

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 217**

51 Int. Cl.:

A23K 20/158 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2006 PCT/AU2006/001737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2007 WO07056823**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006 E 06817510 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 1965658**

54 Título: **Piensos para acuicultura que comprenden alimentos que contienen ácido estearidónico para acuicultura**

30 Prioridad:

18.11.2005 US 737946 P

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

07.03.2019

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (100.0%)
Black Mountain Science and Innovation Park,
Clunies Ross Street
Acton ACT 2601, AU**

72 Inventor/es:

**MILLER, MATTHEW, ROBERT;
CARTER, CHRISTOPHER, GUY;
NICHOLS, PETER, DAVID;
SINGH, SURINDER, PAL;
ZHOU, XUE-RONG y
GREEN, ALLAN, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 703 217 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

Piensos para acuicultura que comprenden alimentos que contienen ácido estearidónico para acuicultura

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a alimentos para su uso en acuicultura, así como a métodos para producir dichos alimentos. La invención proporciona métodos para la crianza del salmón.

10 **Antecedentes de la invención**

La producción global de peces y crustáceos en granjas marinas se ha más que duplicado en los últimos 15 años, y su expansión produce una creciente demanda de suministro global de pescado silvestre capturado para proporcionar proteínas y aceites como ingredientes de piensos para acuicultura (Naylor et al., 2000). El suministro de alimento marino procedente de las capturas globales en pesquerías es de unos 100 millones de toneladas al año (FAO, 2001). Esta cantidad no ha aumentado desde mediados de la década de los 80 del siglo pasado y no va a aumentar en el futuro, ya que la mayor parte de las pesquerías están en o por encima de los niveles de producción sostenible, y adicionalmente están sometidas a agudos declives periódicos, debido a factores climáticos tales como El Niño (FAO, 2001; Barlow 2000). También se tiene una demanda creciente de aceite de pescado, no solo de la acuicultura, sino también desde la agricultura y las industrias nutracéutica/biomédica.

La sustitución de aceites para la industria de la acuicultura se ha centrado en varias fuentes vegetales terrestres comerciales incluidas el girasol (Bransden et al, 2003; Bell et al., 1993), canola/colza (Bell et al, 2003; Polvi y Ackman, 1992), oliva, palma (Fonseca-Madrigal et al, 2005; Bell et al, 2002) y linaza (Bell et al., 1993; Bell et al., 2004). La inclusión de aceite vegetal para sustituir todo o parte del aceite de pescado en las dietas de los peces ha dado como resultado las mismas tasas de crecimiento y relaciones de conversión de alimento (Bransden et al., 2003; Polvi y Ackman, 1992; Torstensen et al., 2004; Fonseca-Madrigal et al., 2005; Bell et al., 2002; Bell et al., 2004). Sin embargo, como estos aceites vegetales no tienen prácticamente ácidos grasos poliinsaturados ω 3 de cadena larga (>C20) (ω 3 LC-PUFA) y tienen elevados niveles de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), ω 6 PUFA y bajas relaciones ω 3/ ω 6, los peces alimentados con dichos piensos tienen niveles reducidos de ω 3 LC-PUFA. Se cree que esto está asociado con una reducción en los beneficios para la salud del consumidor en comparación con los peces alimentados con una dieta rica en aceite de pescado que contiene niveles más altos de ω 3 LC-PUFA (Seierstad et al., 2005). Por lo tanto, la crianza de salmón con piensos de alto contenido de aceite vegetal tiene el potencial de diluir los importantes beneficios cardiovasculares y otros beneficios que se asocian con la ingesta de pescado.

35 *Rutas de la síntesis de LC-PUFA*

La biosíntesis de LC-PUFA a partir de ácidos grasos linoleico y α -linolénico en organismos tales como microalgas, musgos y hongos se puede realizar mediante una serie de reacciones de desaturación y elongación alternantes dependientes del oxígeno como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. En una ruta (Figura 1, II), las reacciones de desaturación están catalizadas por Δ 6, Δ 5, y A4 desaturasas, cada una de las cuales añade un doble enlace adicional a la cadena de carbono del ácido graso, mientras que cada reacción de Δ 6 y Δ 5 elongasa añade una unidad de dos átomos de carbono a la cadena. La conversión de ALA en DHA en estos organismos requiere, por tanto, tres desaturaciones y dos elongaciones. Los genes que codifican las enzimas necesarias para la producción de DHA en esta ruta aerobia se han clonado a partir de diferentes microorganismos y plantas inferiores entre las que se incluyen las microalgas, musgos, hongos.

Se ha demostrado que existen rutas alternativas para dos secciones de la ruta ALA en DHA en algunos grupos de organismos. La conversión de ALA en EPA se puede llevar a cabo mediante una combinación de una Δ 9 elongasa y una Δ 8 desaturasa (la denominada ruta de desaturación Δ 8, véase la Figura 1, IV) en algunas protistas y traustóquitridos, como se pone de manifiesto por los aislados de genes que codifican dichas enzimas (Wallis y Browse, 1999; Qi et al., 2002). En mamíferos, la denominada ruta "Sprecher" convierte EPA en DHA según tres reacciones, independientes de una Δ 4 desaturasa (Sprecher et al., 1995).

Además de estos sistemas desaturasa/elongasa, EPA y DHA también se pueden sintetizar mediante una ruta anaerobia en numerosos organismos tales como *Shewanella*, *Mortiella* y *Schizochytrium* (Abbadi et al., 2001). Los operones que codifican estos complejos de enzimas policétido sintasa (PKS) se han clonado desde algunas bacterias (Morita et al., 2000; Metz et al., 2001; Tanaka et al., 1999; Yazawa, 1996; Yu et al., 2000; documento WO 00/42195). El operón EPA PKS aislado de *Shewanella spp* se ha expresado en *Synechococcus* permitiendo que sintetice EPA (Takeyama et al., 1997). Los genes que codifican estas enzimas se disponen en operones relativamente grandes, y no se ha notificado su expresión en plantas transgénicas. Por lo tanto, aún debe verse si un sistema anaerobio análogo a PKS es una alternativa posible a al sistema aerobio más clásico de desaturasa/elongasa para la síntesis transgénica de LC-PUFA.

65 Las rutas biosintéticas de PUFA son bien conocidas (Sargent et al., 2002). Los vertebrados carecen de las desaturasas lipídicas ω 12 y ω 15 (ω 3) y no pueden producir ácido linoleico (18:2 ω 6, LA) y ácido α -linolénico (18:3 ω 3, ALA) a partir

del ácido oleico (18:1 ω 9, ω 6) (véase la Figura 1). La conversión de ALA en el ácido eicosapentanoico (20:5 ω 3, EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6 ω 3, DHA) es ineficaz en peces marinos, que tienen elevados niveles de LC-PUFA en su dieta natural, pero es mayor en los peces de agua dulce, que tienen elevados niveles de LA y ALA y cantidad limitada de DHA en su dieta natural. Los niveles elevados de ω 3 LC-PUFA, que se encuentran en el salmón, no se pueden biosintetizar a partir de ALA y LA y, por tanto, deben proporcionarse a los peces en su dieta.

