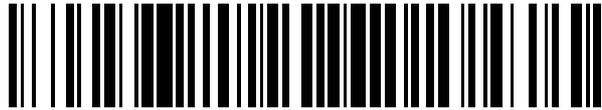


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 239**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2011 PCT/US2011/041759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11163557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011 E 11798970 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2585599**

54 Título: **Acumulación de ácidos grasos Omega-7 en semillas de plantas**

30 Prioridad:

24.06.2010 US 358318 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2017

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (50.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, Indiana 46268, US y
BROOKHAVEN SCIENCE ASSOCIATES, LLC
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**SHANKLIN, JOHN;
NGUYEN, TAM HUU;
WALSH, TERENCE A.;
PIDKOWICH, MARK, S. y
WHITTLE, EDWARD, J.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 645 239 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

Acumulación de ácidos grasos Omega-7 en semillas de plantas

5 Esta invención se realizó bajo un Acuerdo de Cooperación en Investigación y Desarrollo (CRADA) (BNL-C-05-11) entre DOW Agrosciences LLC y Brookhaven Associates, LLC dirigido por el Departamento de Energía de los Estados Unidos. El Gobierno tiene determinados derechos en esta invención.

Reivindicación de prioridad

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Número de serie 61/358.318, presentada el 24 de Junio, 2010, para la "Acumulación de Ácidos grasos n-7 en semillas de plantas".

10 Campo de la técnica

En determinadas realizaciones, la invención se refiere al material vegetal transgénico que comprende una nueva Δ^9 -18:0-ACP desaturasa de *Ricinus* mutante, designada como Com25, que funciona como una Δ^9 -16:0-ACP desaturasa. Otra realización se refiere a métodos de modificación genética metabólica para manipular puntos de ramificación metabólicos en las plantas, por ejemplo, para redirigir el carbono en ácidos grasos ω -7 como se definen en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, la invención se refiere a métodos para expresar Com25 como parte de una estrategia de modificación genética metabólica, tal como que el carbono se redirija en los ácidos grasos ω -7 en las semillas de plantas.

Antecedentes

20 Se ha estimado que pueden existir al menos 1.000 estructuras de ácidos grasos en la naturaleza. Millar *et al.*, (2000) Trends Plant Sci 5(3):95-101. Muchos de estos ácidos grasos se sintetizan mediante derivatización de los ácidos grasos mediante un conjunto de variantes de desaturasas arquetípicas. La primera de estas desaturasas variantes que se aisló fue la hidroxilasa oleato de *Ricinus* a partir del endospermo de ricino, la enzima responsable de la síntesis del ácido ricinoleico. Van de Loo *et al.*, (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92(15):6743-6747. A continuación le siguieron los genes que codifican la epoxidasa linoleato de *Vernonia* y la acetilnasa oleato de *Crepis*. Lee *et al.*, (1998) Science 280(5365):915-18. El aislamiento de estos genes condujo a la idea de que su expresión heteróloga en el cultivo de plantas oleaginosas podrían facilitar la acumulación de los ácidos grasos inusuales correspondientes. Broun *et al.*, (1997) Plant Journal 13:201-10. Sin embargo, la acumulación del ácido graso inusual resultante es siempre inferior al que se encuentra en la fuente vegetal natural a partir de la que se aísla el gen. Napier, J.A. (2007) Annu. Rev. Plant Biol. 58:295-319.

30 Los perfiles de actividad específica de las enzimas desaturasas variantes que sean aislado a partir de tejidos que acumulan ácidos grasos inusuales, concuerdan con un papel de producción de los ácidos grasos inusuales correspondientes. Sin embargo, muestran unas actividades específicas muy pobres en comparación con todas las esteroil-ACP desaturasas presentadas hasta la fecha, y se ha investigado que son ineficaces en la producción de fenotipos de ácidos grasos alterados cuando se expresan de forma heteróloga. Cahoon *et al.*, (1994) Prog. Lipid. Res. 33:155-63. Por ejemplo, la expresión específica de semillas de la hidroxilasa de ricino bajo el control de un potente promotor específico en el modelo vegetal de *Arabidopsis* da como resultado la acumulación de sólo aproximadamente 17% de ácido ricinoleico, muy por debajo del aproximadamente 90% encontrado en semillas de ricino. Broun y Somerville (1997) Plant Physiol. 113:933-42. De forma similar, se han presentado resultados decepcionantes para los ácidos grasos epoxi y acetilénico que se han presentado por acumular hasta un 15 y 25% respectivamente en la expresión heteróloga de la epoxigenasa y acetilnasa en *Arabidopsis*. Lee *et al.*, (1998) Science 280(5365):915-18. Además de mostrar pobres actividades, las variantes de desaturasa tienden a formar agregados cuando se purifican. Una baja estabilidad y velocidades catalíticas pobres son propiedades que comparten muchas de las nuevas enzimas desarrolladas que surgen en acontecimientos de duplicación genética en la selección de la estabilidad y/o renovación, mientras que la acumulación de mutaciones finalmente da como resultado una alteración de las funciones. Govindarajan y Goldstein (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95:5545-49; Goldstein (2001) en Protein Folding, Evolution and Design (Broglia, R.A., Shakhnovich, E.I., y Tiana, G., eds) CXLIV Vols., I.O.S Press, Ámsterdam.

50 Se han propuestos muchas explicaciones potenciales para los bajos niveles de la acumulación de ácidos grasos diana. Napier, J.A. (2007) Annu. Rev. Plant Biol. 58:295-319. Las evidencias sugieren que las enzimas especializadas pueden jugar un papel clave en la incorporación de ácidos grasos inusuales en los triacilglicerolos. Por ejemplo, la acumulación de laurato en semillas de *Brassica napus* transgénica aumentó del 50% hasta 60% de la coexpresión de la aciltransferasa del ácido lisofosfatídico de coco junto con la tioesterasa de cadena media del laurel de California. Knutzon *et al.*, (1999) Plant Physiol. 120(3):739-46. Recientemente, la coexpresión de la coenzima A de acilo tipo 2 de ricino: diacilglicerol aciltransferasa (RcDGAT2) además de la hidroxilasa de ricino incrementaron la acumulación de ácido ricinoleico aproximadamente 17% a aproximadamente 30%. Bursal *et al.*, (2008) Plant Biotechnol. J. 6(8):819-31.

No se han presentado aún niveles altos de acumulación de ácidos grasos inusuales en plantas transgénicas que

equivalgan a los encontrados en las especies que aparecen de forma natural. Como los ácidos grasos inusuales son altamente deseables en una variedad de industrias y de aplicaciones, existe una necesidad de mejorar la expresión de ácidos grasos inusuales en plantas transgénicas diseñadas para su producción.

Divulgación de la invención

- 5 En la presente memoria se describen secuencias de nucleótidos que codifican nuevos variantes de desaturasa designada como Com25, y las secuencias de aminoácidos de la misma.

También se describen métodos para expresar la Com25 en una célula vegetal, para aprovecharse de las ventajas de la actividad de la desaturasa mejorada de la enzima Com25, relativa a la Δ^9 -18:0 desaturasa de ricino WT, tal que se incrementa el porcentaje de composición de ácidos grasos inusuales en las semillas de plantas. En algunas realizaciones, los métodos incluyen expresar la Com25 en *Arabidopsis*. En determinadas realizaciones, los ácidos grasos inusuales que se incrementan en las semillas de plantas son los ácidos grasos ω -7. En estas realizaciones, los ácidos grasos ω -7 pueden ser 16:1- Δ^9 y/o 18:0- Δ^{11} .

10 También se proporcionan métodos para expresar Com25 en una célula vegetal, en donde la célula vegetal está alterada en la elongación de ácidos grasos plastidiales y extraplastidiales, tal que se incrementa el porcentaje de la composición de ácidos grasos en las semillas de la planta. En algunas realizaciones, los métodos incluyen que Com25 se exprese en *Arabidopsis*. En determinadas realizaciones, los ácidos grasos que incrementan en semillas de plantas son ácidos grasos ω -7. En estas realizaciones, los ácidos grasos ω -7 pueden ser 16:1- Δ^9 y/o 18:0- Δ^{11} .

15 Se proporcionan otros métodos para expresar Com25 en una célula vegetal en donde se inhibe la KASII en la célula vegetal, tal que se incrementa el porcentaje de la composición de ácidos grasos inusuales en las semillas de la planta. En algunas realizaciones, los métodos incluyen que Com25 se exprese en *Arabidopsis*. En determinadas realizaciones, los ácidos grasos que incrementan en semillas de plantas son ácidos grasos ω -7. En estas realizaciones, los ácidos grasos ω -7 pueden ser 16:1- Δ^9 y/o 18:0- Δ^{11} .

20 También se proporcionan métodos para expresar Com25 en una célula vegetal en donde se inhiben KASII y la elongación de ácidos grasos plastidiales y extraplastidiales en la célula vegetal, tal que se incrementa el porcentaje de la composición de ácidos grasos inusuales en las semillas de la planta. En algunas realizaciones, los métodos incluyen que Com25 se exprese en *Arabidopsis*. En determinadas realizaciones, los ácidos grasos que incrementan en semillas de plantas son ácidos grasos ω -7. En estas realizaciones, los ácidos grasos ω -7 pueden ser 16:1- Δ^9 y/o 18:0- Δ^{11} .

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

- 30 Las características anteriores y otras, serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que siguen con referencia a las figuras acompañantes.

Breve descripción de los dibujos

La FIG.1 representa un esquema de la síntesis de ácidos grasos y de la modificación en el plástido y en el retículo endoplasmático de *Arabidopsis*. Las reacciones mediadas por las 16:0 desaturasas se indican como 1: Δ^9 -16:0-ACP desaturasa; 2: Δ^9 -16:0-ACP desaturasa extraplastidial. Los FA ω -7, es decir, 16:1 Δ^9 y 18:1 Δ^{11} están en un recuadro.

La FIG. 2 muestra una cromatografía de gases representativa en la separación de FAMES en la expresión de Com25 en varios antecedentes de *Arabidopsis*. Los paneles A y B, WT; C y D, *fab1*; E y F, *fab1/fae1*. Paneles A, C y E, sin transformar; B, D y F, transformados con Phas:Com25. Se indican los picos de FAME: 16:0 (1), 16:1 Δ^9 (2), 16:2 (3), 18:0 (4), 18:1 Δ^9 (5), 18:1 Δ^{11} (6), 18:2 (7), 20:0 (8), 20:1 Δ^{11} (6), 18:2 (7), 20:0 (8), 20:1 Δ^{11} (9), 18:3+20:1 Δ^{13} (10), y 22:1 (11).

La FIG. 3 muestra la relación entre las semillas que albergan 16:0 frente a la acumulación de ω -7 (como porcentaje en moles).

La FIG. 4 muestra una separación de FAMES en una cromatografía de gases representativa en la expresión de Com25 en varios antecedentes de *Arabidopsis*. El Panel A: mejor *fab1/fae1*, Phas:Com25, *Fab1*-HPAS, An Δ 9DS, Ln Δ 9DS línea transformada; Panel B: semilla *Doxantha*. Las denominaciones de los picos se describen en la FIG. 2.

La FIG. 5 es una configuración esquemática de los elementos de ADN en una construcción particular de realizaciones de la invención.

Modo o modos de llevar a cabo la invención

I. Resumen de varias realizaciones

- 50 En la presente memoria se describen moléculas de ácido nucleico que codifican una enzima Δ^9 desaturasa al menos 60% idéntica a SEQ ID NO:1. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además un elemento regulador genético. En algunas realizaciones, el elemento regulador puede ser un promotor de faseolina.

También se describen enzimas Δ^9 desaturasas que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a SEQ ID NO:2. Las enzimas Δ^9 desaturasas de la presente invención en donde la secuencia de aminoácidos es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO:2 pueden comprender además una serina en la posición análoga a la posición 114 en SEQ ID NO:2; una arginina en la posición análoga a la posición 117 en la SEQ ID NO:2; una cisteína en la posición análoga a la posición 118 en SEQ ID NO:2; una leucina en la posición análoga a la posición 179 en SEQ ID NO:2; y/o una treonina en la posición análoga a la posición 188 en SEQ ID NO:2.

Las moléculas de ácido nucleico y las enzimas Δ^9 desaturasas de la presente invención se pueden expresar en materiales vegetales, células, tejidos, o plantas enteras, para incrementar la cantidad inusual de ácidos grasos en el material vegetales, células, tejidos, o plantas enteras, relativa a la cantidad observada en la planta de tipo salvaje de las mismas especies. Realizaciones alternativas de la invención incluyen métodos para incrementar la cantidad de ácidos grasos inusuales en el material vegetal, células, tejidos, o plantas enteras, que comprende transformar el material vegetal, células, tejidos, o plantas enteras con la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, tal que se incremente la cantidad de ácidos grasos inusuales en el material vegetal, células, tejidos, o plantas enteras.

