg gtc gag ggc ttc ccg ccg cgc			528
Leu Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg			
	165	170	175
aag gtc aac cac ttc aac ccg ttc gag ccg ctg ttc gtc cgc cag gtg			576
Lys Val Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val			
	180	185	190
tcc gcc gtg gtc atc tcg ctg gcc gcg cac ttc ggc gtg gcc gcg ctg			624
Ser Ala Val Val Ile Ser Leu Ala Ala His Phe Gly Val Ala Ala Leu			
	195	200	205
tcc atc tac ctg agc ctg cag ttc ggc ttc aag acc atg gct atc tac			672
Ser Ile Tyr Leu Ser Leu Gln Phe Gly Phe Lys Thr Met Ala Ile Tyr			
	210	215	220
tac tac ggg ccc gtg ttc gtg ttc ggc agc atg ctg gtc atc acc acc			720
Tyr Tyr Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr			
	225	230	235
ttc ctg cac cac aac gac gag gag acc ccc tgg tac gcc gac tog gag			768
Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu			
	245	250	255
tgg acc tac gtc aag ggc aac ctc tcg tcg gtc gac cgc tcc tac gcc			816
Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly			
	260	265	270
gcg ctc atc gac aac ctg agc cac aac atc ggc acg cac cag atc cac			864
Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His			
	275	280	285
cac ctc ttc ccc atc atc ccg cac tat aag ctc aag cgc gcc acc gag			912
His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Arg Ala Thr Glu			
	290	295	300
gcc ttc cac cag gcg ttc ccc gag ctc gtg cgc aag agc gac gag ccc			960
Ala Phe His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro			

ES 2 635 013 T3

305		310		315		320	
atc att aag gcc ttc ttc cgc gtc ggc cgc ctc tac gcc aac tac ggc							1008
Ile Ile Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly							
		325		330		335	
gtc gtg gac tcg gac gcc aag ctc ttc acg ctc aag gag gcc aag gcc							1056
Val Val Asp Ser Asp Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala							
		340		345		350	
gtg tcc gag gcg gcg acc aag act aag gcc aac tga							1092
Val Ser Glu Ala Ala Thr Lys Thr Lys Ala Asn							
		355		360			

<210> 24

<211> 363

<212> PRT

5 <213> Phytophthora sojae

<400> 24

ES 2 635 013 T3

Met Ala Ser Lys Gln Glu Gln Pro Tyr Gln Phe Pro Thr Leu Thr Glu
 1 5 10 15

Ile Lys Arg Ser Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu
 20 25 30

Ser Leu Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ser Leu Ala
 35 40 45

Phe Gly Leu His His Ala Arg Ser Leu Pro Val Val Glu Gly Leu Trp
 50 55 60

Ala Leu Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu Leu Gln Gly Ile
 65 70 75 80

Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala
 85 90 95

Phe Ser Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Ile Gly Thr Phe Ile His
 100 105 110

Ser Leu Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His
 115 120 125

His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Ile Phe Tyr Pro
 130 135 140