Desaturasas

Se ha demostrado que todas las enzimas desaturasas que participan en la biosíntesis de LC-PUFA pertenecen al grupo denominado desaturasas "de primera línea" que se caracterizan por la presencia de un dominio de citocromo b₅ en el extremo N de cada proteína. El dominio cyt b₅ actúa presuntamente como el receptor de los electrones necesarios para la desaturación (Sperling y Heinz, 2001). La enzima Δ 6 desaturasa cataliza la desaturación de ácido linoleico (LA) para formar ácido gamma-linoleico (GLA, 18:3 ω 6) y ácido linolénico (ALA) para formar ácido estearidónico (SDA, 18:4 ω 3) (Figura 1). Los genes que codifican esta enzima se han aislado de numerosos organismos, que incluyen plantas, mamíferos, nematodos, hongos, y microalgas marinas. El sustrato ácido graso C18 para las Δ 6 desaturasas de plantas, hongos y microalgas tiene desaturación en al menos las posiciones Δ 9 y Δ 12 y por lo general está unirse covalentemente a un grupo de cabeza de fosfatidilcolina (acil-PC).

La enzima Δ 5 desaturasa cataliza la desaturación del LC-PUFA C20 que conduce al ácido araquidónico (ARA, 20:4 ω 6) y EPA (20:5 ω 3). Los genes que codifican esta enzima se han aislado de numerosos organismos, incluidas algas (*Thraustochytrium* sp. Qiu et al., 2001), hongos (*M. alpine*, *Pythium irregulare*, Michaelson et al., 1998; Hong et al., 2002), *Caenorhabditis elegans* y mamíferos. También se ha identificado un gen que codifica una desaturasa Δ 5/ Δ 6 bifuncional en el pez cebra (Hasting et al., 2001). El que codifica esta enzima podría representar una forma ancestral de la "desaturasa de primera línea" que posteriormente se duplica y evoluciona hacia diferentes funciones.

La última etapa de desaturación para producir DHA se cataliza por una Δ 4 desaturasa y un gen que codifique esta enzima se ha aislado de la especie de protista de agua dulce *Euglena gracilis* y de la especie marina *Thraustochytrium* sp. (Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003).

Elongasas

También se han aislado varios genes que codifican las enzimas de elongación de PUFA (Sayanova and Napier, 2004). Los miembros de esta familia de genes no están relacionados con los genes de elongasa presentes en presente superiores, tales como FAE1 de *Arabidopsis*, que está implicada en la extensión de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Un ejemplo de este último es el ácido erúico (22:1) de Brassicas. En algunas especies de protistas, LC-PUFA se sintetizan mediante la elongación del ácido linoleico o α -linolénico con una unidad C2, antes de la desaturación con la Δ 8 desaturasa (Figura 1 parte IV; ruta "A8-desaturación"). Las actividades Δ 6 desaturasa y Δ 6 no se han detectado en dichas especies. En su lugar, se esperaría una actividad Δ 9-elongasa en dichos organismos, y como respaldo de esto, se ha aislado recientemente un gen de la Δ 9-elongasa C18 a partir de *Isochrysis galbana* (Qi et al., 2002).

Plantas transgénicas

Los cultivos transgénicos de cultivos de oleaginosas que se han genomanipulado para producir LC-PUFA principales mediante la inserción de varios genes que codifican desaturasas y/o elongasas se han sugerido como fuente sostenible de ácidos grasos nutricionalmente importantes. Sin embargo, el requisito de una expresión y actividad coordinadas de cinco nuevas enzimas codificadas por genes de posiblemente fuentes diferentes ha hecho que esta meta sea difícil de conseguir y por lo general se han obtenido rendimientos bajos (revisado por Sayanova y Napier, 2004; Drexler et al., 2003; Abbadi et al., 2001).

Un gen que codifica una Δ 6-ácido graso desaturasa aislada de la borraja (*Borago officinalis*) se expresó en tabaco transgénico y *Arabidopsis*, dando como resultado la producción de GLA (18:3 ω 6) y SDA (18:4 ω 3), los precursores directos de LC-PUFA, en las plantas transgénicas (Sayanova et al., 1997 y 1999). Sin embargo, esto proporciona solamente una primera etapa individual.

Piensos para acuicultura

La investigación en piensos para acuicultura se ha centrado ampliamente en enriquecer las dietas de salmón aumentando el suministro de ALA en la dieta (Bell et al., 1993) y EPA/DHA (Harel et al., 2002; Carter et al., 2003).

Existe necesidad de dietas adicionales para acuicultura que, tras su consumo, mejoren la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga en animales acuáticos.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han determinado que el salmón, que es un *Salmo* sp. o un *Oncorhynchus* sp., se puede

producir con niveles adecuados de LC-PUFA, tales como EPA, DPA y/o DHA, sin necesidad de alimentar estos organismos con dietas que son ricas en LC-PUFA. En particular, el precursor de LC-PUFA, el ácido estearidónico (SDA), se puede proporcionar al salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.* mientras se siguen produciendo peces o crustáceos con niveles deseables de LC-PUFA.

5 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para criar un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, comprendiendo el método alimentar el salmón con un pienso que comprende lípido, comprendiendo el ácido graso de dicho lípido al menos un 5,5 % (p/p) de ácido estearidónico (SDA).

10 En una realización preferida, el lípido comprende un fitoesterol.

En una realización particularmente preferida, al menos 1 % del SDA en el pienso se ha obtenido de una planta. La planta puede ser no transgénica, tal como una *Echium sp.*, *Oenothera biennis*, *Borago officinalis* o *Ribes nigrum*, o transgénica. En una realización, al menos parte del SDA procede de aceite obtenido de semillas de la planta.

15 En una realización preferida, la planta transgénica comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una $\Delta 6$ desaturasa. La planta transgénica puede comprender además un ácido nucleico exógeno que codifica una $\omega 3$ desaturasa o una $\Delta 15$ desaturasa, que aumenta la producción de ALA en la planta. La planta transgénica puede comprender además un ácido nucleico exógeno que codifica una $\Delta 12$ desaturasa. Los ejemplos de plantas transgénicas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, canola, soja, lino, otras plantas oleaginosas, cereales o granos de leguminosas.