En realizaciones preferidas, el material vegetal, células, tejidos, o plantas enteras que se transforman mediante los métodos descritos, comprenden además una o más maneras para incrementar los niveles de 16:0-ACP en el material vegetal, células, tejidos, o plantas enteras. En determinadas realizaciones, las maneras para incrementar los niveles de 16:0-ACP en el material vegetal, células, tejidos, o plantas enteras puede ser: expresión de una desaturasa extraplasmática; supresión de KASII, por ejemplo, mediante introducción de una mutación en el gen *fab1*; y/o descender la elongación de ácidos grasos 16:0, por ejemplo, mediante la introducción de una mutación en el gen *fae1*.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar, por ejemplo, en plantas o en materiales vegetales derivados de plantas, del género *Arabidopsis*. Se diseña una realización particular para métodos para incrementar o regenerar una planta modificada genéticamente que comprende cantidades aumentadas de ácidos grasos inusuales en la planta, en comparación con un tipo de planta salvaje de las mismas especies, que comprende transformar el material vegetal que comprende una Δ^9 desaturasa con una molécula de ácido nucleico que comprende un elemento regulador genético, y un polinucleótido al menos 60% idéntico a SEQ ID NO:1, codificando el polinucleótido una enzima Δ^9 desaturasa; y cultivar el material vegetal transformado para obtener una planta. La invención se refiere además a un material vegetal transgénico que comprende una Δ^9 desaturasa, y un polinucleótido al menos 60% idéntico a SEQ ID NO:1, estando el polinucleótido operablemente unido a un elemento regulador genético y que codifica una enzima Δ^9 desaturasa.

II. Abreviaturas

$x:y\Delta^z$	ácido graso que contiene x carbonos e y dobles enlaces en posición z al contar desde el extremo carboxilo
ACP	proteína transportadora de acilo
COA	coenzima A
KASII	β -cetoacil-ACP sintasa II
FA	Ácidos grasos
FAS	síntesis de ácido graso
FAME	éster metílico de ácido graso
WT	tipo salvaje

II. Términos

Ácido graso: Como se emplea en la presente memoria, el término "ácido graso" se refiere a ácidos alifáticos de cadena larga (ácidos alcanóicos) de diferentes longitudes de cadena, desde aproximadamente C12 a C22, aunque se conocen tanto ácidos de longitudes más cortas como más largas. La estructura de un ácido graso se representa mediante la anotación, $x:y\Delta^z$, donde "x" es el número total de átomos de carbonos (C) en el ácido graso en particular, y "y" es el número de dobles enlaces en la cadena de carbonos en la posición "z", contado a partir del extremo carboxilo del ácido.

Ácido graso inusual: Para los fines de la presente invención, los ácidos grasos inusuales son aquellos cuya síntesis en los sistemas naturales se inician mediante modificación de un intermedio de FAS mediante una enzima desaturasa variante.

5 Ruta metabólica: El término, “ruta metabólica”, se refiere a una serie de reacciones químicas que ocurren dentro de la célula, catalizada mediante enzimas, para alcanzar bien la formación de un producto metabólico, o bien el inicio de otra ruta metabólica. Una ruta metabólica puede implicar varias o muchas etapas, y puede competir con una ruta metabólica diferente para sustratos de reacción específicos. De forma similar, el producto de una ruta metabólica puede ser un sustrato para otra ruta metabólica.

Modificación genética metabólica: Para los fines de la presente invención, “modificación genética metabólica” se refiere al diseño racional de estrategias para alterar una o más rutas metabólicas en una célula, tal que la modificación etapa a etapa de una sustancia inicial en un producto que tiene la estructura química exacta deseada se alcanza dentro del esquema general de las rutas metabólicas totales operativas en la célula.

10 Desaturasa: Como se emplea en la presente memoria, el término “desaturasa” se refiere a un polipéptido que puede desaturar (es decir, introducir un doble enlace) en uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso o precursor de interés. Las enzimas desaturasas de ácidos grasos solubles vegetales introducen regioespecíficamente un doble enlace en un sustrato saturado acil-ACP. La reacción implica la activación de un oxígeno molecular mediante un centro de dos electrones de hierro reducidos, coordinado por un haz de cuatro hélices que forma el núcleo de la arquitectura de la desaturasa. En la presente memoria son de un interés particular las Δ^9 desaturasas.

La Δ^9 -18:0¹-ACP desaturasa se requiere por todas las plantas para el mantenimiento de la fluidez de la membrana. Aunque esta enzima desatura principalmente esteroil-ACP, también se activa en menor medida con palmitoil-ACP.

20 Desaturasa variante: Como se emplea en la presente memoria, el término “desaturasa variante” abarca a aquellas desaturasas que muestran perfiles de actividad específicos consistentes con un papel en la producción de ácidos grasos inusuales. Una desaturasa variante se puede aislar a partir de un organismo, o a través de modificación genética a través de un programa de evolución dirigido.

25 Descendencia vegetal: Para los fines de la presente invención, “descendencia vegetal”, se refiere a cualquier planta, o material vegetal obtenido de las mismas, que se puede obtener mediante métodos de cultivo. Los métodos de cultivo son bien conocidos en la técnica, e incluyen el cultivo natural, cultivo artificial, cultivo selectivo que implica análisis de marcadores de ADN molecular, transgénicos, y cultivo comercial.

Material vegetal: Como se emplea en la presente memoria, el término “material vegetal” se refiere a cualquier célula o tejido obtenido a partir de una planta.

30 Molécula de ácido nucleico: Una forma polimérica de nucleótidos, que pueden incluir tanto las hebras anti-sentido de ARN, ADNc, ADN genómico, y las formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una “molécula de ácido nucleico” como se emplea en la presente memoria es sinónimo de “ácido nucleico” y “polinucleótido”. El término incluye formas de ADN mono y bicatenarias. Una molécula de ácido nucleico puede incluir uno o ambos nucleótidos de origen natural y modificados unidos entre sí mediante enlaces de nucleótidos que aparecen de forma natural y/o que aparecen de manera no natural.

35 Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar química o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos derivados o no naturales, como será fácilmente apreciable por los expertos en la técnica. Tal modificación incluye, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno más nucleótidos que aparecen de forma natural con un análogo, modificaciones internucleótido, tal como enlaces sin cargar (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc., enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), fracciones colgantes (por ejemplo, péptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.). El término “molécula de ácido nucleico” incluye también cualquier conformación topológica que incluye conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente doble, triple, en horquilla, circular y en candado.

45 Unido de forma operable: Una primera secuencia de ácido nucleico está unida de forma operable con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor se une de forma operable a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Cuando se produce de forma recombinante, las secuencias de ácido nucleico unidas de forma operable son generalmente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones que codifican proteínas, en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan estar contiguos para estar unidos de forma operable.

55 Elemento regulador: Como se emplea en la presente memoria, “elemento regulador” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene actividad reguladora genética; es decir, que tiene la capacidad para efectuar la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico transcribible unido de forma operable. Elementos reguladores tales como promotores, líderes, intrones, y regiones de terminación de la transcripción, son moléculas de ácido nucleico no codificantes que tienen actividad reguladora genética que juega una parte esencial en la expresión global de los genes en células vivas. Los elementos reguladores aislados que funcionan en las plantas son, por lo tanto, útiles para modificar fenotipos de plantas a través de las técnicas de modificación genética. Por “elemento regulador”, se entiende una serie de nucleótidos que determinan si un gen particular se expresa, cuándo, y a qué nivel. Las

secuencias de ADN reguladoras interaccionan específicamente con proteínas reguladoras u otras proteínas.

Como se emplea en la presente memoria, el término “actividad reguladora genética” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de afectar la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico unida de forma operable. Una molécula aislada de ácido nucleico que tiene actividad reguladora puede proporcionar una expresión temporal o espacial o modular niveles y tasas de expresión de la molécula de ácido nucleico unida de forma operable. Una molécula aislada de ácido nucleico que tiene actividad reguladora genética puede comprender un promotor, líder, o región de terminación transcripcional 3’.

Promotores: Como se emplea en la presente memoria, el término “promotor” se refiere a una molécula de ácido nucleico que está implicada en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa II u otras proteínas, tales como factores de transcripción (factores proteicos que regulan la transcripción) para iniciar la transcripción de un gen unido de forma operable. Los promotores pueden contener ellos mismos sub-elementos, tales como cis-elementos o dominios potenciadores que afectan la transcripción de genes unidos de forma operable. Un “promotor vegetal” es un promotor nativo o no-nativo que es funcional en células vegetales. Un promotor vegetal se puede emplear como elemento regulador 5’ para modular la expresión de un gene o genes unidos de forma operable. Los promotores vegetales se pueden definir por su patrón de expresión temporal, espacial, o de desarrollo. Las moléculas de ácido nucleico que se describen en la presente memoria pueden comprender secuencias de ácido nucleico que comprenden promotores.

Identidad de secuencia: La similitud entre dos secuencias de ácido nucleico o entre dos secuencias de aminoácidos se expresa en términos del nivel de identidad de secuencia compartida entre las secuencias. La identidad de secuencia se expresa normalmente en términos de porcentaje de identidad; el porcentaje mayor, el más similar de dos secuencias. Los métodos de alineamiento de secuencias para compararlas se describen en detalle a continuación.

Posición análoga en una secuencia de aminoácido: Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido se pueden alinear mediante métodos descritos en los siguientes párrafos. Cuando se alinean, una posición en una secuencia es una “posición análoga” con una posición en la secuencia alineada si las posiciones son idénticas dentro de la secuencia de consenso.

Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen varios programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-44, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881-10890; Huang, *et al.*, *Computer Applications in the Biosciences* 8:155-65, 1992; Pearson *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 24:307-31, 1994; Tatiana *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 174:247-50, 1990. Altschul *et al.*, *Mol. Biol.* 215:403-10, 1990 (consideración detallada de los métodos de alineamiento y cálculos de homología).

La herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas (BLADT, de sus siglas en inglés) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCB) está disponible en Internet (en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para emplear en conexión con los programas de análisis de secuenciación, por ejemplo, blastp y blastn. Está disponible una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia empleando este programa en Internet a través de la NCBI en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs.

Para comparaciones de secuencias de aminoácidos, se emplea la función del programa (b12seq) BLAST “secuencias Blast 2” utilizando los parámetros por defecto. Los parámetros específicos se pueden ajustar dentro del criterio de un experto en la técnica, para por ejemplo, proporcionar un recargo por desajuste o incentivo por coincidencia.

Transformado: Como se emplea en la presente memoria, el término “transformado” se refiere a una célula, tejido, órgano, u organismo en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico extraño, tal como una construcción. La molécula de ácido nucleico introducida se puede integrar en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano, u organismo receptor, tal que la molécula polinucleótida introducida se hereda por la posterior descendencia. Una célula u organismo “transgénico” o “transformado” incluye también a la descendencia de la célula u organismo y la descendencia producida a partir del programa de cultivo empleando tal planta transgénica, por ejemplo, como progenitora y exhibiendo un fenotipo alterado resultante de la presencia de una molécula de ácido nucleico extraña.

IV. Teorías de la modificación genética metabólica sistémica para la acumulación de ácidos grasos inusuales en una célula, tejido, u organismo huésped

A. Resumen

Una realización de la invención incluye un planteamiento para la modificación genética metabólica en la acumulación de ácidos grasos (FA) ω -7, compuesto por ácido palmitoleico (16:1- Δ^9) y vaccénico (18:1- Δ^{11}), por ejemplo, en semillas de plantas. Para ejemplificar los métodos de detención del flujo de nuevos ácidos grasos sintetizados en los plástidos, Com25, una 16:0-ACP desaturasa resultante de un programa de evolución dirigida para mejorar la actividad de la 16:0 desaturasa de la Δ^9 -18:0 desaturasa, se expresó bajo el control del promotor de fasolina específico de la semilla. Cualquier promotor específico de la semilla se puede emplear en las realizaciones descritas

en la presente memoria. Este planteamiento incrementó la acumulación de FA ω -7 de menos del 2% en el tipo salvaje (WT) a aproximadamente 14% en los transformantes de Com25.

En otros planteamientos ilustrativos, la expresión de Com25 en el mutante doble *fab1/fae1*, el cual está alterado en la elongación de ácidos grasos plastidiales y extraplastidiales, respectivamente, dan como resultado un incremento de la acumulación de FA ω -7 a aproximadamente 50%. Por otra parte, introducir un Com25 adicional bajo el control del promotor LTP170 incrementó la acumulación de FA ω -7 a aproximadamente 58%, sugiriendo que se había superado la limitación de la actividad de la desaturasa por su baja velocidad de renovación. La construcción de fasolina:Com25 se expresó en una serie de antecedentes KASII-deficiente y se observó que el contenido de FA ω -7 incrementa proporcionalmente con el contenido de 16:0 hasta aproximadamente 30% de FA ω -7, con una acumulación total de FA ω -7 de hasta aproximadamente 55%. Resulta interesante, que el 56% de la acumulación de ω -7 FA de los transgénicos contenían aún aproximadamente 19% de 16:0, más del doble que las plantas WT. Se investigó la expresión de desaturasas 16:0 extraplastidiales para interceptar el flujo de 16:0 en la ruta de triacilglicerol. La co-expresión de desaturasas plastidiales y extraplastidiales junto con la supresión de KASII en el mutante doble *fab1/fae1*, dio como resultado un incremento de la acumulación de FA ω -7 de aproximadamente 2% en WT a aproximadamente 71% en la mejor línea de modificación genética, equivalente a la que se encuentra en las semillas de *Doxantha*.