Gln Arg Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala

ES 2 635 013 T3

atg gcg atc ctg aac ccg gag gcc gac tcg gcc gcc aat ctg gcc acc	48
Met Ala Ile Leu Asn Pro Glu Ala Asp Ser Ala Ala Asn Leu Ala Thr	
1 5 10 15	
gac agc gag gcc aag cag cgc cag ctc gcg gag gcc ggc tac acg cac	96
Asp Ser Glu Ala Lys Gln Arg Gln Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Thr His	
20 25 30	
gtg gag ggc gcg ccg gcg cca ctg ccg ctg gag ctg ccg cac ttc tcg	144
Val Glu Gly Ala Pro Ala Pro Leu Pro Leu Glu Leu Pro His Phe Ser	
35 40 45	
ctg cgc gac ctg cgc gcc gcc atc ccc aag cac tgc ttc gag cgc tcg	192
Leu Arg Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Phe Glu Arg Ser	
50 55 60	
ttc gtc acg tcc acg tac tac atg atc aag aac gtg ctc acg tgc gcc	240
Phe Val Thr Ser Thr Tyr Tyr Met Ile Lys Asn Val Leu Thr Cys Ala	
65 70 75 80	
gcg ctc ttc tac gcg gcc acc ttc atc gac cgc gcg ggc gcc gcc gcc	288
Ala Leu Phe Tyr Ala Ala Thr Phe Ile Asp Arg Ala Gly Ala Ala Ala	
85 90 95	
tac gtg ctg tgg ccc gtg tac tgg ttc ttc cag ggc agc tac ctc acg	336
Tyr Val Leu Trp Pro Val Tyr Trp Phe Phe Gln Gly Ser Tyr Leu Thr	
100 105 110	
ggc gtc tgg gtc atc gcg cac gag tgt ggc cac cag gcc tac tgc tcg	384
Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His Gln Ala Tyr Cys Ser	
115 120 125	
agc gag gtc gtc aac aac ctc atc ggc ctc gta ctg cac tcg gcg ctg	432
Ser Glu Val Val Asn Asn Leu Ile Gly Leu Val Leu His Ser Ala Leu	
130 135 140	
ctt gtg ccg tac cac agc tgg cgc atc tcg cac cgc aag cac cac tcc	480
Leu Val Pro Tyr His Ser Trp Arg Ile Ser His Arg Lys His His Ser	
145 150 155 160	
aac acg ggc agc tgc gag aac gac gag gtg ttc gtg ccc gtg acc cgc	528
Asn Thr Gly Ser Cys Glu Asn Asp Glu Val Phe Val Pro Val Thr Arg	
165 170 175	
tcg gtg ctc gcc agc tcc tgg aac gag acg ctc gag gac tcg ccg ctc	576
Ser Val Leu Ala Ser Ser Trp Asn Glu Thr Leu Glu Asp Ser Pro Leu	
180 185 190	
tac cag ctc tac cgc atc gtg tac atg ctg gtc gtg ggc tgg atg ccc	624
Tyr Gln Leu Tyr Arg Ile Val Tyr Met Leu Val Val Gly Trp Met Pro	
195 200 205	

ES 2 635 013 T3

```

ggc tac ctc ttc ttc aac gcc acg ggc ccg acc aag tac tgg gcc aag      672
Gly Tyr Leu Phe Phe Asn Ala Thr Gly Pro Thr Lys Tyr Trp Gly Lys
      210                      215                      220

tcg cgc agc cac ttc aac ccg tac tcg gcc atc tac gcc gac cgc gag      720
Ser Arg Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ala Ile Tyr Ala Asp Arg Glu
225                      230                      235                      240

cgc tgg atg atc gtg ctg agc gac atc ttc ctc gtg gcc atg ctg gcc      768
Arg Trp Met Ile Val Leu Ser Asp Ile Phe Leu Val Ala Met Leu Ala
      245                      250                      255

gtg ctg gcc gcg ctc gtg cac acc ttc tcc ttc aac acc atg gtc aag      816
Val Leu Ala Ala Leu Val His Thr Phe Ser Phe Asn Thr Met Val Lys
      260                      265                      270

ttc tac gtc gtg ccc tac ttc atc gtc aac gcc tac ctc gtg ctt atc      864
Phe Tyr Val Val Pro Tyr Phe Ile Val Asn Ala Tyr Leu Val Leu Ile
      275                      280                      285

acg tac ctg cag cac acg gac acg tac atc ccg cac ttc cgc gag gcc      912
Thr Tyr Leu Gln His Thr Asp Thr Tyr Ile Pro His Phe Arg Glu Gly
      290                      295                      300

gag tgg aac tgg ctg cgc gcc gcg ctt tgc acg gtg gac cgg tcg ttc      960
Glu Trp Asn Trp Leu Arg Gly Ala Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Phe
305                      310                      315                      320

ggc ccg ttc ctc gac tcg gtg gtg cac cgc atc gtg gac acg cac gtg      1008
Gly Pro Phe Leu Asp Ser Val Val His Arg Ile Val Asp Thr His Val
      325                      330                      335

tgc cac cac atc ttc tcc aag atg ccg ttc tac cac tgc gag gag gcc      1056
Cys His His Ile Phe Ser Lys Met Pro Phe Tyr His Cys Glu Glu Ala
      340                      345                      350

acg aac gcc atc aag ccg ctg ctg gcc aag ttc tac ctc aag gac acg      1104
Thr Asn Ala Ile Lys Pro Leu Leu Gly Lys Phe Tyr Leu Lys Asp Thr
      355                      360                      365

acg ccc gtg ccc gtc gcg ctc tgg cgg tcc tac acg cac tgc aag ttc      1152
Thr Pro Val Pro Val Ala Leu Trp Arg Ser Tyr Thr His Cys Lys Phe
      370                      375                      380

gtc gag gac gac gcc aag gtc gtc ttc tac aag aac aag ctc taa      1197
Val Glu Asp Asp Gly Lys Val Val Phe Tyr Lys Asn Lys Leu
385                      390                      395