20 El salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, se alimenta predominantemente con el pienso durante un periodo de al menos 6 semanas, preferentemente al menos 7 semanas e incluso más preferentemente al menos 12 semanas. En una realización, tras haberse alimentado con el pienso durante al menos 6 semanas, el salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, tiene similar aumento de peso, velocidad de crecimiento específica, aumento de peso, consumo total de alimento, relación de eficacia del alimento, índice hepatosomático y/o supervivencia cuando se compara con la misma especie de salmón alimentada con el mismo pienso pero que carece prácticamente de SDA.

30 El salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, tras haberse alimentado con el pienso durante al menos 6 semanas, tiene niveles de SDA y ETA más altos en el tejido muscular cuando se compara con la misma especie de salmón alimentado con el mismo pienso pero que carece prácticamente de SDA.

35 En una realización adicional, el salmón, tras haberse alimentado con el pienso durante al menos 6 semanas, tiene niveles de SFA en el tejido muscular menores cuando se compara con la misma especie de salmón alimentado con el mismo pienso pero que comprende aceite de pescado en lugar de aceite vegetal, que comprende al menos un 5,5 % de SDA. En realizaciones preferidas, los niveles de 14:0 y 16:0 están reducidos, por ejemplo, en al menos un 10 % o al menos un 20 %.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un pienso para un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, comprendiendo el pienso lípido, comprendiendo el ácido graso de dicho lípido al menos un 11 % (p/p) de ácido estearidónico (SDA, 18:4 $\Delta 6,9,12,15$, $\omega 3$). El pienso puede tener cualquiera de las características descritas en el presente documento en el contexto de los métodos.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, producido utilizando un método de la invención.

50 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, en el que el ácido graso del lípido del músculo blanco de dicho salmón comprende menos del 29,6 % de SFA y al menos un 18,3 % de DHA. En determinadas realizaciones, el lípido del músculo blanco de dicho salmón comprende ácido graso que comprende menos del 28 %, menos del 27 %, o más preferentemente menos del 26 % de SFA. En otras realizaciones, el lípido del músculo blanco de dicho salmón comprende ácido graso que comprende al menos un 19 %, al menos un 20 %, al menos un 21 %, o más preferentemente al menos un 22 % de DHA.

55 En el presente documento se divulga un pez, en el que el ácido graso del lípido del músculo rojo de dicho salmón comprende menos del 28,2 % de SFA y al menos un 9,6 % de DHA. Tal como se divulga en el presente documento, el lípido del músculo rojo del pez puede comprender ácido graso que comprende menos del 27 %, menos del 26 %, o más preferentemente menos del 25 % de SFA. El lípido del músculo del pez puede comprender ácido graso que comprende al menos un 10 %, al menos un 11 %, o más preferentemente al menos un 12 % de DHA.

60 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, en el que el ácido graso del lípido del músculo blanco de dicho salmón comprende al menos un 2,7 % de SDA. En realizaciones de este aspecto, el lípido del músculo blanco de dicho pez o crustáceo comprende al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, o más preferentemente al menos un 4 % de SDA.

65 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*,

en el que el ácido graso del lípido del músculo blanco de dicho salmón comprende al menos un 2,7 % de SDA. En realizaciones de este aspecto, lípido del músculo blanco de dicho salmón comprende al menos un 3 %, o más preferentemente al menos un 3,5 % de SDA.

5 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir un pienso para salmón, que es un *Salmo* sp. o un *Oncorhynchus* sp., de acuerdo con la reivindicación 12. Otros ingredientes pueden incluir vitaminas, minerales, colina, o pigmentos tales como, por ejemplo, carotenoides o rosa carófilo.

Preferentemente, la planta es transgénica.

10 Preferentemente, el aceite se obtiene de la semilla de la planta.

En determinadas realizaciones, se prefiere que el ácido graso del lípido del pienso comprenda al menos un 15 %, al menos un 20 %, o al menos un 30 % (p/p) de SDA.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un pienso para salmón, que es un *Salmo* sp. o un *Oncorhynchus* sp., el método comprende premezclar un organismo transgénico, o extracto o porción del mismo, con al menos otro ingrediente, en el que el organismo está genéticamente modificado de forma que produzca SDA y/o que produzca niveles de SDA más elevados que cuando se compara con un organismo correspondiente silvestre no transgénico. El método puede comprender la etapa de extraer el aceite del organismo, por ejemplo de la semilla de una planta. La extracción puede comprender medios físicos tales como la trituración de la semilla, medios químicos tal como la extracción con un disolvente, calentamiento, u otros procesos, o cualquier combinación de los mismos. El aceite se puede purificar adicionalmente antes de mezclarlo con otros ingredientes. El método incluye preferentemente la preparación de un producto extrudido a partir de los ingredientes mezclados mediante un proceso de extrusión, adecuado para su provisión al salmón, que es un *Salmo* sp. o un *Oncorhynchus* sp., El método puede comprender la etapa de analizar el pienso, tal como por ejemplo medir el nivel de lípido o el nivel de SDA en el ácido graso, u otras mediciones.

Preferentemente, el organismo es una planta o una levadura.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un pienso producido usando un método de la invención. El pienso puede tener las características anteriormente descritas. Otros ingredientes que se pueden incluir en el pienso incluyen harina de pescado, una fuente de alto contenido de proteína que no sea harina de pescado, una fuente de almidón, vitaminas, minerales, pigmentos tales como, por ejemplo, carotenoides o rosa carófilo, o cualquier combinación de los mismos. La harina de pescado es una fuente de proteínas preferidas para los principales peces carnívoros tales como el salmón, trucha, atún, lenguado, barramundi, especialmente para el salmón atlántico. La harina de pescado, normalmente aproximadamente un 65 % de proteínas, se puede añadir en una cantidad de 20 a 700 g por kg de peso seco. Una fuente de alto contenido de proteína que no sea harina de pescado puede ser de origen vegetal o animal tal como, por ejemplo, trigo u otro gluten de cereal, harina de soja, harina de otras legumbres, caseína, concentrados de proteínas, aislados de proteínas, carne, carne y hueso, sangre, alas. Estos suponen al menos un 30 % de proteína y se puede molturar con o sin extracción de aceite. El almidón se puede añadir, normalmente a 10-150 g/kg, y puede estar en la forma de grano o harina de cereal. Para los crustáceos, harina de krill, harina de mejillón u otros componentes similares se pueden añadir a 1-200g/kg, colesterol y/o lecitina a 0-100 g/kg. La mezcla puede comprender un agente de unión tal como alginato de sodio, por ejemplo Manucol de Kelco International.

Adicionalmente, los presentes inventores han descubierto que la expresión de un gen de la $\Delta 6$ desaturasa en una planta productora de fibra da como resultado niveles sorprendentemente elevados de productos PUFA de la $\Delta 6$ desaturasa.