Los FAs ω -7 se seleccionaron como el objetivo porque su síntesis en sistemas naturales, al igual que otros FA inusuales, se inicia mediante modificación de un intermediario de FAs mediante una enzima desaturasa variante. Cahoon *et al.*, (1997) Plant Mol. Biol. 33:1105-10; y Cahoon *et al.*, (1998) Plant Physiol. 11(2):593-8. Además, los FAs ω -7 tienen aplicaciones comerciales potenciales como materias primas poliméricas mientras que tienen propiedades físicas similares a los ácidos grasos que aparecen de forma natural.

Los estudios de modificación genética metabólica se iniciaron mediante la introducción de una Δ^9 -16:0-proteína transportadora de acilo (ACP) desaturasa, no reportada con anterioridad, Com25, en el modelo vegetal *Arabidopsis* bajo el control de un promotor específico de semilla. Se investigaron los planteamientos para eludir el flujo de carbono dentro del FA ω -7 mediante elección de los mutantes antecedentes que contienen niveles elevados de 16:0, y la co-expresión de construcciones diseñadas para eludir el flujo de carbono en el ácido graso diana. Las enzimas desaturasas extraplastidiales se expresaron para desaturar el 16:0 residual después de la exportación desde el plástido.

La co-expresión de desaturasas plastidiales y extraplastidiales junto con la supresión de KASII en *fab1/fe1* antecedentes dieron como resultado un incremento de la acumulación de FA ω -7 hasta aproximadamente 71% desde menos del 2% en WT, superior al que se encuentra en semillas de *Asclepias* y equivalente a la que se encuentra en *Doxantha*.

16:0-ACP, el precursor de ácidos grasos ω -7, es el primer punto de ramificación en la biosíntesis de ácidos grasos, compitiendo con la tioesterasa FatB y la elongasa KASII; y la introducción de una 16:0-ACP desaturasa hace de esta vía una competición a tres. La supresión de KASII y FATB son formas eficaces para reducir la competición por el sustrato e incrementar la acumulación de FA ω -7. El incremento en la acumulación de FA ω -7 es saturable en aproximadamente 30% en la línea huésped, porque por encima de este nivel la desaturasa está limitada. Incrementar la dosis de Com25 mediante la expresión de una segunda copia bajo el control de un promotor específico de semilla aumentó además la acumulación de ácidos grasos ω -7. Sin embargo, las semillas de mayores acumulaciones de FA ω -7 contienen también niveles de 16:0 en el intervalo de aproximadamente 20%, presentando una oportunidad para la desaturasa 16:0 extraplastidial. La expresión de dos desaturasas extraplastidiales aumenta la acumulación de FA ω -7, dando como resultado un descenso de aproximadamente 50% de 16:0 en las semillas maduras.

Como se describe con más detalle a continuación, la modificación genética metabólica sistemática puede ser una estrategia exitosa para diseñar niveles de acumulación de ácidos grasos inusuales comparables a los que se observan en las fuentes naturales porque las mejores líneas *fab1/fae1/Com25/Ln Δ 9D* y *An Δ 9D* acumulan 71% de FA ω -7, niveles mayores sustancialmente a los que encuentran en *Asclepias* y equivalentes a los niveles que se encuentran en las semillas de *Doxantha*.

B. Ácidos Nucleicos

Las secuencias de ácidos nucleicos en algunas realizaciones de la presente invención muestran un aumento de porcentaje de identidades cuando se alinean con SEQ ID NO:1. Secuencias específicas de ácidos nucleicos dentro de estas y otras realizaciones pueden comprender secuencias que tienen, por ejemplo, al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 100% de identidad con SEQ ID NO:1. Se entiende por los expertos en la técnica que las moléculas de ácidos nucleicos se pueden modificar sin cambiar sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un polipéptico codificado, por ejemplo, según las sustituciones de nucleótidos admisibles según la degeneración del codón.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención comprenden promotores. Los promotores se pueden seleccionar sobre la base del tipo de célula en la que se va a insertar la construcción del

vector. Los promotores que funcionan en bacterias, levaduras y plantas son bien conocidos en la técnica. Los promotores también se pueden seleccionar sobre la base de sus características de regulación. Ejemplos de tales características incluyen la mejora de la actividad transcripcional, la inducibilidad, especificidad de tejido, y la especificidad de la etapa de desarrollo. En las plantas, se han descrito promotores que son inducibles, de origen viral o sintético, activos constitutivamente, regulados temporalmente, y regulados espacialmente. (Por ejemplo, véase Poszkowski, *et al.*, (1989) EMBO J. 3:2719; Odell *et al.*, (1985) Nature 313:810; Chau *et al.*, (1989) Science 244:174-81).

A menudo los promotores constitutivos que se emplean incluyen, por ejemplo, el promotor CAMV 35S, el promotor mejorado CaMV 35S, el promotor del Virus del Mosaico de la Escrofularia, el promotor de la manopina sintasa, el promotor de la nopalina sintasa, y el promotor de la octopina sintasa.

Promotores útiles inducibles incluyen, por ejemplo, promotores inducidos por ácido salicílico o ácidos poliacrílicos inducidos por aplicación de protectores (herbicidas de bencenosulfamida sustituidos), promotores de choque térmico, un promotor inducible de nitrato derivado de la nitrato reductasa de espinaca transcribible en la secuencia de la molécula de ácido nucleico, promotores inducibles por hormonas, y promotores inducibles por la luz asociados con la subunidad pequeña de carboxilasa RuBP y de las familias LHCP.

Ejemplos de tejidos específicos útiles, promotores reguladores del desarrollo incluyen el promotor β -conglucina 7Sa y promotores específicos de semillas. Promotores funcionales de plantas útiles para la expresión preferencial en plástidos de semillas incluyen aquellos a partir de proteínas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas, y a partir de proteínas de almacenamiento de plantas. Ejemplos de tales promotores incluyen las regiones reguladoras 5' a partir de tales secuencias de la molécula de ácido nucleico como fasolina, napina, zeina, soja, inhibidor de tripsina, ACP, esteroil-ACP desaturasa, y oleosina. Otro ejemplo de promotor específico de tejido es el promotor de lectina, que es específico del tejido de semilla.

Otros promotores útiles incluyen los de la nopalina sintasa, manopina sintasa, y promotores de octopina sintasa, que se transportan en plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*; promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); el promotor CaMV 35S mejorado; el promotor 35S del Virus del Mosaico de la escrofularia; el promotor inducible por la luz de la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO); el promotor FEI-4A del tabaco (Mandel *et al.*, (1995) Plant Mol Biol 29:995-1004); sacarosa sintetasa de maíz; alcohol deshidrogenasa I de maíz; el complejo captador de luz del maíz; proteína de choque térmico de maíz; el promotor de quitinasa de *Arabidopsis*; promotores de LTP (Proteína de Transferencia de Lípidos); chalcona isomerasa de petunia; proteína 1 rica en glicina de soja; patatina de patata; el promotor de ubiquitina; y el promotor de actina. Los promotores útiles son preferiblemente selectivos de semilla, selectivo del tejido, o inducibles. La regulación específica de semillas se discute en, por ejemplo, EP 0 255 378.

C. Secuencias de Aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos según algunas realizaciones de la presente invención muestran el aumento de porcentaje de identidades cuando se alinean con la SEQ ID NO:2. Secuencias de aminoácidos específicas dentro de estas y otras realizaciones pueden comprender secuencias que tienen, por ejemplo, al menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, ó 100% de identidad con SEQ ID NO:2. En muchas realizaciones, la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia anteriormente mencionada cuando se alinean con la SEQ ID NO:2, codifica un péptido con actividad enzimática Δ^9 -18:0-ACP desaturasa.

D. Alteración de Com25: 5 mutaciones

Aspectos de la presente invención se refieren a nuevas desaturasas modificadas genéticamente derivadas de una desaturasa de ricino parental. En realizaciones específicas, la desaturasa modificada genéticamente es la Com25. Com25 difiere de la desaturasa de ricino parental en las siguientes 5 posiciones de aminoácidos: M114S, T117R, L118C, P179L, y G188T (numerados según la desaturasa madura de ricino PDB entrada 1AFR). En otras realizaciones, la desaturasa modificada genéticamente puede comprender uno o más de estas 5 mutaciones en Com25. Por ejemplo, una desaturasa modificada genéticamente puede diferir de la desaturasa de ricino parental en las siguientes posiciones: M114S; T117R; L118C; P179L; G188T; M114S y T117R; M114S y L118C; M114S y P179L; M114S y G188T; T117R y L118C; T117R y P179L; T117R y G188T; L118C y P179L; L118C y G188T; P179L y G188T; M114S, T117R, y L118C; M114S, T117R, y P179L; M114S, T117R, y G188T; M114S, L118C, y P179L; M114S, L118C, y G188T; M114S, P179L, y G188T; T117R, L118C, y P179L; T117R, L118C, y G188T; T117R, P179L, y G188T; o L118C, P179L, y G188T.

E. Huéspedes que contienen niveles aumentados de ácidos grasos 16:0.

En realizaciones preferidas, las células huésped o materiales transformados con *Com25* pueden mostrar niveles aumentados de ácidos grasos 16:0. Las células huésped pueden mostrar niveles aumentados de ácidos grasos 16:0, por ejemplo, por tener el metabolismo de 16:0-ACP reducido en aquellas células huésped. Se pueden utilizar otros métodos para aumentar los niveles de ácidos grasos 16:0 en una célula huésped, y tales métodos se pueden elegir según el criterio en la práctica de un experto en la técnica. Ejemplos de métodos para aumentar los niveles de

ácidos grasos 16:0 en una célula huésped incluyen, pero no se limitan a: 1) expresión de una desaturasa extraplasmidial en la célula huésped; 2) supresión de KASII en la célula huésped, por ejemplo mediante la introducción de una mutación en el gen *fab1*; y 3) disminución de la elongación de ácidos grasos 16:0, por ejemplo, mediante la introducción de una mutación en el gen *fae1*.

5 F. Métodos para la transformación genética del material vegetal

La presente invención también se dirige a métodos para producir células transformadas que comprenden uno o más moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácido nucleico al menos 60% idéntica a SEQ ID NO:1. Tales moléculas de ácido nucleico pueden comprender también, por ejemplo, elementos reguladores no codificantes, tales como promotores. En la célula se pueden introducir también otras secuencias junto con los elementos reguladores no codificantes y secuencias de molécula de ácido nucleico transcribible. Estas otras secuencias pueden incluir terminadores 3' de la transcripción, señales de poli-adenilación 3', otras secuencias no traducidas, secuencias de tránsito o de marcaje, marcadores seleccionables, potenciadores, y operadores.

El método de transformación comprende generalmente las etapas de seleccionar una célula huésped adecuada, transformar la célula huésped con un vector recombinante, y obtener la célula huésped transformada.

15 La tecnología para introducir ADN en las células es bien conocida por los expertos en la técnica. Estos métodos se pueden clasificar generalmente en cinco categorías: (1) métodos químicos (Graham y Van der Eb (1973) *Virology* 54(2):536-9; Zatloukal *et al.*, (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:136-53); (2) métodos físicos, tales como microinyección (Capechi (1980) *Cell* 22(2):479-88), electroporación (Wong y Neumann, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (1982) 107(2):584-7; Fromm *et al.*, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82(17):5824-8; Patente U.S. Nº 5.384.253), y aceleración de partículas (Johnston y Tang (1994) *Methods Cell Biol.* 43(A):353-65; Fynan *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90(24):11478-82); (3) vectores virales (Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20(1):155-68; Lu *et al.*, (1993) *J. Exp. Med.* 178(6):2089-96; Eglitis y Anderson (1988) *Biotechniques* 6(7):608-14); (4) mecanismos mediados por receptor (Curiel *et al.*, (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3(2):147-54; Wagner *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89(13):6099-103); y (5) mecanismos mediados por bacterias, tales como *Agrobacterium*. Alternativamente, los ácidos nucleicos se pueden introducir directamente en el polen inyectando directamente los órganos reproductores de una planta (Zhou *et al.*, (1983) *Methods in Enzymology* 101:433; Hess (1987) *Intern. Rev. Cytol.* 107:367; Luo *et al.*, (1988) *Plant Mol. Biol. Reporter* 6:165; Pena *et al.*, (1987) *Nature* 325: 274). Otros métodos de transformación incluyen, por ejemplo, transformación de protoplastos como se ilustra en la Patente U.S. Nº 5.508.184. Las moléculas de ácido nucleico también pueden inyectarse en embriones inmaduros (Neuhaus *et al.*, (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75:30).