```

<210> 26

<211> 398

<212> PRT

5 <213> *Phytophthora sojae*

<400> 26

ES 2 635 013 T3

Met Ala Ile Leu Asn Pro Glu Ala Asp Ser Ala Ala Asn Leu Ala Thr
1 5 10 15
Asp Ser Glu Ala Lys Gln Arg Gln Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Thr His
20 25 30
Val Glu Gly Ala Pro Ala Pro Leu Pro Leu Glu Leu Pro His Phe Ser
35 40 45
Leu Arg Asp Leu Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Phe Glu Arg Ser
50 55 60
Phe Val Thr Ser Thr Tyr Tyr Met Ile Lys Asn Val Leu Thr Cys Ala
65 70 75 80
Ala Leu Phe Tyr Ala Ala Thr Phe Ile Asp Arg Ala Gly Ala Ala Ala
85 90 95
Tyr Val Leu Trp Pro Val Tyr Trp Phe Phe Gln Gly Ser Tyr Leu Thr
100 105 110
Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His Gln Ala Tyr Cys Ser
115 120 125
Ser Glu Val Val Asn Asn Leu Ile Gly Leu Val Leu His Ser Ala Leu
130 135 140
Leu Val Pro Tyr His Ser Trp Arg Ile Ser His Arg Lys His His Ser
145 150 155 160
Asn Thr Gly Ser Cys Glu Asn Asp Glu Val Phe Val Pro Val Thr Arg
165 170 175
Ser Val Leu Ala Ser Ser Trp Asn Glu Thr Leu Glu Asp Ser Pro Leu
180 185 190
Tyr Gln Leu Tyr Arg Ile Val Tyr Met Leu Val Val Gly Trp Met Pro
195 200 205
Gly Tyr Leu Phe Phe Asn Ala Thr Gly Pro Thr Lys Tyr Trp Gly Lys
210 215 220
Ser Arg Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ala Ile Tyr Ala Asp Arg Glu
225 230 235 240
Arg Trp Met Ile Val Leu Ser Asp Ile Phe Leu Val Ala Met Leu Ala
245 250 255
Val Leu Ala Ala Leu Val His Thr Phe Ser Phe Asn Thr Met Val Lys
260 265 270

ES 2 635 013 T3

Phe Tyr Val Val Pro Tyr Phe Ile Val Asn Ala Tyr Leu Val Leu Ile
 275 280 285

Thr Tyr Leu Gln His Thr Asp Thr Tyr Ile Pro His Phe Arg Glu Gly
 290 295 300

Glu Trp Asn Trp Leu Arg Gly Ala Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Phe
 305 310 315 320

Gly Pro Phe Leu Asp Ser Val Val His Arg Ile Val Asp Thr His Val
 325 330 335

Cys His His Ile Phe Ser Lys Met Pro Phe Tyr His Cys Glu Glu Ala
 340 345 350

Thr Asn Ala Ile Lys Pro Leu Leu Gly Lys Phe Tyr Leu Lys Asp Thr
 355 360 365

Thr Pro Val Pro Val Ala Leu Trp Arg Ser Tyr Thr His Cys Lys Phe
 370 375 380

Val Glu Asp Asp Gly Lys Val Val Phe Tyr Lys Asn Lys Leu
 385 390 395

<210> 27

<211> 24

<212> ADN

5 <213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (1)..(24)

<223> cebador

<400> 27

gccatggccc ccatcgagac cgac 24

<210> 28

15 <211> 20

<212> ADN

<213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

20 <400> 28

ttagcccatg tggacggaca 20

<210> 29

<211> 25

<212> ADN

5 <213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (1)..(25)

<223> cebador

<400> 29

accatggtgg atggcccaa gacca 25

<210> 30

15 <211> 25

<212> ADN

<213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

20 <220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(25)

<223> cebador

<400> 30

25 ttacatggcc gggaactcga gcagg 25

<210> 31

<211> 22

<212> ADN

<213> desconocido

30 <220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(22)