50 Como será evidente, los rasgos y características preferidas de un aspecto de la invención pueden ser aplicables a muchos aspectos diferentes de la invención.

En la totalidad de la presente memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un elemento, entero o etapa o grupo de elementos, enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa o grupo de elementos, enteros o etapas.

La invención se va a describir a partir de ahora en el presente documento mediante los siguientes Ejemplos no limitativos, y con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

65 **Figura 1.** Posibles rutas para la síntesis de LC-PUFA $\omega 3$ y $\omega 6$. Los sectores mercados I, II, III, y IV corresponden a las rutas $\omega 6$ ($\Delta 6$), $\omega 3$ ($\Delta 6$), $\omega 6$ ($\Delta 8$), y $\omega 3(\Delta 8)$, respectivamente. Los compuestos de los sectores I y III son compuestos $\omega 6$, mientras que los de los sectores II y IV son compuestos $\omega 3$. "Des" se refiere a las etapas de desaturasa en la ruta catalizada por desaturasas como se indica, mientras que "Elo" se refiere a las etapas de la

elongasa catalizadas por elongasas como se indica. La flecha gruesa indica le etapa de la Δ5 elongasa. Las flechas discontinuas indican las etapas de la ruta "Sprecher" que funciona en células de mamíferos para la producción de DFIA a partir de DPA.

5 **Figura 2.** Representación esquemática (no parte de la invención) de la construcción, pVLin-Ed6, usada para transformar lino. RB, borde derecho del ADN-T; FIPT+Cat-1, gen de resistencia a la higromicina interrumpido por el intrón Cat-1; 35SP, Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; LinT, Terminador de linina; ED6, secuencia de codificación de longitud completa de la Δ6 ácido graso desaturasa de *Echium*; LinP, Promotor de linina; LB, borde izquierdo del ADN-T. P, *Psfl*; A, *Apal*; X, *XhoI*; N, *NotI*.

10

Clave del listado de secuencia

SEQ ID NO:1 - Δ6 desaturasa de seres humanos (N.º de Registro Genbank: AAD20018).
 SEQ ID NO:2 - Δ6 desaturasa de ratón (N.º de Registro Genbank: NP_062673).
 15 SEQ ID NO:3 - Δ6 desaturasa de *Pythium irregulare* (N.º de Registro Genbank: AAL13310).
 SEQ ID NO:4 - Δ6 desaturasa de *Borago officinalis* (N.º de Registro Genbank: AAD01410).
 SEQ ID NO:5 - Δ6 desaturasa de *Anemone leveillei* (N.º de Registro Genbank: AAQ10731).
 SEQ ID NO:6 - Δ6 desaturasa de *Ceratodon purpureus* (N.º de Registro Genbank: CAB94993).
 20 SEQ ID NO:7 - Δ6 desaturasa de *Physcomitrella patens* (N.º de Registro Genbank: CAA11033).
 SEQ ID NO:8 - Δ6 desaturasa de *Mortierella alpina* (N.º de Registro Genbank: BAC82361).
 SEQ ID NO:9 - Δ6 desaturasa de *Caenorhabditis elegans* (N.º de Registro Genbank: AAC15586).
 SEQ ID NO: 10 - Δ6 desaturasa de *Echium plantagineum*.
 SEQ ID NO:11 - Δ6 desaturasa de *Echium gentianoides* (N.º de Registro Genbank: AY055117).
 SEQ ID NO: 12 - Δ6 desaturasa de *Echium pitardii* (N.º de Registro Genbank: AY055118).
 25 SEQ ID NO: 13 - Δ5/Δ6 desaturasa bifuncional de *Danio rerio* (pez cebra).
 SEQ ID NO 14 a 16 - Motivos conservados de *Echium sp.* Δ6 desaturasas.
 SEQ ID NOs 17 a 22, 30 y 31 - Cebadores de oligonucleótidos.
 SEQ ID NO:23 - Promotor de linina de *Linum usitatissimum*.
 SEQ ID NO:24 - Terminador de linina de *Linum usitatissimum*.
 30 SEQ ID NO:25 - Secuencia de ADNc que codifica la Δ6 desaturasa de *Echium plantagineum*.
 SEQ ID NO:26 - Δ15 desaturasa de *Perilla frutescens* (N.º de Registro Genbank: AF213482).
 SEQ ID NO:27 - Δ15 desaturasa de *Brassica napus* (N.º de Registro Genbank: L01418).
 SEQ ID NO:28 - Δ15 desaturasa de *Betula pendula* (N.º de Registro Genbank: AAN17504).
 SEQ ID NO:29 - Δ15 desaturasa de *Arabidopsis thaliana* (N.º de Registro Genbank:AAC31854).

35

Descripción detallada de la invención

Técnicas y definiciones generales

40 Salvo que se defina específicamente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica (por ejemplo, en cultivo de células, biología vegetal, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, síntesis de ácidos grasos, química de proteínas, y bioquímica).

45 Salvo que se indique otra cosa, la proteína recombinante, los cultivos celulares, y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos de los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen y explican a lo largo de la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editores), ADN Cloning: A Practical Approach, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluidas todas las actualizaciones hasta la el presente), Ed Harlow and David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

55

Tal como se usa en el presente documento, el término "lípid" se refiere generalmente a una molécula orgánica, que contiene normalmente cadena(s) de hidrocarburo, que son insolubles en agua pero que se disuelven fácilmente en disolventes orgánicos no polares. Los piensos de la invención se definen en el presente documento con respecto a la composición de su componente lipídico. Este componente lipídico incluye ácidos grasos (tanto libres como esterificados, por ejemplo, en la forma de triacilgliceroles), esteroides y lípidos polares.