Los métodos más comúnmente utilizados para la transformación de células vegetales son: el proceso de transferencia de DNA mediado por *Agrobacterium* (Fraley *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80:4803) (como se ilustra en la Patente U.S. Nº 5.824.877; la Patente U.S. Nº 5.591.616; la Patente U.S. Nº 5.981.840; y la Patente U.S. Nº 6.384.301) y el proceso mediado por bombardeo de microproyectiles o biolística (es decir, la pistola de genes) (tal como se describe en la Patente U.S. Nº 5.550.318; la Patente U.S. Nº 5.538.880; la Patente U.S. Nº 6.160.208; la Patente U.S. Nº 6.399.861; y la Patente U.S. Nº 6.403.865). Normalmente, se desea la transformación nuclear, pero cuando se desea transformar plásmidos específicamente, tales como cloroplastos o amiloplastos, los plásmidos de plantas se pueden transformar utilizando un reparto mediado por microproyectiles de la molécula de ácido nucleico deseada para ciertas especies de plantas, tales como *Arabidopsis*, tabaco, patata y especies de *Brassica*.

La transformación mediada por *Agrobacterium* se logra mediante el uso de una bacteria del suelo modificada genéticamente que pertenece al género *Agrobacterium*. Varias especies de *Agrobacterium* median la transferencia de un ADN específico conocido como "T-ADN", que se pueden modificar genéticamente para transportar cualquier pieza deseada de ADN en muchas especies de plantas. Los principales acontecimientos que marcan el proceso de patogénesis mediada por T-ADN son: inducción de genes de virulencia, y el procesamiento y la transferencia de T-ADN. Este proceso es objeto de muchas revisiones (Ream (1989) *Ann. Rev. Phytopathol.* 27:583-618; Howard y Citovsky (1990) *Bioassays* 12:103-8; Kado (1991) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 10:1-32; Zambryski (1992) *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:465-90; Gelvin (1993) in *Transgenic Plants*, Kung y Wu eds., Academic Press, San Diego, pp. 49-87; Binns y Howitz (1994) In *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*, Dang, ed., Berlin: Springer Verlag., pp. 119-38; Hooykaas y Beijersbergen (1994) *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:157-79; Lessl y Lanka (1994) *Cell* 77:321-4; Zupan y Zambryski (1995) *Annual Rev. Phytopathol.* 27:583-618).

Para seleccionar o marcar las células vegetales transformadas independientemente de la metodología de transformación, el ADN introducido en la célula puede contener un gen que funciona en un tejido vegetal regenerable para producir un compuesto que confiere al tejido de la planta resistencia a un compuesto que sería tóxico en caso contrario. Los genes de interés para su uso como marcador seleccionable, rastreado, o puntuable incluyen, pero no se limitan a, GUS, la proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa, y genes tolerantes a antibióticos o herbicidas. Ejemplos de genes de resistencia a antibióticos incluyen genes que confieren resistencia a las penicilinas, kanamicina (y neomicina, G418, bleomicina); metotrexato (y trimetoprim); cloranfenicol; y tetraciclina. Por ejemplo, la resistencia a glifosato se puede conferir por un gen de resistencia a herbicida. Della-Cioppa *et al.*, (1987) *Bio/Technology* 5:579-84. Se pueden implementar también otros dispositivos de selección que incluyen, pero

no se limitan a, la tolerancia a la fosfotricina, bialafos, y mecanismos de selección positiva, Joersbro *et al.*, (1998) Mol. Breed. 4:111-7, y se consideran dentro del alcance de la presente invención.

Las células transformadas, identificadas por selección o cribado y cultivadas en un medio apropiado que soporta la regeneración, se pueden dejar a continuación madurar en las plantas.

- 5 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar con cualquier célula o tejido vegetal transformable. Las células y tejidos transformables, como se emplean en la presente memoria, incluyen pero no se limitan a, aquellas células o tejidos que son capaces de otra multiplicación para dar lugar a una planta. Los expertos en la técnica reconocen que un número de células o tejidos vegetales son transformables cuando después de la inserción de ADN exógeno y en condiciones de cultivo apropiadas, las células o tejidos de la planta pueden formar una planta diferenciada. Tejidos adecuados con estos fines pueden incluir, pero no se limitan a, embriones inmaduros, tejido escutelar, cultivos de células en suspensión, inflorescencia inmadura, brote de meristemo, explantes nodales, tejido de callo, tejido del hipocótilo, cotiledones, raíces, y hojas.

- 10 La regeneración, el desarrollo, y el cultivo de plantas a partir de protoplastos o explantes de plantas transformadas, se conocen en la técnica. Weissbach y Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, (Eds.) Academic Press, Inc., San Diego, CA; Horsch *et al.*, (1985) Science 227:1229-1231. Este proceso de regeneración y crecimiento incluye normalmente las etapas de seleccionar células transformadas y cultivar esas células a través de las etapas habituales del desarrollo embrionario mediante la etapa de plántula enraizada. Las semillas y los embriones transgénicos se regeneran de manera similar. En este método, los transformantes se cultivan generalmente en presencia de un medio selectivo que selecciona las células transformadas con éxito e induce la regeneración de los brotes vegetales. Fraley *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80:4803. Estos brotes se obtienen normalmente dentro de dos a cuatro meses. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan después en un medio de crecimiento vegetal apropiado, tal como tierra. Las células que sobreviven a la exposición de un agente selectivo, o las células que se han marcado positivamente en un ensayo de cribado, se pueden cultivar en medios que soporten la regeneración de las plantas. Los brotes se pueden transferir entonces a un medio inductor de raíces apropiado que contiene el agente selectivo y un antibiótico para prevenir el crecimiento bacteriano. Muchos de los brotes desarrollarán raíces. Estos se trasplantan luego a tierra u otros medios para permitir el continuo desarrollo de las raíces. El método, como se describe anteriormente, generalmente variará dependiendo de la cepa vegetal empleada en particular, y los detalles de la metodología están, por tanto, dentro del criterio de un experto en la técnica.

- 20 25 30 Las plantas transgénicas regeneradas se pueden auto-polinizar para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. Alternativamente, el polen obtenido de las plantas transgénicas regeneradas se puede cruzar con plantas no transgénicas, preferiblemente líneas endogámicas de especies agrónomicamente importantes. En cambio, el polen de las plantas no transgénicas se puede usar para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

- 35 La planta transgénica puede pasar a su progenie a lo largo de la secuencia de ácido nucleico transformado. La planta transgénica es preferiblemente homocigótica para la secuencia de ácido nucleico transformado y transmite esa secuencia a la totalidad de su descendencia, y como resultado de la reproducción sexual. La progenie puede crecer a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Estas plantas adicionales se pueden entonces auto-polinizar para generar una verdadera línea de cultivo de plantas.

- 40 45 La progenie de estas plantas se puede evaluar, entre otras cosas, por expresión genética. La expresión genética se puede detectar mediante varios métodos comunes, tales como transferencia Western, transferencia Northern, inmunoprecipitación, y ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas). Las plantas transformadas se pueden analizar también para la presencia del ADN introducido y el nivel de expresión y/o el perfil de ácidos grasos conferido por las moléculas de ácido nucleico y las moléculas de aminoácido de la presente invención. Los expertos en la técnica son conscientes de los numerosos métodos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, métodos para el análisis de plantas incluyen, pero no se limitan a, transferencias de Southern o transferencias de Northern, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, métodos de cribado fenotípico, evaluaciones de campo, y ensayos de inmunodiagnóstico.

- 50 55 Los métodos para transformar específicamente dicotiledóneas son bien conocidos por los expertos en la técnica. La transformación y regeneración de plantas empleando estos métodos se han descrito para una serie de cultivos que incluyen, pero no se limitan a, miembros del género *Arabidopsis*, algodón (*Gossypium hirsutum*), soja (*Glycine max*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), y miembros del género *Brassica*. Los métodos para transformar dicotiledóneas, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y la obtención de plantas transgénicas se han publicado para el algodón (Patente U.S. N° 5.004.863; Patente U.S. N° 5.159.135; la Patente U.S. N° 5.518.908); de soja (Patente U.S. N° 5.569.834; Patente U.S. N° 5.416.011; McCabe, *et al.*, (1988) Biotechnology 6:923; Christou *et al.*, (1988) Plant Physiol. 87:671-4; *Brassica* (Patente U.S. N° 5.463.174); cacahuete (Cheng *et al.*, (1996.) Plant Cell Rep. 15:653-7; McKentley *et al.*, (1995) Plant Cell Rep. 14:699-703; papaya; y el guisante (Grant *et al.*, (1995) Plant Cell Rep. 15:254-8).

Los métodos para transformar monocotiledóneas son también bien conocidos en la técnica. La transformación y regeneración de plantas con estos métodos se han descrito para una serie de cultivos que incluyen, pero no se

limitan a, cebada (*Hordeum vulgare*); maíz (*Zea mays*); avena (*Avena sativa*); dácilo o pasto ovillo (*Dactylis glomerata*); arroz (*Oryza sativa*, incluyendo las variedades indica y japónica); sorgo (*Sorghum bicolor*); caña de azúcar (*Saccharum sp*); festuca alta (*Festuca arundinacea*); especies de césped (por ejemplo, *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum secundatum*); trigo (*Triticum aestivum*); y la alfalfa (*Medicago sativa*). Es evidente para los expertos en la técnica que se puede utilizar un gran número de metodologías de transformación y modificación para la producción de plantas transgénicas estables para un número indefinido de cultivos objeto de interés.

Se puede elegir cualquier planta para emplear en los métodos descritos actualmente. Las plantas preferidas para la modificación según la presente invención incluyen *Arabidopsis thaliana*, borraja (*Borago spp.*), canola, ricino (*Ricinus communis*), grano de cacao (*Theobroma cacao*), maíz (*Zea mays*), algodón (*Gossypium spp.*), *Crambe spp.*, *Cuphea spp.*, lino (*Linum spp.*), *Lesquerella* y *Limnanthes spp.*, Linola, capuchina (*Tropaeolum spp.*), *Oenothera spp.*, *Vernonia spp.*, trigo (*Triticum spp.*), cebada (*Hordeum spp.*), arroz (*Oryza spp.*), avena (*Avena spp.*) sorgo (*Sorghum spp.*), centeno (*Secale spp.*) u otros miembros de la Familia de las gramíneas (*Gramineae*).

Es evidente para los expertos en la técnica que se puede utilizar un gran número de metodologías de transformación y modificación para producción de plantas transgénicas estables para un número indefinido de cultivos objeto de interés.

G. Semillas transgénicas

En algunas realizaciones de la invención, una semilla transgénica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO:2. En estas y otras realizaciones, la semilla transgénica comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 60% idéntica a SEQ ID NO:1. En ciertas realizaciones, las semillas de la presente invención muestran niveles incrementados de ácidos grasos inusuales, por ejemplo, ácidos grasos ω -7, tal como 16:1 Δ^9 y/o 18:1 Δ^{11} . Las semillas pueden ser cosechadas de las plantas transgénicas fértiles y usarse para cultivar generaciones descendientes de plantas transformadas de esta invención, incluyendo líneas de plantas híbridas que comprenden una secuencia de ácido nucleico según esta invención, y otro gen o construcción de ácido nucleico de interés.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como una limitación de la invención a las características o realizaciones particulares descritas. Esta invención se limita únicamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo I: Materiales y Métodos

30 Crecimiento y transformación de las plantas

Se cultivaron plantas *Arabidopsis* en el suelo bajo exposición continua a 300 microeinsteins de luz (1 microeinstein = 1 mol de luz) en cámaras de crecimiento de ambiente controlado E7/2™ (Conviron). Las plantas se transformaron según el método de Clough y Bent, Clough y Bent (1998) Plant J. 16(6):735-43, usando la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Identificamos las semillas T₁ individuales que transportan los transgenes mediante la fluorescencia emitida, Stuitje *et al.*, (2003) Plant Biotechnol. J. 1(4):301-9, tras iluminación con luz verde de una linterna LED™ X5 (Inova) junto con un filtro de cámara rojo 25A. Pidkowich *et al.*, (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 104(11):4742-7. Se utilizó un microscopio de disección WILD™ M3Z equipado con un sistema de iluminación Olympus U-LH100HG™ para discriminar entre las semillas que transportan marcadores Zs-Verdes y Ds-Rojos con el uso de filtros FITC 535 y FITC 515, respectivamente. La expresión específica de la semilla se logró mediante la colocación de las construcciones bajo el control del promotor de proteína de almacenamiento de semilla de faseolina o el promotor LTP170. Slightom *et al.*, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80(7):1897-1901; y van der Geest y Hall (1997) Plant Mol Biol. 33(3):553-7.