<223> cebador
<400> 31
gccatggcga tctgaacct gg 22
<210> 32
5 <211> 19
<212> ADN
<213> desconocido
<220>
<223> secuencia artificial
10 <220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(19)
<223> cebador
<400> 32
15 tagagcttgt tottgtaga 19
<210> 33
<211> 23
<212> ADN
<213> desconocido
20 <220>
<223> secuencia artificial
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(23)
25 <223> cebador
<400> 33
gccatggcgt ccaagcagga gca 23
<210> 34
<211> 25
30 <212> ADN
<213> desconocido
<220>
<223> secuencia artificial
<220>

<221> característica_misc
<222> (1)..(25)
<223> cebador
<400> 34

5 tcagttggcc ttagtcttgg tcgcc 25
<210> 35
<211> 24
<212> ADN
<213> desconocido

10 <220>
<223> secuencia artificial
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(24)

15 <223> cebador
<400> 35
aagatggaga cgaccttcgc gcgc 24
<210> 36
<211> 28

20 <212> ADN
<213> desconocido
<220>
<223> secuencia artificial
<220>

25 <221> característica_misc
<222> (1)..(28)
<223> cebador
<400> 36
ttactgcgtc ttcttggcga ccgcagcg 28

30 <210> 37
<211> 23
<212> ADN
<213> desconocido
<220>

<223> secuencia artificial
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(23)
 5 <223> cebador
 <400> 37
 gccatggcgt cggagctgct gca 23
 <210> 38
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 15 <221> característica_misc
 <222> (1)..(21)
 <223> cebador
 <400> 38
 ttagaggttc ttctggccg g 21
 20 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 25 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(22)
 <223> cebador
 30 <400> 39
 accatgtcgg ccgacctgct gc 22
 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN

<213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 5 <221> característica_misc
 <222> (1)..(18)
 <223> cebador
 <400> 40
 ttagagcttc ttcttggc 18
 10 <210> 41
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 15 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(32)
 <223> cebador
 20 <400> 41
 gcggccgcgc catggccccc atcgagaccg ac 32
 <210> 42
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (1)..(28)
 <223> cebador
 <400> 42
 gcggccgctt agcccatgtg gacggaca 28
 <210> 43

<211> 33
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 5 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(33)
 <223> cebador
 10 <400> 43
 gcggccgcac catggtggat ggccccaaga cca 33
 <210> 44
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (1)..(33)
 <223> cebador
 <400> 44
 gcggccgctt acatggccgg gaactcgagc agg 33
 <210> 45
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(30)
 <223> cebador
 <400> 45

gcggccgcgcatggcgatcctgaacccgg 30

<210> 46

<211> 27

<212> ADN

5 <213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (1)..(27)

<223> cebador

<400> 46

gcggccgctagagctgttc ttgtaga 27

<210> 47

15 <211> 31

<212> ADN

<213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

20 <220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(31)

<223> cebador

<400> 47

25 gcggccgcgcatggcgctcc aagcaggagc a 31

<210> 48

<211> 33

<212> ADN

<213> desconocido

30 <220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(33)

<223> cebador
<400> 48
gcggccgctc agtggcctt agtcttggc gcc 33
<210> 49
5 <211> 32
<212> ADN
<213> desconocido
<220>
<223> secuencia artificial
10 <220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(32)
<223> cebador
<400> 49
15 gcggccgcaa gatggagacg accttcgcbc gc 32
<210> 50
<211> 36
<212> ADN
<213> desconocido
20 <220>
<223> secuencia artificial
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(36)
25 <223> cebador
<400> 50
gcggccgctt actgcgtctt cttggcgacc gcagcg 36
<210> 51
<211> 31
30 <212> ADN
<213> desconocido
<220>
<223> secuencia artificial
<220>

<221> característica_misc
 <222> (1)..(31)
 <223> cebador
 <400> 51
 5 gcggccgcg catggcgtcg gagctgctgc a 31
 <210> 52
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> desconocido
 10 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(29)
 15 <223> cebador
 <400> 52
 gcggccgctt agaggttctt ctggccgg 29
 <210> 53
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 25 <221> característica_misc
 <222> (1)..(30)
 <223> cebador
 <400> 53
 gcggccgcac catgtcgcc gacctgctgc 30
 30 <210> 54
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(26)