60

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácidos grasos" se refiere a un grupo grande de ácidos orgánicos constituido por moléculas que contienen un grupo carboxilo en el extremo de una cadena de hidrocarburo; el contenido de carbono puede variar desde C2 a C34. Los ácidos grasos pueden ser saturados (no contienen dobles enlaces en la cadena de carbono) (SFA), monoinsaturados (contienen un único enlace doble en la cadena de carbono) (MUFA),

65

o poliinsaturados (contienen dos, tres, cuatro o más dobles enlaces en la cadena de carbono) (PUFA). Salvo que se indique otra cosa, los ácidos grasos pueden estar en un estado libre (no esterificado) o en una forma esterificada tal como parte de un triacilglicerol, diacilglicérido, monoacilglicérido, acil-CoA unido u otra forma unida, o mezclas de los mismos. El ácido graso puede estar esterificado como un fosfolípido tal como las formas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o fosfatidilglicerol.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido graso poliinsaturado de cadena larga", "LC-PUFA" o "ácido graso poliinsaturado + C20" se refiere a un ácido graso que comprende al menos 20 átomos de carbono en su cadena de carbono y al menos tres dobles enlaces carbono-carbono. Generalmente, el número de átomos de carbono en la cadena de carbono de los ácidos grasos se refiere a una cadena de carbono. Si la cadena de carbono está ramificada, el número de átomos excluye aquellos en los grupos laterales. En general, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga es un ácido graso ω 3, es decir, que tiene una desaturación (doble enlace carbono-carbono) en el tercer enlace carbono-carbono desde el extremo metilo del ácido graso. Preferentemente, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona entre el grupo que consiste en; ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4 Δ 8,11,14,17, ω 3) ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 Δ 5,8,11,14,17; ω 3), ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 Δ 7,10,13,16,19, ω 3), o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 Δ 4,7,10,13,16,19, ω 3). Será fácilmente evidente que el LC-PUFA que está en (o limitado en cantidad o incluso excluido de) un pienso de la invención, o producido por un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, alimentado con un pienso de la invención, puede ser una mezcla de cualquiera o todos los anteriores y puede incluir otro LC-PUFA o los derivados de cualquiera de este LC-PUFA.

El uso del término "pez" incluye todos los peces vertebrados, que puede ser un pez óseo o cartilaginoso.

Tal como se usa en el presente documento, el término salmón se refiere a *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.* Más preferentemente, el salmón es un *Salmo sp.* Incluso más preferentemente, el salmón es salmón atlántico (*Salmo salar*).

En una realización, el salmón, el salmón está en una etapa "larval" o "juvenil". El desarrollo de un pez reconoce 5 periodos que se producen en el siguiente orden: periodo embrionario; periodo larval; periodo juvenil; periodo adulto; periodo senescente. El periodo larval se produce una vez que el embrión ha eclosionado y tiene la capacidad de alimentarse independientemente de la yema de huevo (o de la madre en casos raros), los sistemas de órganos se desarrollan morfológicamente y alcanzan la función fisiológica. El periodo juvenil es cuando todos los sistemas de órganos se han formado completamente y son funcionales (salvo las gónadas) y el pez tiene el aspecto de adultos en miniatura, el periodo dura hasta que las gónadas maduran. Una vez que las gónadas maduran, el pez alcanza el periodo adulto, y a continuación la senescencia cuando cesa el crecimiento y las gónadas no producen gametos (Adaptado de Moyle, P.B. y Cech, J.J. 2004. *Fishes An Introduction to Ichthyology*, 5ª Edición, Prentice Hall).

El "crustáceo" puede ser cualquier organismo del subfilum "Crustacea", y por tanto, el crustáceo puede obtenerse de fuentes marinas y/o de fuentes de agua dulce. Dichos Crustacea incluyen, aunque no de forma limitativa, organismos tales como el krill, lapas, camarones (incluyendo langostinos), cangrejos, y langostas.

40 Piensos

Para los fines de la presente invención, "piensos" incluye cualquier alimento o preparación, para su consumo por un salmón, que es *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*

La presente invención proporciona un pienso que comprende un lípido, comprendiendo el ácido graso de dicho lípido al menos un 11 % (p/p) de ácido estearidónico (SDA). La invención proporciona también métodos para usar dicho pienso para criar un salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*

En realizaciones de la invención, el ácido graso de dicho lípido comprende al menos un 11,0 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, o al menos un 30 % (p/p) de SDA.

En realizaciones adicionales, el ácido graso de dicho lípido comprende menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, o más preferentemente menos del 8 % (p/p) de ácidos grasos saturados totales (SFA). En particular, el pienso comprende niveles reducidos de 14:0 y/o 16:0 en comparación con el pienso correspondiente preparado con aceite de pescado en lugar de con aceite vegetal que comprende al menos 11 % de SDA.

Aunque el nivel de SDA que puede producirse en el aceite de semillas de plantas transgénicas puede tener más del 40 % del ácido graso, la invención puede llevarse a cabo con aceite vegetal que tiene menos SDA, tal como, por ejemplo, al menos 5,5 % de SDA. Es decir, no todo el ALA se convierte en SDA en la planta, y el aceite puede contener SDA y ALA. Por lo tanto, en otras realizaciones adicionales, el ácido graso de dicho lípido comprende al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 16 %, al menos un 17 %, al menos un 18 %, o al menos un 19 % (p/p) de ácido α -linolénico (ALA 18:3 Δ 9,12,15, ω 3). En una realización, el nivel de ALA está en el intervalo de 10-45 % (p/p).

Preferentemente, el lípido del pienso comprende fitosterol, que puede proporcionar un beneficio adicional. En realizaciones de la invención, el lípido comprende al menos 0,025 %, al menos un 0,05 %, o al menos 0,1 % (p/p) de

fitosterol. Puede comprender al menos 0,2 % de fitosterol, normalmente, en el intervalo de 0,2-0,8 (p/p) de fitosterol. El fitosterol puede ser cualquier esteroide de origen vegetal procedente de plantas tales como aunque no de forma limitativa, *Echium sp.*, canola, soja, lino, cereal o granos de leguminosas. Los ejemplos de fitosteroides incluyen, aunque no de forma limitativa, brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol o cualquier combinación de estos.

5 En una realización adicional, el lípido está sustancialmente exento de colesterol, que puede ser ventajoso para limitar el nivel de colesterol en el pescado o crustáceo que se produce, en particular para el pescado. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "prácticamente exento de colesterol" se refiere al lípido que comprende menos de 0,1 % (p/p) de colesterol, preferentemente a un nivel indetectable. Normalmente, el lípido obtenido de las plantas está
10 prácticamente exento de colesterol.

En otras realizaciones, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 % o al menos un 90 % del SDA se esterifica en la forma de triacilglicerol.

15 En otras realizaciones adicionales, el contenido de lípidos del pienso tiene al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 200, o al menos 250 g/kg de materia seca. En otra realización, el contenido de lípido del pienso no es más de 350 g/kg de materia seca o cualquier intervalo entre estas cifras.

20 En otras realizaciones, el pienso comprende al menos 0,55, al menos 1, al menos 2,5, al menos 5, al menos 7,2, al menos 10, al menos 12,5, o más preferentemente al menos 14,3 g/kg de materia seca de SDA.

En otra realización preferida más, los ácidos grasos del contenido lipídico del pienso comprenden menos de 2 % de ERPA y/o DHA, más preferentemente menos de 1 % de EPA y/o DHA.