Fuente de Com25

Com25 es una variante de Δ^9 -18:0 -ACP desaturasa de *Ricinus communis* que surgió de un programa de mutagénesis/selección de saturación combinatorial diseñado para identificar variantes con actividad mejorada por las cadenas acilo de menos de 18C de longitud. Whittle y Shanklin (2001) J. Biol. Chem. 276(24):21500-5. Com25 difiere de la desaturasa de ricino parental en las siguientes 5 posiciones de aminoácido: M114S, T117R, L118C, P179L, y G188T (numerados según la desaturasa madura de ricino PDB entrada 1AFR).

Construcciones de plásmidos

50 Phas:Com25. Se clonó el marco de lectura abierto completo de la variante de ricino Com25, modificado genéticamente para contener su péptido de tránsito auténtico y flanqueada por Pacl 5' y los sitios de restricción XhoI 3' en los correspondientes sitios del plásmido pDs-Red-Phas, Pidkowich *et al.*, (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 104(11):4742-7, (con marcador Ds-Red) para crear Phas:Com25 (FIG. 5).

Phas:Com25, LTP170:Com25. Se amplificó el promotor LTP170 a partir del ADN genómico de *Arabidopsis* utilizando

cebadores P17-5'BamHI (GGGATCCCCGGTTGACATTTTTACCTTTTT; SEQ ID NO:3) y P17-3'Pacl (GGTTAATTAAGTCTTCAAACCTCTAGGA; SEQ ID NO:4), se subclonaron en pGEMT-Easy antes del aislamiento del fragmento BamHI-Pacl, que se clonó en los sitios correspondientes del plásmido pDs-Red-Phas:Com25 (descrito, *supra*) para crear pDs-Red-LTP170:Com25. Un fragmento que contiene Com25 junto con el terminador de faseolina se escindió usando BamHI y EcoRV, y se clonó en los sitios de restricción BamHI y SmaI dentro del vector pDs-Red-LTP170-Com25 para crear Phas:Com25/LTP170:Com25 (FIG. 5).

Phas:Fab1-HPAS. Este constructo se creó en dos etapas; primero la construcción de Phas:FatB-HP, y después la inserción de una porción antisentido del gen *FatB* para reemplazar parte del intrón *Fad2* que separa las porciones de sentido y antisentido del gen *FatB* que comprende la horquilla. Para lograr esto, se amplificó 150 pb de UTR (regiones no traducidas de los genes) 3' *FatB* de *Arabidopsis* a partir de ADN genómico en ambos sentidos (utilizando cebadores FatB-hps-5'PstI GGGCTGCAGAACAAAGTTTCGGCCACCAACCC; SEQ ID NO:5 y FatB-hps-3'XhoI CCCCTCGAGACATCAGAATTCGTAATGAT; SEQ ID NO:6) y orientaciones antisentido (utilizando cebadores FatB-hpa-5'NheI GGGGCTAGCAAGTTTCGGCCACCAACCC; SEQ ID NO:7 y FatB-hpa-3'Pacl CCCTTAATTAACATCAGAATTCGTAATGAT; SEQ ID NO:8). Estos fragmentos se restringieron con PstI/XhoI y NheI/Pacl, y se utilizaron para reemplazar las porciones de sentido y antisentido UTR 5' de *Fab1* en pGEM-T-Easy-HTM3, Pidkovich *et al.*, (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 104(11):4742-7, en sus sitios equivalentes, para crear el plásmido intermedio pGEM-T-Easy-HTM4. Para crear una porción antisentido de 300 pb de la región codificante *FatB*, se amplificó un fragmento con los cebadores FatB-Exon-5'Sp-Bam (CCACTAGTGGATCCACCTCTGCTACGTCGTCATT; SEQ ID NO:9), y FatB-Exon-3'Bg-Sal (GGAGATCTGTGCGACGTAGTTATAGCAGCAAGAAG, SEQ ID NO:10) y el fragmento, se restringido con BamHI y Sall, se usó para reemplazar la parte de *Fad2*-intrón después de la restricción con BglII y SpeI para crear pGEM-T-Easy-HTM5.

El fragmento HPAS ensamblado se escindió con el uso de Pacl y XhoI, y se clonó en los sitios equivalentes de pZs-Green-Phas:Com25 (plásmido pDs-Red-Phas:Com25, descrito, *supra*, en el que se había reemplazado el marcador de fluorescencia pCVMV:Ds-Red por un marcador de proteína verde fluorescente pCVMV: Zs-Green™ (Clontech)) para crear el plásmido Phas:FatB-HPAS (FIG. 5).

Phas: AnD9d, Phas: LnD9D. Se combinaron dos desaturasas acil-CoA D9 fúngicas en el plásmido pDAB7318 conduciendo ambos genes por el promotor Phas específico de la semilla de *Phaseolus vulgaris*. El primer gen en la construcción era una desaturasa acil-CoA $\Delta 9$ de *Aspergillus nidulans* que se rediseñó y sintetizó para la expresión óptima en plantas (Solicitud de Patente US 20080260933A1), y se fusionó a la región no traducida 3' y 3' MAR del gen faseolina de *Phaseolus vulgaris*. El segundo gen de la desaturasa en esta construcción era una desaturasa acil-CoA $\Delta 9$ de *Leptosphaeria nodorum* que también se rediseñó y sintetizó para la expresión vegetal, y se fusionó a la región ORF23 3' no traducida de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta desaturasa se identificó mediante búsquedas de homología de la secuencia del genoma de *S. nodorum* publicado por el Proyecto de Secuenciación de *Leptosphaeria nodorum*, Instituto Broad de Harvard y MIT (<http://www.broad.mit.edu>). Se demostró que tiene una preferencia por la desaturación de palmitato mediante complementación del mutante *ole1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Phas:Fab1-HPAS-PHas:Com25. Para simplificar experimentos de apilamiento de genes, el plásmido Phas:Fab1/HPAS-PHas:Com25 se construyó para combinar la expresión de Com25 con la supresión KASII. Para lograr esto, el terminador de faseolina se aisló de Phas:Com25, y se clonó en el vector intermedio de pBL, con el fragmento EcoRV-EcoRV que contiene el promotor de faseolina de conducción *Com25*, para crear pBL-Phas:Com25-PhasTer. Este casete de expresión *Com25* se escindió utilizando sitios de restricción que flanquean EcoRI-EcoRI, y se clonó en el sitio correspondiente dentro de Phas:Fab1-HPAS para crear Phas:Fab1-HPAS-PHas-Com25. Véase FIG. 5.

Análisis de ácidos grasos

Para analizar los ácidos grasos de semillas individuales, los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) se prepararon mediante la incubación de las semillas con hidróxido de trimetilsulfonio 0,2 M en metanol. Butte *et al.*, (1982) Anal. Lett. 15(10):841-50. De manera similar, para analizar las semillas a granel, los FAMES se prepararon mediante la incubación de las semillas en 0,5 ml de BCl₃ durante 1 hora a 80°C, extrayéndolas con 1 ml de hexano, y después se secaron con N₂. Se analizaron los FAMES, bien con un detector de ionización de llama HP6890™-cromatógrafo de gases (Agilent Technologies), o bien con un espectrómetro de masa-cromatógrafo de gases HP5890™ (Hewlett-Packard) equipado con columnas capilares 60-m x 250- μ m SP-2390 (Supelco). La temperatura de la estufa se elevó durante los análisis de 100°C a 240°C a una velocidad de 15°C/min con una velocidad de flujo de 1,1 mL/min. La espectrometría de masas se realizó con un detector selectivo de masas HP5973™ (Hewlett-Packard). Determinamos las posiciones de los dobles enlaces de los FAMES monoinsaturados por derivatización con sulfuro de dimetilo. Yamamoto *et al.*, (1991) Chem. and Phys. Lipids 60(1):39-50.

Ejemplo II : Expresión de *Com25* en *Arabidopsis* WT

Se han reportado varias plantas para acumular FA ω -7 en sus semillas, que incluyen *Asclepias*, Hopkins y Chisholm (1961) Can. J. Biochem. Physiol. 39:829-35, y *Doxantha*, Chisholm y Hopkins (1965) J. Am. Oil Chem. Soc. 42:49-50. Se han aislado los genes que codifican las enzimas desaturasas responsables de la síntesis de palmitoleato. Las actividades de las enzimas desaturasas recombinantes correspondientes, Cahoon *et al.*, (1997) Plant Mol. Biol.

33:1105-10; Cahoon *et al.*, (1998) *Plant Physiol.* 117(2):593-8, eran, al igual que las de muchas desaturasas variantes, inferiores a las reportadas para las estearoil-ACP desaturasas arquetípicas. Whittle y Shanklin (2001) *J. Biol. Chem.* 276(24):21500-5. Se compararon los efectos de expresar desaturasas de *Asclepias* y *Doxantha* y varias variantes de la desaturasa de ricino, incluyendo la desaturasa a partir de la variedad de ricino 5,2 y Com25 que surgió a partir de experimentos de evolución dirigidos, diseñados para mejorar la Actividad 16:0-desaturasa de la Δ^9 18:0- desaturasa de ricino, Whittle y Shanklin (2001) *J. Biol. Chem.* 276(24):21500-5, en *Arabidopsis*. En estos experimentos, Com25 superó a las otras enzimas desaturasa, Bondaruk *et al.*, (2007) *Plant Breeding* 126:186-94, aumentando la acumulación de 16:1 Δ^9 y su producto de elongación, 18:1 Δ^{11} en *Arabidopsis* WT de niveles apenas detectables en las plantas no transformadas, a aproximadamente 2% y aproximadamente el 12% respectivamente; con un rendimiento total de ácidos grasos ω -7 de aproximadamente 14% en los transformantes Com25.FIG. 2A; FIG. 2B.

La Tabla 1 muestra que aunque Com25 tiene una k_{cat} (11,1 min^{-1}) mucho mejor en el ricino WT (2,8 min^{-1}) para el sustrato 16:0-ACP, no alcanza a lo reportado para la variante 5,2 de ricino (25,3 min^{-1}). Whittle y Shanklin (2001) *J. Biol. Chem.* 276(24):21500-5. Sin embargo, K_m de Com25 para 16:0-ACP (0,12 μM) es de 4,6 veces menor que la de la variante 5,2 de ricino (0,55) y 42 veces menor que la de ricino WT (5,0). El factor de especificidad resultante con el sustrato 16:0-ACP para Com25 de 91 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, es aproximadamente dos veces la de la variante 5,2 de ricino y 163 veces mayor que la de ricino WT. De hecho, el factor de especificidad de Com25 con 16:0-ACP es equivalente a la de ricino WT con su sustrato natural 18:0-ACP (92 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). La K_m mejorada de Com25 para 16:0-ACP en relación con la variante 5,2 de ricino sugiere que se completa más eficazmente con FatB y KASII por el sustrato, proporcionando una explicación de por qué su expresión facilita una mayor acumulación de FA ω -7 que la variante 5,2 de ricino, a pesar de su menor K_{cat} .

Tabla 1

Parámetros cinéticos de la desaturasa de ricino y sus variantes, con varios sustratos.

Factor específico de la enzima	Sustrato	K_{cat}	K_m	K_{cat}/K_m
min^{-1}	μM	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$		
Com25	16:0-ACP	11,1 (0,6)	0,12 (0,03)	91
5,2	16:0-ACP	25,3 (1,1)	0,55 (0,06)	46
WT	16:0-ACP	2,8 (0,1)	5,0 (0,5)	0,56
WT	18:0-ACP	42,3 (1,6)	0,46 (0,05)	92

25 Ejemplo IV: Expresión de *Com25* en huéspedes que contienen niveles aumentados de 16:0

En *Arabidopsis* WT, los ácidos grasos se sintetizaron de novo a través de la ruta ACP hasta un primer punto de ramificación en el nivel de 16:0-ACP. FIG. 1. Si actúa sobre FATB, la tioesterasa palmitoilo, el ácido graso 16:0 libre se libera del plástido al citoplasma donde se esterifica a CoA, y posteriormente se transesterifica en fosfolípidos del sistema endomembranoso. Alternativamente, β -cetoacil-ACP sintasa II (KASII) alarga la mayoría de 16:0-ACP a 18:0-ACP después de lo cual se desatura por la estearoil- Δ^9 -ACP desaturasa para producir oleoil-ACP. FATA, la oleoil-ACP tioesterasa libera el ácido oleico, que sale del plástido y, como el palmitato, se activa a la CoA-tioéster y se transfiere a los fosfolípidos. En el ER, el oleato se puede alargar a 10:1 Δ^{11} a través de la acción de la elongasa de ácidos grasos (FAE) I, o convertirse en desaturados secuencialmente por la acción de FAD2 y FAD3 para producir ácidos linolénico o linoléico, respectivamente.