5 <223> cebador

<400> 54

gcggccgctt agagcttctt cttggc 26

<210> 55

<211> 60

10 <212> ADN

<213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

<220>

15 <221> característica_misc

<222> (1)..(60)

<223> cebador

<400> 55

gtcgacccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccggatctgc tggctatgaa 60

20

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de Δ -12-desaturasa, seleccionándose el ácido nucleico del grupo compuesto por:
 - a) un ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 25, o
 - 5 b) ácidos nucleicos que codifican un polipéptido con la secuencia representada en SEQ ID NO: 26, o
 - c) ácidos nucleicos que codifican un polipéptido con al menos el 70 % de identidad a nivel de aminoácidos con SEQ ID NO: 26, o
 - d) un ácido nucleico que puede obtenerse con amplificación de *Phytophthora sojae* con el par de cebadores (i) SEQ ID NO. 45 y SEQ ID NO. 46 o (ii) SEQ ID NO. 31 y SEQ ID NO. 32.
- 10 2. Proteína codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Constructo génico que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, estando el ácido nucleico unido de manera funcional a una o varias señales de regulación.
4. Constructo génico de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el constructo de ácido nucleico contiene genes adicionales de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido, seleccionados del grupo de
 - 15 acilo-CoA-deshidrogenasa(s), acilo-ACP[= acyl carrier protein]-desaturasa(s), acilo-ACP-tioesterasa(s), ácido graso-acilo-transferasa(s), acilo-CoA:lisofosfolípido-aciltransferasa(s), ácido graso-sintasa(s), ácido graso-hidroxilasa(s), acetil-coenzima A-carboxilasa(s), acilo-coenzima A-oxidasa(s), ácido graso-desaturasa(s), ácido graso-acetilenasas, lipoxigenasas, triacilglicerol-lipasas, alenóxido-sintasas, hidroperóxido-liasas o ácido graso-elongasa(s).
5. Constructo génico de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado porque el constructo de ácido nucleico contiene genes de biosíntesis adicionales del metabolismo de ácido graso o de lípido, seleccionados del grupo de
 - 20 las Δ -4-desaturasas, Δ -5-desaturasas, Δ -6-desaturasas, Δ -8-desaturasas, Δ -12-desaturasas o Δ -9-elongasas.
6. Vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o un constructo génico de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Organismo no humano, transgénico para al menos un constructo génico de acuerdo con una de las
 - 25 reivindicaciones 3 a 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 6 o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Organismo no humano transgénico que contiene al menos un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, un constructo génico de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 5, un vector de acuerdo con la reivindicación 6 o un organismo de acuerdo con la reivindicación 7, donde organismo es una planta.
9. Planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque la planta es una planta oleaginosa o una planta útil y se selecciona preferiblemente del grupo de cacahuete, colza, canola, girasol, cártamo (*Carthamus tinctoria*), amapola, mostaza, ricino, olivo, ajonjolí, caléndula, punica, onagra, verbasco, cardo, avellana, almendra, macadamia, aguacate, laurel, calabaza, lino, soja, pistacho, borraja, palma de aceite, coco, nuez de nogal, maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, yuca o pimienta.
10. Parte transgénica de una planta transgénica de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, preferiblemente semillas transgénicas de una planta transgénica de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9.
11. Procedimiento para aislar y preparar aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres, comprendiendo el procedimiento prensar o extraer las partes de la planta o las semillas de la planta de la reivindicación 10.
12. Procedimiento para la preparación de alimentos para animales, productos alimenticios, cosméticos o
 - 40 farmacéuticos, que contiene los pasos del procedimiento según la reivindicación 11 y la mezcla de estos aceites, lípidos y/o ácidos grasos libres con aceites, lípidos o ácidos grasos de origen animal, microbiano o vegetal.
13. Uso del ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 9 o de la parte transgénica de una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10 para la preparación de aceites, grasas, lípidos o ácidos grasos libres.
14. Uso del ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, de la planta transgénica de acuerdo con la
 - 45 reivindicación 9 o de la parte transgénica de una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10 para la preparación de ácidos grasos poliinsaturados químicamente puros o de una composición de ácidos grasos para aplicaciones en el sector de la industria alimenticia, la industria de los cosméticos o la industria farmacéutica.