25 El SDA puede ser de cualquier fuente. En una realización preferida, el SDA se proporciona en la forma de un organismo transgénico, o extracto o porción del mismo, en el que el organismo está genéticamente modificado de tal manera que produce SDA y/o produce mayores niveles de SDA que cuando se compara con un organismo natural. Preferentemente, el organismo transgénico es una planta o levadura. En una realización particularmente preferida, el SDA se proporciona en la forma de aceite extraído de una planta, especialmente una planta transgénica. Normalmente,
30 dicho aceite se extrae de la semilla de la planta. Sin embargo, en algunas realizaciones, el SDA puede obtenerse de un organismo no transgénico que produce naturalmente SDA. por ejemplo, *Echium plantagineum*.

El salmón, que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, se puede alimentar con los piensos de la presente invención en cualquier manera y cantidad, y de acuerdo con cualquier programa de alimentación empleado en el salmón, que
35 es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, de cultivo. Las tasas de alimentación varían normalmente de acuerdo con factores abióticos, principalmente estacionales tales como la temperatura, y bióticos, en particular el tamaño del animal. Los peces juveniles se alimentan normalmente con 5-10 % de su peso corporal por día durante aproximadamente 4-6 tomas de alimento por día. Los peces más grandes se alimentan normalmente con 2-5 % de su peso corporal por día durante aproximadamente 1-2 tomas de alimento por día. El salmón puede dejarse alimentar
40 según el apetito.

Preferentemente, el salmón se alimenta al menos una vez por día, más preferentemente dos o más veces por día, tal como, por ejemplo, 2-6 o 4-6 veces por día. Se prefiere eliminar cualquier exceso de alimento tras el periodo de
45 alimentación, por ejemplo, mediante el lavado de un sistema de canalización, o mediante la retirada de la parte inferior de la jaula marina flotante.

Los beneficios aumentan cuando el salmón se alimenta durante largos periodos de tiempo, por ejemplo, durante al menos 6, 7 o 12 semanas. Se pueden usar también piensos diferentes de los descritos en el presente documento en
50 el periodo de tiempo, sin embargo se prefiere que el pienso de la invención se utilice predominantemente durante el periodo de tiempo incluso exclusivamente.

Tal como se usa en el presente documento, "predominantemente" significa al menos el 50 % del tiempo, en ocasiones o en cantidad, según determine el contexto.

55 Es preferible que el salmón se alimente del SDA que contienen los piensos como mezcla con otros ingredientes bien conocidos incluidos en las formulaciones comerciales de alimento para salmones de tal manera que proporcione un alimento completo nutricionalmente equilibrado, que incluye, aunque no de forma limitativa, materia vegetal, por ejemplo, harina, grano molido grueso, almidón o grano agrietado o procesado producido a partir de un cultivo vegetal tal como trigo u otros cereales, alfalfa, maíz, avena, patata, arroz, sojas u otras legumbres; celulosa en una forma que
60 pueda obtenerse de la pulpa de madera, pastos, hojas de plantas, y materia residual vegetal tal como cáscaras de arroz o soja, o panochas de maíz; materia animal, por ejemplo, harina de pescado o crustáceos, aceite, proteínas o materiales solubles y extractos, krill, harina de carne, harina de huesos, harina de plumas, harina de sangre, o chicharrones; materia de algas; levaduras; bacterias; vitaminas, minerales, y aminoácidos; aglutinantes orgánicos o adhesivos; y agentes quelantes y conservantes. Se notifica una amplia variedad de formulaciones en la bibliografía de patentes y científica. Como alternativa, se usa SDA para suplementar otros alimentos, por ejemplo, piensos
65 comerciales para salmones.

En una realización, el pienso comprende harina de pescado (que puede estar o no desgrasada), pero no comprende, como ingrediente separado, aceite de pescado. Como alternativa, el pienso puede comprender algo de aceite de pescado como un ingrediente separado añadido. Sin embargo, el nivel mínimo de SDA en el ácido graso del lípido total del pienso debe seguir siendo de al menos un 5,5 %.

En los piensos a escala comercial puede proporcionarse de forma conveniente en la forma de en la forma de gránulos de alimento presionados o extrudidos.

Los componentes utilizados en las composiciones de piensos de la presente invención pueden ser de origen semipurificado o purificado. Por semipurificado o purificado se entiende un material que se ha preparado mediante purificación de un material natural o mediante síntesis *de novo*.

Con respecto a las vitaminas y minerales, lo siguiente puede añadirse a las composiciones de piensos de la presente invención: calcio fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yodo, y Vitaminas A, E, D, C, y el complejo B. Los ejemplos de estos incluyen Stay C, que es un producto comercial de vitamina C estabilizada, fosfato trisódico o Banox E, que es un antioxidante. Se pueden añadir también otras de las mencionadas vitaminas y minerales.

20 Desaturasas

Los organismos útiles para producir piensos de la invención comprenden normalmente un gen que codifica una $\Delta 6$ desaturasa, que puede ser un transgén o un gen endógeno. Tal como se usa en el presente documento, una " $\Delta 6$ desaturasa" es al menos capaz de convertir ALA en SDA, y/o ácido linoleico (LA, 18:2 Δ 9,12; ω 6) en ácido γ -linoleico (GLA, 18:2 Δ 6,9,12; ω 6). Los ejemplos de $\Delta 6$ desaturasas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, las que comprenden (i) una secuencia de aminoácidos como la proporcionada como la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % idéntica a una cualquiera de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la $\Delta 6$ desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a una cualquiera de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEC ID N°:11 o SEC ID N°:12. En una realización adicional, la $\Delta 6$ desaturasa se codifica mediante una región codificante de proteína de uno de los gen de la $\Delta 6$ desaturasa relacionados en la Tabla 1 o un gen idéntico en al menos un 75 % al mismo.

La $\Delta 6$ desaturasa puede tener también otras actividades tales como actividad $\Delta 5$ desaturasa. Dichas enzimas se conocen en la técnica como una "desaturasa $\Delta 5/\Delta 6$ bifuncional" o una " $\Delta 5/\Delta 6$ desaturasa". Estas enzimas son al menos capaces de i) convertir ALA en SDA, y ii) convertir ácido eicosatetraenoico en ácido eicosapentanoico. Se ha identificado un gen que codifica una desaturasa $\Delta 5/\Delta 6$ bifuncional en el pez cebra (Hasting et al., 2001). El que codifica esta enzima podría representar una forma ancestral de la "desaturasa de primera línea" que posteriormente se duplica y las copias evoluciones hacia diferentes funciones de $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa. En una realización, la desaturasa $\Delta 5/\Delta 6$ bifuncional se produce de forma natural en especies de peces de agua dulce. En una realización particular, la desaturasa $\Delta 5/\Delta 6$ bifuncional comprende

- i) una secuencia de aminoácidos como se proporciona en la SEQ ID NO: 13,
- ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:13, o
- iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii).