35 16:0-ACP es el primer metabolito en la ruta de la síntesis de FA que se puede comprometer por la producción de ω -7 por su desaturación a 16:1 Δ^9 -ACP. Para lograr esto, se exploró la viabilidad de expresar una desaturasa Δ^9 -16:0-ACP específica plastidial bajo el control de un promotor específico de la semilla (véase FIG. 1 (reacción 1)).

Como se describe, *supra*, β -cetoacil-ACP sintasa II (KAS II) alarga 16:0-ACP a 18:0-ACP. Por lo tanto, se buscaron líneas con menor actividad KASII que contendría niveles aumentados del sustrato 16:0. La FIG. 2 muestra trazas de GC representativos de ésteres metílicos de FA de semilla. A pesar de los muchos cribados de mutagénesis, sólo se ha informado de una *fab1* mutante, James y Dooner (1990) *Theor. Apple Genet.* 80:241-45, que muestra un aumento en los niveles 16:0 en las hojas y semillas, que contienen aproximadamente 21% de 16:0 en comparación con aproximadamente 10% en WT, como se muestra en la FIG. 2C; y en la Tabla 2. La evidencia bioquímica mostró que la lesión *fab1* está en KASII, debido a que su actividad se redujo en el mutante. Carlsson *et al.*, (2002) *Plant J.* 29(6):761-70. La expresión de *Com25* en *fab1* aumentó la acumulación de 16:1 Δ^9 y 18:1 Δ^{11} a aproximadamente 23% y aproximadamente 16% respectivamente, produciendo un rendimiento total de aproximadamente de 39% FA

ω -7.FIG. 2D; y Tabla 2. Este gran aumento de FA ω -7 sobre la expresión de *Com25* en los antecedentes *fab1-1* se correlaciona con el aumento total en la acumulación de 16:0 en semillas maduras, y los resultados similares a partir de la disminución de la competencia de KASII por el sustrato 16:0-ACP.

5 También se combinó la mutación *fab1* con *fae1*, porque su deficiencia en el alargamiento extraplastidial de ácidos grasos C18 a C20 aumenta aún más la cantidad de ácidos grasos 16:0, y simplifica el análisis. El mutante doble no transformado contiene aproximadamente 9% de ácidos grasos ω -7, presumiblemente refleja el aumento de desaturación de 16:0-ACP por la Δ^9 -18:0-ACP desaturasa en presencia de niveles aumentados del sustrato 16:0-ACP.FIG. 2E; y Tabla 2. La expresión de *Com25* en *fab1/fae1* dio como resultado un aumento de 16:1 Δ^9 y 18:1 Δ^{11} a aproximadamente 26%, y aproximadamente 23%, respectivamente, produciendo un aumento de FA ω -7 a aproximadamente 50%. FIG. 2F; y Tabla 2.

10 De los resultados anteriores, el aumento de la acumulación de 16:1 en semillas *fab1* y *fab1/fae1* se correlaciona con un aumento de 16:0, y así que buscaron líneas para expresar *Com25* en las que los niveles de 16:0 eran más altos que en el mutante doble *fab1/fae1*. Se informó recientemente dos de tales mutantes en los que se suprime *Fab1*, uno por horquilla (HP)RNAi, Pidkovich *et al.*, (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 104(11):4742-7, y el otro por un método novedoso de supresión denominado horquilla-antisentido (HPAS)RNAi, Nguyen y Shanklin (2009) Journal of American Oil Chemists Society 86:41-9. Estas líneas contienen niveles de acumulación 16:0 fuertemente elevados en semilla a 42% y 46%, respectivamente. FIG. 3. La transformación con *Com25* produjo un aumento adicional de aproximadamente 5% de FA ω -7 en ambos casos. Tabla 2. Por lo tanto, los aumentos de acumulación de 16:0 en los bajos niveles de 16:0 es predictivo del aumento de desaturación de *Com25*, como se evidencia por incrementos proporcionales en la acumulación de FA ω -7, pero esta respuesta es aparentemente saturable en un poco más de 30%, pues no hubo diferencia entre la expresión de acumulación FA ω -7 en huéspedes que acumulan bien 42% o 46% de 16:0. FIG. 3. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría particular, es posible que otros factores distintos del sustrato, es decir, la abundancia desaturasa y/o la disponibilidad del reductor se vuelvan limitantes en estos transgénicos.

25 Recientemente, se describió un alelo genosuprimido en ADN-T, *fab1-2* que ha incrementado los niveles de 16:0 en el heterocigoto; sin embargo, el homocigoto demostró ser letal para el embrión. Pidkovich *et al.*, (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 104(11):4742-7. Partimos de la hipótesis de que el fenotipo letal era resultante de la reducción de ácidos grasos insaturados, y plantean la teoría de que la expresión de *Com25* en esta línea puede conferir viabilidad. Por el contrario, el mutante doble *fab1/fae1* es viable en la condición homocigótica y es indistinguible en el crecimiento y desarrollo a partir de WT. Por lo tanto, utilizamos el mutante doble *fab1/fae1* como un huésped experimental para experimentos posteriores.

Ejemplo V: Incremento de la dosificación de *Com25* genético da como resultado un aumento en la acumulación de ω -7

35 La Δ^9 -18:0-ACP desaturasa de ricino arquetípico tiene una K_{cat} de 42 min⁻¹, Whittle y Shanklin (2001) J. Biol. Chem. 276(24):21500-5; que es varias veces mayor que los reportados para Δ^9 -16:0-ACP desaturasas. Cahoon *et al.*, (1997) Plant Mol. Biol. 33: 1105-10; y Cahoon *et al.*, (1998) Plant Physiol. 117(2):593-8. Aunque esta renovación es comparable a las de las reacciones de oxidación similares dependientes de Hierro, tales como las del citocromo P450, estas tasas son más bajas (en muchos casos, en órdenes de magnitud) que las de muchas enzimas metabólicas. Las bajas tasas de renovación de las desaturasas requieren mayores niveles de expresión de la proteína para causar la desaturación de una gran proporción del carbono almacenado en la semilla, aumentando la posibilidad de que la abundancia de la enzima desaturasa pueda limitar la acumulación de ω -7. Para probar esta hipótesis, *Com25* se modificó genéticamente bajo el control de un promotor LTP170 específico de la semilla (que controla la expresión de una proteína de almacenamiento de la semilla) y se co-expresó junto con el constructo de *Com25* dirigido por faseolina descrito anteriormente. La co-expresión de *Com25* bajo el control de los promotores de faseolina y LTP170 en el *fab1/fae1* de origen dio como resultado un incremento de la acumulación de FA ω -7 de aproximadamente 50% a aproximadamente 58%; el aumento en el 16:1 Δ^9 es mayor (aproximadamente 6%) que la de 18:1 Δ^{11} (aproximadamente 2%). Este aumento de la acumulación de FA ω -7 es moderado, lo que sugiere que *Com25* es probable que sea limitante en las semillas que expresan ambos constructos de *Com25*.

Tabla 2

%Ácido graso	16:0	16:1 Δ^9	16:2	18:0	18:1 Δ^9	18:1 Δ^{11}	18:2	18:3	20:0	20:1	Tot ω -7	Δ
Planta												
WT	10,4±0,4	0,1±0,06	0	3,7±0,4	14,5±2,2	1,7±0,2	26,6±0,9	20,2±1,1	2,1±0,3	20,7±0,6	1,8±0,2	-
<i>fab1</i>	20,8±1,6	1,5±0,5	0	3,7±0,4	18,4±1,3	2,8±0,9	14,8±2,7	19,1±1,3	3,1±0,8	15,8±1,0	4,3±1,3	2
<i>fab1,fae1</i>	26,8±1,9	1,9±0,3	0	3,6±0,5	15,8±1,5	6,8±0,8	25,3±2,5	19,7±1,5	0,2±0,1	0	8,7±1,1	4
WT,	9,2±1,5	1,6±0,4	0	3,7±0,3	5,7±1,6	12,8±1,2	26,6±1,6	29,6±2,2	2,1±0,4	8,7±2,1	14,4±1,5	12

Com25													
<i>fab1</i> , Com25	18,6±2,1	23,5±3,7	1,6±0,5	1,9±0,3	2,9±2,2	15,6±3,3	9,6±1,7	17,1±1,8	1,0±0,4	8,2±3,4	39,1±1,9	35	
<i>fab1,fae1</i> , Com25	22±2,6	26,2±2,9	2,0±0,4	1,8±0,4	3,7±1,1	23,4±2,3	8,6±0,7	12,4±1,8	0	0	49,6±1,1	41	
<i>fab1,fae1</i> , Com25 Fab1-HPAS	20,7±2,1	30,3±1,6	2,2±0,2	0,9±0,6	4,7±1,4	24,5±1,8	6,6±0,9	10±1,6	0	0	54,6±1,5	5	
<i>fab1,fae1</i> Com25, Com25	20,8±0,8	32,5±1,7	2,5±0,4	0,5±0,2	1,9±0,7	25,5±1,2	5,7±1,7	11±1,3	0	0	58±1,3	8	
<i>fab1,fae1</i> FatB-HPAS	23,1±1,5	4,2±0,6	0	2,9±0,8	36,1±3,9	5,1±1,7	14,8±1,5	13,9±2,3	0	0	9,3±2,0	1	
<i>fab1,fae1</i> FatB-HPAS Com25	19,1±1,3	26,7±2,1	0	1,9±0,5	4,8±1,1	28,9±2,3	7,8±1,6	10,8±2,4	0	0	55,6±1,8	6	
<i>fab1,fae1</i> AnΔ9D, LnΔ9D	12,7±2,1	17,9±1,8	0,8±0,1	0,2±0,1	17,7±0,9	5,8±0,7	24,1±1,2	20,8±0,9	0	0	23,7±1,9	15	
<i>fab1,fae1</i> , Fab1- HPAS Com25 AnΔ9D, LnΔ9D	11,2±1,3	43,4±3,3	0,7±0,5	0,9±0,2	4,6±1,5	23,2±1,1	8,4±1,2	7,6±1,6	0	0	66,6±3,9	12	
Doxantha	18,0±0,5	54,6±1,7	2,4±0,5	2,0±0,1	1,8±0,2	17,3±1,5	3,9±0,7	0	0	0	71,9±1,3	n/a	

Ejemplo VI: La expresión de Δ^9 -16:0 desaturasas extraplásticas aumenta la acumulación de FA ω -7

5 Como se discutió previamente, el uso *Arabidopsis* de origen que acumula altos niveles de 16:0 se correlaciona con la formación de FA ω -7 tras la expresión de una 16:0-ACP desaturasa, pero gran parte de los 16:0 abandonan el plástido y se acumula en el aceite de la semilla. Véase la Tabla 2. Por lo tanto, se consideraron dos enfoques para reducir la acumulación de 16:0 en el aceite de la semilla. Una estrategia fue reducir la actividad de la FATB palmitato tioesterasa (FIG. 1) que escinde a 16:0 a partir de 16:0-ACP. La supresión de la FATB a través de HPAS-ARNi reduce la acumulación de 16:0 aproximadamente 3%, con un aumento de aproximadamente 6% de los FA ω -7. Véase la Tabla 2. Se exploró la viabilidad de reducir aún más la acumulación de 16:0 en la semilla más allá de lo que se observó por la supresión de FATB mediante la desaturación del 16:0 después de la exportación desde el plástido.

15 Los ácidos grasos libres liberados del plástido en la ruta de acumulación se esterifican a CoA mediante acil-CoA sintasas como los triglicéridos. Shockey *et al.*, (2003) Plant Physiol. 132(2):1065-1076. Estas acil Co-As citoplasmáticas y FA unidos a fosfolípidos representan dos fuentes de sustratos potencialmente disponibles para las desaturasas extraplásticas. La expresión extraplástica de desaturasas de los hongos *Aspergillus nidulans* (An) y *Leptosphaeria nodurum* (Ln), bien en solitario o bien en combinación, se evaluaron con respecto a la reducción de los niveles 16:0 en *Arabidopsis*. La co-expresión de dos desaturasas a partir de Ln y An bajo el control del promotor de faseolina han dado resultados prometedores en la reducción de 16:0 en *Arabidopsis* WT. Por lo tanto, se ensayó la expresión del constructo de Ln y An junto con la expresión de una sola copia de Com25 en una línea de supresión KASII HPAS-ARNi. La expresión de LnΔ9D y AnΔ9 desaturasas resultó en la conversión de aproximadamente la mitad de los 16:0 a 16:1Δ⁹, dando como resultado una disminución de la acumulación de 16:0 en semillas de aproximadamente 19% a aproximadamente 11% (aproximadamente el nivel visto en semillas WT), con un aumento

5 correspondiente en 16:1 Δ^9 de aproximadamente 27% a 43%. Los niveles de 18:1 Δ^{11} siguen siendo los mismos en la línea hospedadora *fab1/fae1/Com25*, y esta línea transformada con *Ln $\Delta 9D$* y *An $\Delta 9$* desaturasas (aproximadamente 25% y aproximadamente 23%, respectivamente), lo que demuestra que el mutante *fae1* está casi totalmente desprovisto de la actividad de elongación 16:1 Δ^9 . Esta estrategia co-expresión de desaturasas plastidiales y extraplásticas produjo una acumulación media de aproximadamente 67% FA ω -7, en plantas individuales se muestran mayores al 71%.

Listado de secuencias

<110> Dow AgroSciences LLC Brookhaven Science Associates, LLC Shanklin, John Nguyen, Tam Huu Walsh, Terence

10 <120> Acumulación de ácidos grasos Omega-7 en semillas de plantas

<130> 2971.01-9666.1PC

<160> 10

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 1092

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Com25 construido a partir de delta9-18:0-desaturasa de ricino

20 <400> 1

gcctctaccc tcaagtctgg ttctaaggaa gttgagaatc tcaagaagcc tttcatgcct	60
cctcgggagg tacatgttca ggttaccat tctatgccac cccaaaagat tgagatcttt	120
aatccctag acaattgggc tgaggagaac attctgggtc atctgaagcc agttgagaaa	180
tggtggcaac cgcaggattt tttgccagat cccgcctctg atggatttga tgagcaagtc	240
agggaactca gggagagagc aaaggagatt cctgatgatt attttgttgt tttggttga	300
gacatgataa cggaagaagc ccttcccact tatcaaaca gtctgaatcg ttgtgatgga	360
gttcgggatg aaacaggtgc aagtccgagc tcttgggcaa tttggacaag ggcattggact	420
gcggaagaga atagacatgg tgacctcctc aataagtatc tctacctatc tggacgagtg	480
gacatgagggc aaattgagaa gacaattcaa tatttgattg gttcaggaat ggatttgcgg	540
acagaaaaca gtccatacct tacgttcatc tatacatcat tccaggaaag ggcaaccttc	600
atctctcatg ggaacactgc cgcacaagcc aaagagcatg gagacataaa gttggctcaa	660
atatgtggta caattgctgc agatgagaag cgccatgaga cagcctacac aaagatagtg	720
gaaaaactct ttgagattga tcttgatggt accgttttgg cttttgctga tatgatgaga	780
aagaaaattt ctatgcctgc acacttgatg tatgatggcc gagatgataa tctttttgac	840
cacttttcag ctggtgagca gcgtcttga gtctacacag caaaggatta tgcagatata	900
ttggagttct tgggtggcag atggaaggtg gataaactaa cgggccttcc agctgagga	960
caaaaggctc aggactatgt ttgtcggtta cctccaagaa ttagaaggct ggaagagaga	1020
gctcaaggaa gggcaaagga agcaccacc atgcctttca gctggatttt cgataggcaa	1080
gtgaagctgt ag	1092

<210> 2

<211> 363

<212> PRT

25 <213> Artificial

ES 2 645 239 T3

<220>

<223> Com25 construido a partir de delta9-18:0-desaturasa de ricino

<400> 2

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

Pro Phe Met Pro Pro Arg Glu Val His Val Gln Val Thr His Ser Met
 20 25 30

Pro Pro Gln Lys Ile Glu Ile Phe Lys Ser Leu Asp Asn Trp Ala Glu
 35 40 45

Glu Asn Ile Leu Val His Leu Lys Pro Val Glu Lys Cys Trp Gln Pro
 50 55 60

Gln Asp Phe Leu Pro Asp Pro Ala Ser Asp Gly Phe Asp Glu Gln Val
 65 70 75 80

Arg Glu Leu Arg Glu Arg Ala Lys Glu Ile Pro Asp Asp Tyr Phe Val
 85 90 95

Val Leu Val Gly Asp Met Ile Thr Glu Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Gln
 100 105 110

Thr Ser Leu Asn Arg Cys Asp Gly Val Arg Asp Glu Thr Gly Ala Ser
 115 120 125

Pro Thr Ser Trp Ala Ile Trp Thr Arg Ala Trp Thr Ala Glu Glu Asn
 130 135 140

Arg His Gly Asp Leu Leu Asn Lys Tyr Leu Tyr Leu Ser Gly Arg Val
 145 150 155 160

Asp Met Arg Gln Ile Glu Lys Thr Ile Gln Tyr Leu Ile Gly Ser Gly
 165 170 175

Met Asp Leu Arg Thr Glu Asn Ser Pro Tyr Leu Thr Phe Ile Tyr Thr
 180 185 190

Ser Phe Gln Glu Arg Ala Thr Phe Ile Ser His Gly Asn Thr Ala Arg
 195 200 205

Gln Ala Lys Glu His Gly Asp Ile Lys Leu Ala Gln Ile Cys Gly Thr
 210 215 220

ES 2 645 239 T3

Ile Ala Ala Asp Glu Lys Arg His Glu Thr Ala Tyr Thr Lys Ile Val
 225 230 235 240

Glu Lys Leu Phe Glu Ile Asp Pro Asp Gly Thr Val Leu Ala Phe Ala
 245 250 255

Asp Met Met Arg Lys Lys Ile Ser Met Pro Ala His Leu Met Tyr Asp
 260 265 270

Gly Arg Asp Asp Asn Leu Phe Asp His Phe Ser Ala Val Ala Gln Arg
 275 280 285

Leu Gly Val Tyr Thr Ala Lys Asp Tyr Ala Asp Ile Leu Glu Phe Leu
 290 295 300

Val Gly Arg Trp Lys Val Asp Lys Leu Thr Gly Leu Ser Ala Glu Gly
 305 310 315 320

Gln Lys Ala Gln Asp Tyr Val Cys Arg Leu Pro Pro Arg Ile Arg Arg
 325 330 335

Leu Glu Glu Arg Ala Gln Gly Arg Ala Lys Glu Ala Pro Thr Met Pro
 340 345 350

Phe Ser Trp Ile Phe Asp Arg Gln Val Lys Leu
 355 360

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de P17-5'BamHI

<400> 3

gggatccccg ggtgacatt ttaccttt t 31

10 <210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador de P17-3'PacI

<400> 4

ggtaattaa gtctcaaac tctagga 27

<210> 5

<211> 32

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de FatB-hps-5'PstI

<400> 5

25 gggctgcaga aacaagttc ggccaccaac cc 32

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de FatB-hps-3'XhoI

<400> 6
5 cccctcgaga catcagaatt cgtaatgat 29

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador de FatB-hpa-5'NheI

<400> 7
ggggctagca agtttcggcc accaacc 28

15 <210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de FatB-hpa-3'PacI

20 <400> 8
cccttaatta aacatcagaa ttcgtaatga t 31

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
25 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de FatB-Exon-5'Sp-Bam

<400> 9
ccactagtgg atccacctct gctacgtcgt catt 34

30 <210> 10
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
35 <223> Cebador de FatB-Exon-3'Bg-Sal

<400> 10
ggagatctgt cgacgtagt atagcagcaa gaag 34

REIVINDICACIONES

1. Un material vegetal transgénico que comprende una Ln Δ 9D o An Δ 9 desaturasa y un polinucleótido recombinante que es al menos 60% idéntico a SEQ ID NO:1, estando el polinucleótido operablemente unido a un elemento regulador genético y codificando una enzima Δ^9 desaturasa.
- 5 2. Un método para aumentar la cantidad de ácidos grasos inusuales en un material vegetal, comprendiendo el método:
transformar el material vegetal que comprende una Ln Δ 9D o An Δ 9 desaturasa con una molécula de ácido nucleico que comprende un elemento regulador genético y un polinucleótido al menos 60% idéntico a SEQ ID NO:1, codificando el polinucleótido una enzima Δ^9 desaturasa, tal que se aumenta la cantidad de ácidos grasos inusuales en dicha planta.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, que comprende además transformar el material vegetal con moléculas de ácido nucleico adicionales que comprenden un elemento regulador genético y un polinucleótido al menos 60% idéntico a SEQ ID NO:1, en donde el polinucleótido codifica una enzima Δ^9 desaturasa.
- 15 4. El método de la reivindicación 2, en donde el material vegetal se obtiene a partir de una planta que se selecciona de un género que se selecciona del grupo que comprende *Arabidopsis*, *Borago*, *Canola*, *Ricinus*, *Theobroma*, *Zea*, *Gossypium*, *Crambe*, *Cuphea*, *Linum*, *Lesquerella*, *Limnanthes*, *Linola*, *Tropaeolum*, *Oenothera*, *Olea*, *Elaeis*, *Arachis*, colza, *Carthamus*, *Glycine*, *Soja*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Vernonia*, *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, *Avena*, *Sorghum*, *Secale*, u otros miembros de la familia *Gramineae*.
- 20 5. El método de la reivindicación 2, en donde el material vegetal además comprende al menos una mutación en el gen *fab1* o una mutación en el gen *fae1*.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el material vegetal comprende una mutación en el gen *fab1* y una mutación en el gen *fae1*.
7. Un método para crear una planta modificada genéticamente que comprende cantidades aumentadas de ácidos grasos inusuales en la planta en comparación con la planta de tipo salvaje, comprendiendo el método:
25 cultivar el material vegetal transgénico de la reivindicación 1 para obtener una planta.
8. El material vegetal transgénico de la reivindicación 1, en donde la planta se selecciona de un género seleccionado del grupo que comprende *Arabidopsis*, *Borago*, *Canola*, *Ricinus*, *Theobroma*, *Zea*, *Gossypium*, *Crambe*, *Cuphea*, *Linum*, *Lesquerella*, *Limnanthes*, *Linola*, *Tropaeolum*, *Oenothera*, *Olea*, *Elaeis*, *Arachis*, colza, *Carthamus*, *Glycine*, *Soja*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Vernonia*, *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, *Avena*, *Sorghum*, *Secale*, u otros miembros de la familia *Gramineae*.
- 30 9. Una planta que comprende el material vegetal de la reivindicación 1.
10. Una planta que comprende el material vegetal de la reivindicación 8.
11. El material vegetal de la reivindicación 1, en donde el material vegetal es una semilla.