50

Tabla 1. Ejemplos de $\Delta 6$ desaturasas de diferentes fuentes.

Tipo de organismo	Especie	Números de registro	Tamaño de proteína (aa)	Referencias
Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	NM_013402	444	Cho et al., 1999; Leonard et al., 2000
	<i>Mus musculus</i>	NM_019699	444	Cho et al., 1999
Nematodo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z70271	443	Napier et al., 1998
Plantas	<i>Borago officinalis</i>	U79010	448	Sayanova et al., 1997
	<i>Echium</i>	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
	<i>Primula vialii</i>	A Y234127	453	Sayanova et al., 2003
	<i>Anemone leveillei</i>	AF536525	446	Whitney et al., 2003
Musgos	<i>Ceratodon purpureus</i>	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
	<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
	<i>Physcomitrella patens</i>			Girke et al., 1998

Hongos	<i>Mortierella alpina</i>	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
	<i>Pythium irregulare</i>	AF419296	459	Hong et al., 2002
	<i>Mucor circinelloides</i>	AB052086	467	
	<i>Rhizopus sp.</i>	AY320288	458	Zhang et al., 2004
	<i>Saprolegnia diclina</i>		453	W002081668
Diatomea	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	AY082393	477	Domergue et al., 2002
Bacteria	<i>Synechocystis</i>	L11421	359	Reddy et al., 1993
Algas	<i>Thraustochytrium aureum</i>		456	W002081668
Pez	<i>Danio rerio</i>	AF309556	444	Hastings et al., 2001

Los organismos útiles para producir piensos de la invención comprenden generalmente un gen que codifica una "ω3 desaturasa", que puede ser un transgén o un gen endógeno. Tal como se usa en el presente documento, una "ω3 desaturasa" es al menos capaz de convertir LA en ALA y/o GLA en SDA y por tanto son capaces de introducir una desaturación en el tercer enlace carbono-carbono desde el extremo ω del sustrato de acilo. Dichas desaturasas también se pueden conocer en la materia como Δ15 desaturasas cuando están activas en un sustrato C18, por ejemplo 18:2 (LA), introduciendo una desaturación en el decimoquinto enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo (Δ) de la cadena de acilo. Los ejemplos de ω3 desaturasa incluyen los descritos en Pereira et al. (2004), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) y Spsychalla et al. (1997) o los relacionados en la Tabla 2. Los ejemplos de Δ15 desaturasas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, las que comprenden (i) una secuencia de aminoácidos como la proporcionada en la SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29, (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % idéntica a una cualquiera de la SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29, o (iii) un fragmento biológicamente activo de i) o ii). En una realización adicional, la Δ15 desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a una cualquiera de la SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEC ID N°:28 o SEC ID N°:29. En una realización adicional, la Δ15 desaturasa tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con un N.º de registro relacionado en la Tabla 2, o está codificada mediante una región codificante de proteína de uno de los gen de la Δ15 desaturasa relacionados en la Tabla 2, o una proteína o gen al menos un 75 % idéntico al mismo.

Tabla 2. Ejemplos de ω3/Δ15 desaturasas.

Tipo de organismo	Especie	Números de registro	Tamaño de proteína	Referencias
Planta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP 850139.1	288	NCBI
		A Y096462.	386	NCBI
		AAL77744	435	NCBI
	<i>Brassica napus</i>	P48642	383	Arondel et al., 1992
		AY599884	383	NCBI
		JQ2337	377	NCBI
		AAT65204	378	NCBI
	<i>Brassica rapa subsp. oleifera</i>	AAL08867	302	Tanhuanpaa et al., 2002
	<i>Glycine max</i>	BAB18135	380	NCBI
		AAO24263	376	Bilveu et al., 2003
		P48621	453	Yadav et al., 1993
	<i>Linum usitatissimum</i>	ABA02173	391	Vrinten et al., 2005
		ABA02172	392	Vrinten et al., 2005
	<i>Betula pendula</i>	AAN17504	386	NCBI
	<i>Perilla frutescens</i>	AAD15744	391	Chung et al., 1999
		AAL36934	390	NCBI
		AAB39387	438	NCBI
	<i>Pelargonium x hortorum</i>	AAC16443	407	NCBI
	<i>Malus x domestica</i>	AAS59833	439	NCBI
	<i>Vernicia fordii</i>	CAB45155	387	NCBI
		AAD13527	437	Tang et al., 1999
	<i>Vigna radiata</i>	P32291	380	Yamamoto et al., 1992
	<i>Prunus persica</i>	AAM77643	449	NCBI
	<i>Brassica juncea</i>	CAB85467	429	NCBI
	<i>Nicotiana tabacum</i>	P48626	379	Hamada et al., 1994
		BAA11475	441	Hamada et al., 1996
	<i>Betula pendula</i>	AAN17503	444	NCBI
	<i>Zea mays</i>	BAA22442	398	Berberich et al., 1998
		BAA22441	443	Berberich et al., 1998
	<i>Petroselinum crispum</i>	AAB72241	438	Kirsch et al., 1997
	<i>Sesamum indicum</i>	P48620	447	NCBI
	<i>Helianthus annuus</i>	AAP78965	443	NCBI

	<i>Capsicum annuum</i>	AAF27933	438	NCBI
	<i>Ricinus communis</i>	P48619	460	Van de Loo et al., 1994
	<i>Sorghum bicolor</i>	AAT72937	389	Yang et al., 2004
	<i>Oryza sativa</i>	XP 479619	387	NCBI
	<i>Solanum tuberosum</i>	CAA07638	431	NCBI
	<i>Solanum lycopersicum</i>	AAP82169	435	Li et al., 2003
	<i>Triticum aestivum</i>	BAA28358	383	Horiguchi et al., 1998
Algas	<i>Chlorella vulgaris</i>	BAB78717	418	Suga et al., 2002
	<i>Synechococcus sp</i>	AAB61352	350	Sakamoto et al., 1997
	<i>Dunaliella salina</i>	AAD48897	196	NCBI
Hongos	<i>Saprolegnia diclina</i>	AAR20444	358	Pereira et al., 2004
NCBI indica secuencias disponibles en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/				

El % de identidad de un polipéptido se determina mediante un análisis GAP (Needleman and Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización por creación de hueco = 5, y una penalización por extensión de hueco = 0,3. A menos que se indique otra cosa, la secuencia de interrogación tiene al menos 15 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 15 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de interrogación tiene al menos 50 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de interrogación tiene al menos 100 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 nucleótidos. Incluso más preferentemente, la secuencia de interrogación y una secuencia definida en el presente documento están alineadas en la totalidad de su longitud.