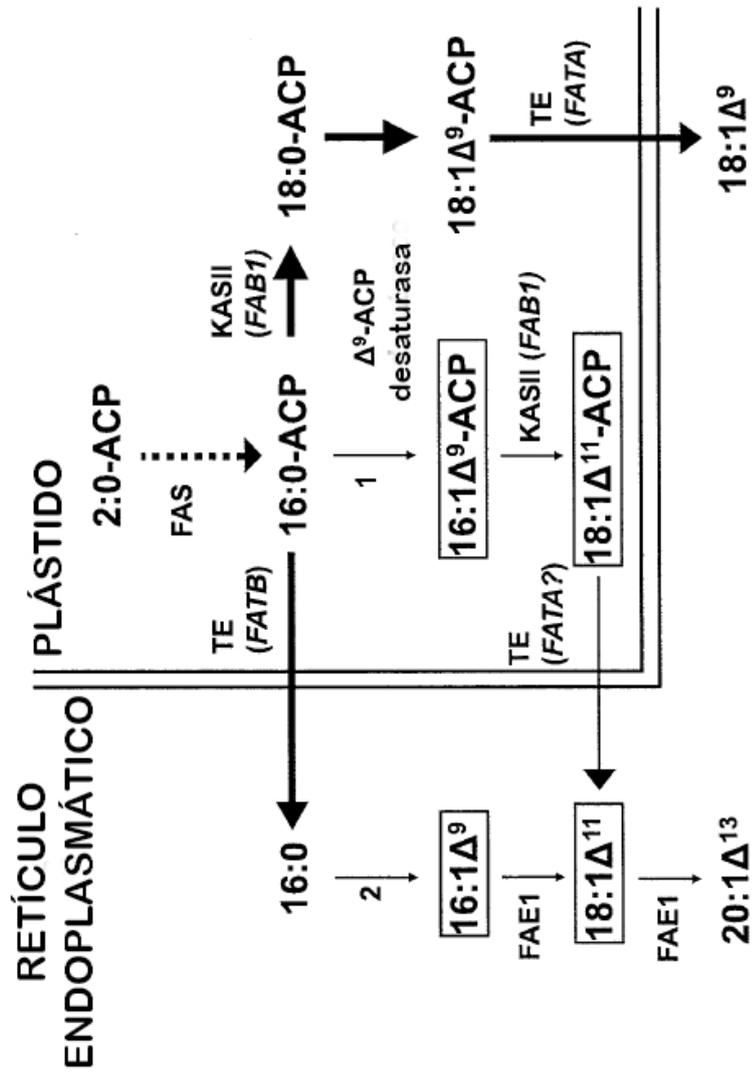


FIG. 1

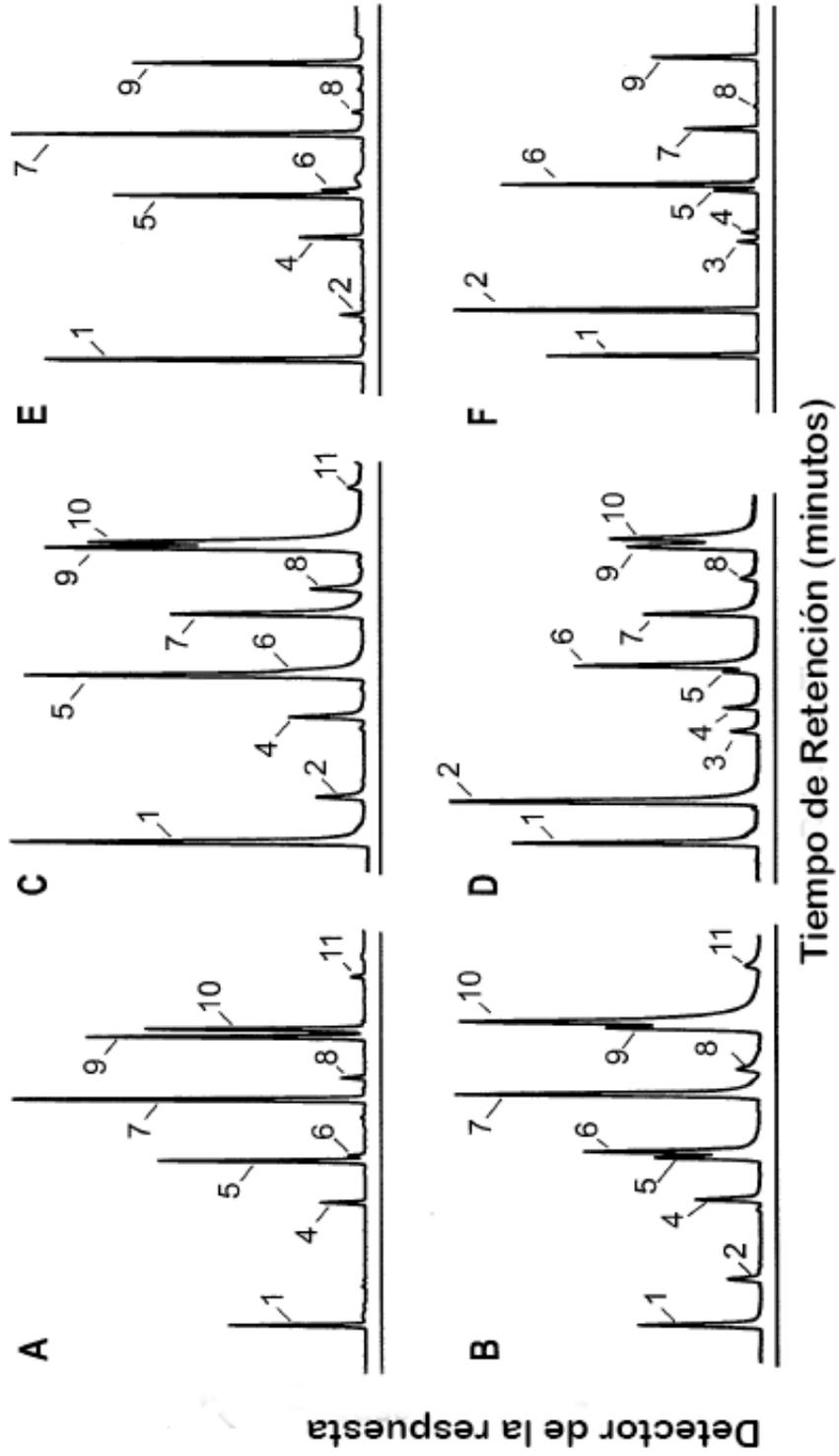


FIG. 2

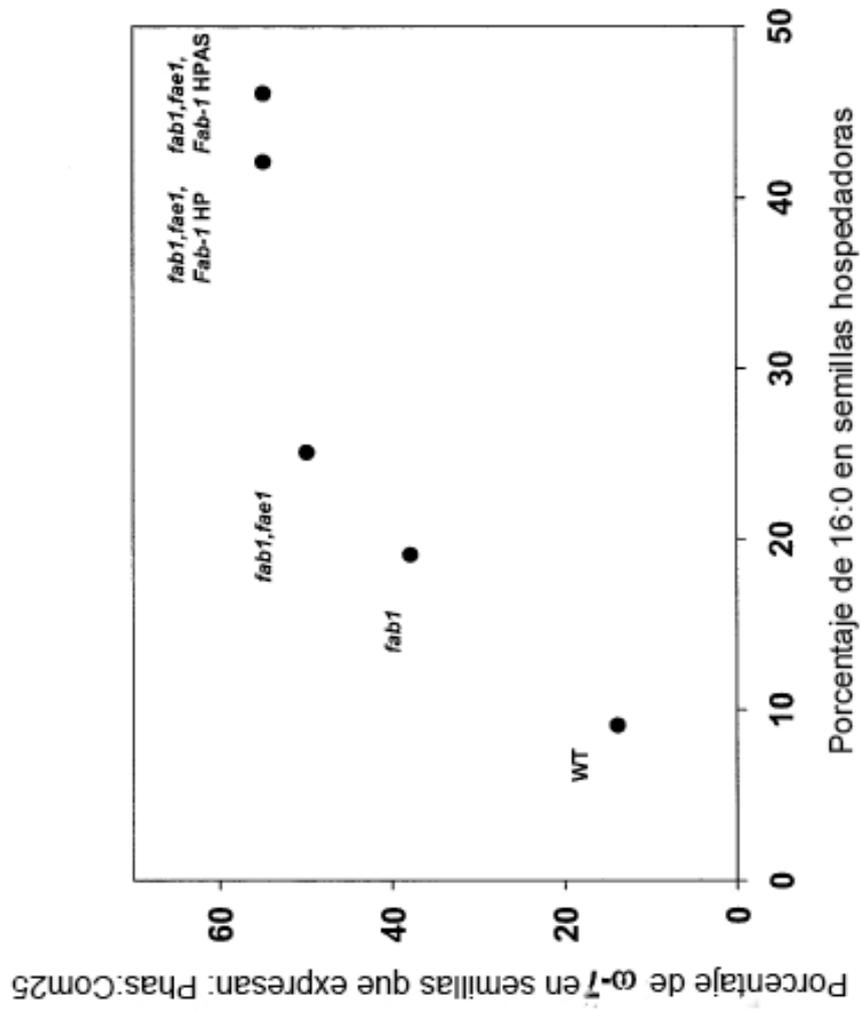
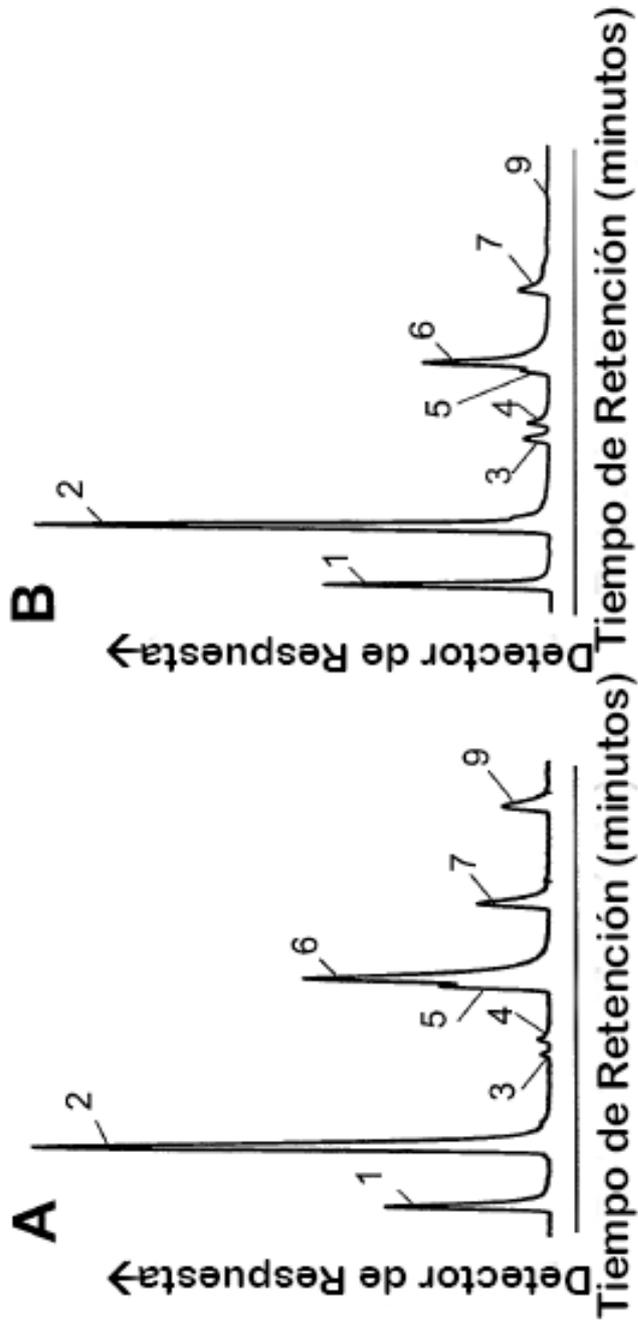


FIG. 3



Fab1, fae1, phas:com25, KasII-HPAS
AnD9DS, LnD9DS

Doxantha

FIG. 4

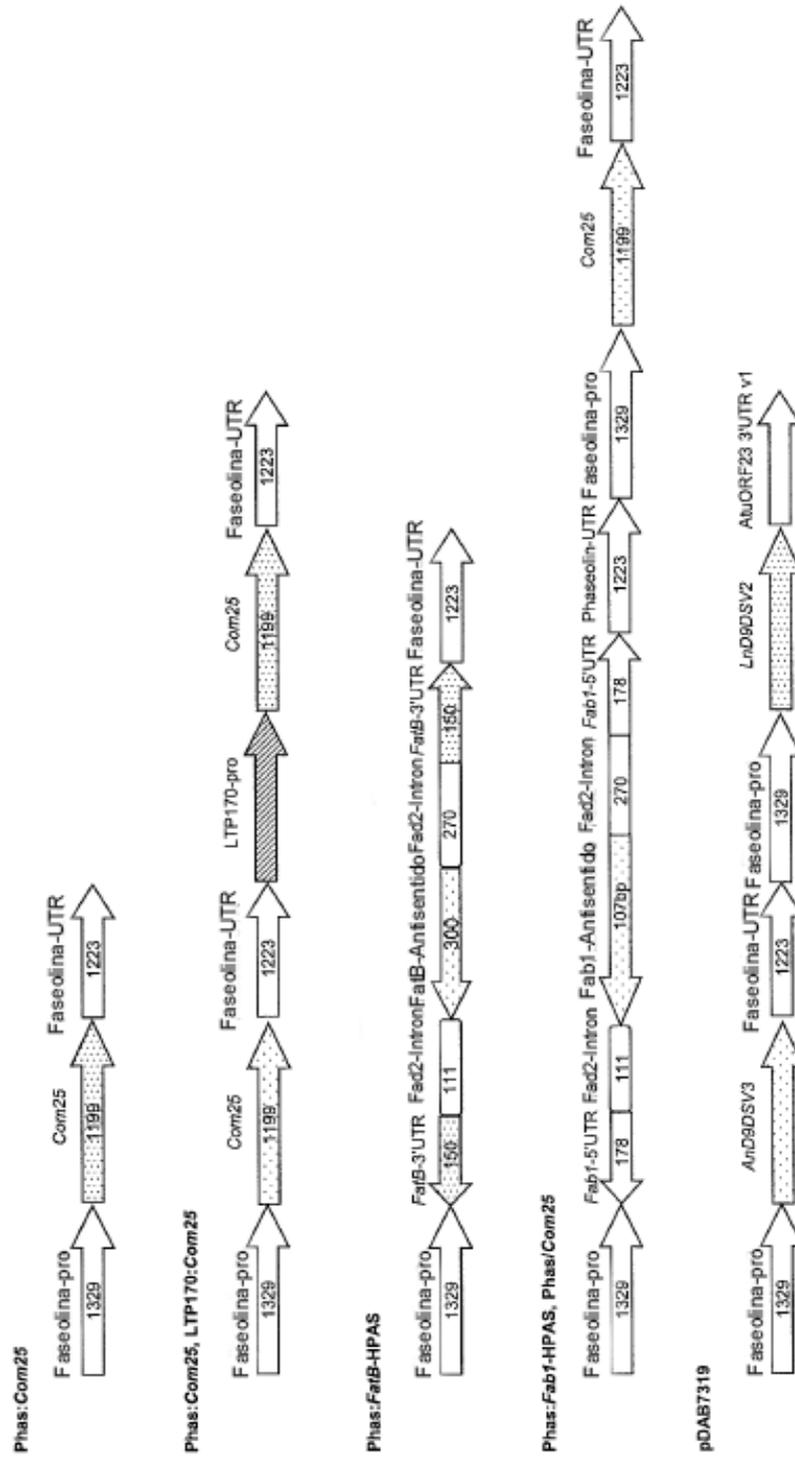


FIG. 5