El término "polipéptido" se utiliza indistintamente en el presente documento con los términos "proteína" y "enzima".

Con respecto a los polipéptidos/enzimas definidos, se apreciará que cifras de % de identidad superiores a las anteriormente citadas abarcarán las realizaciones preferidas. Por lo tanto, cuando sea aplicable, a la luz de las cifras de % de identidad mínimo, se prefiere que el polipéptido comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 65 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 76 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 91 %, más preferentemente al menos un 92 %, más preferentemente al menos un 93 %, más preferentemente al menos un 94 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 96 %, más preferentemente al menos un 97 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 %, más preferentemente al menos un 99,1 %, más preferentemente al menos un 99,2 %, más preferentemente al menos un 99,3 %, más preferentemente al menos un 99,4 %, más preferentemente al menos un 99,5 %, más preferentemente al menos un 99,6 %, más preferentemente al menos un 99,7 %, más preferentemente al menos un 99,8 %, e incluso más preferentemente sea al menos un 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO relevante citada.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento biológicamente activo" se refiere a una parte del polipéptido/enzima definido que sigue manteniendo actividad desaturasa. Dichos fragmentos biológicamente activos se pueden determinar fácilmente mediante delecciones en serie de la proteína de longitud completa y analizando la actividad del fragmento resultante.

Células

Las células adecuadas para su uso en los piensos de la invención, o que se pueden usar para producir SDA para los piensos de la invención, incluyen cualquier célula que contenga SDA o que se pueda transformar con un polinucleótido que codifica un polipéptido/enzima descrito en el presente documento, y que es por tanto capaz de utilizarse para producir SDA. Las células hospedadoras en las que se introduce(n) el(los) nucleótido(s) pueden ser tanto células sin transformar como células que se han transformado ya con al menos una molécula de ácido nucleico. Dicha molécula de ácido nucleico puede estar relacionada con la síntesis de SDA, o no estar relacionada. Las células hospedadoras pueden ser capaces tanto de producir proteínas de forma endógena (es decir, de forma natural) o de producir dichas proteínas solo después de transformarse con al menos una molécula de ácido nucleico.

Las células pueden ser procariotas o eucariotas. Las células hospedadoras pueden ser cualquier célula capaz de producir SDA, e incluyen hongos (incluyendo levaduras), parásitos, artrópodos, células animales y vegetales. Las células hospedadoras preferidas son células de levaduras y vegetales. En una realización preferida, las células vegetales son células de semillas.

En una realización, la célula es una célula animal o una célula de alga. La célula animal puede ser de cualquier tipo de animal tal como, por ejemplo, una célula animal no humana, una célula de vertebrado no humana, una célula de mamífero no humana, o células de animales acuáticos tales como de peces o crustáceos, invertebrados, insectos, etc.

Las células pueden ser de un organismo adecuado para la fermentación. Las células fermentadoras adecuadas,

normalmente microorganismos, son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Los ejemplos de microorganismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como levaduras. Tal como se usa en el presente documento, "levadura" incluye *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Candida* spp., *Kluveromyces* spp., *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Trichoderma* spp., *Lipomyces starkey*, y *Yarrowia lipolytica*.

Construcciones y vectores génicos

Los organismos transgénicos, y/o células hospedadoras, que producen SDA, se transforman normalmente con un vector recombinante. El vector puede ser tanto ARN como ADN, ya sea procariota o eucariota, y normalmente es un virus o un plásmido.

Un tipo de vector recombinante comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima útil para los fines de la invención (tal como un polinucleótido que codifica una $\Delta 6$ desaturasa o $\omega 3$ desaturasa) unida operativamente a un vector de expresión. Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión unido operativamente se refiere a la inserción de una molécula de ácido nucleico en un vector de expresión de una manera tal que la molécula pueda expresarse cuando se transforma en una célula hospedadora. Tal como se usa en el presente documento, un vector de expresión es un vector de ADN o ARN que es capaz de transformar una célula hospedadora y efectuar la expresión de una molécula de ácido nucleico deseada. Preferentemente, el vector de expresión es también capaz de replicarse en la célula hospedadora. Los vectores de expresión pueden ser tanto procariotas como eucariotas, y son normalmente virus o plásmidos. Los vectores de expresión de la presente invención incluyen algunos vectores que funcionan (es decir, dirigen la expresión génica) en células recombinantes, incluyendo en células bacterianas, fúngicas, endoparásitos, artrópodos, otros animales y células vegetales. Los vectores de expresión preferidos de la presente invención pueden dirigir la expresión génica en células de levaduras, animales o vegetales.

En particular, Los vectores de expresión contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación, y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos deseadas. En particular, las moléculas recombinantes incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, alargamiento, y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son las que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células recombinantes. Los expertos en la materia conocen varias secuencias control de la transcripción.

La transformación de una molécula de ácido nucleico en una célula puede llevarse a cabo mediante cualquier método por el cual una molécula de ácido nucleico pueda insertarse en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, aunque no de forma limitativa, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, y fusión de protoplastos. Una célula recombinante puede seguir siendo unicelular o puede crecer en un tejido, órgano o un organismo multicelular. Las moléculas de ácidos nucleicos transformadas pueden seguir siendo extracromosómicas o pueden integrarse en uno o más sitios en un cromosoma de la célula transformada (es decir, recombinante) de tal manera que se retiene su capacidad para expresarse.

Plantas transgénicas y partes de las mismas

El término "planta" como se usa en el presente documento es un nombre que se refiere a plantas completas, pero cuando se usa como adjetivo se refiere a cualquier sustancia que está presente en, se obtiene de, se deriva de, o está relacionada con una planta, tales como, por ejemplo, órganos de la planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, flores), células individuales (por ejemplo, polen), semillas, células vegetales y similares. Las plantas proporcionadas o contempladas para su uso en la práctica de la presente invención incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas. En realizaciones preferidas, las plantas útiles para la producción de piensos de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y leguminosas, maíz, trigo, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, yuca, cebada, o guisantes), u otras leguminosas. Las plantas pueden hacerse crecer para la producción de raíces comestibles, tubérculos, hojas, tallos, flores o frutos. Las plantas de la invención pueden ser: maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), lino (*Linum usitatissimum*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), cacahuètes (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), mandioca (*Manihot esculenta*), coco (*Cocos nucifera*), aceituna (*Olea europaea*), avena, o cebada,

En una realización, la planta la planta es una planta oleaginosa, preferentemente una planta de un cultivo de semillas oleaginosas. Tal como se usa en el presente documento, una "planta oleaginosa" es una especie de planta utilizada para la producción comercial de aceites a partir de las semillas de la planta. La planta de semillas oleaginosas puede ser colza oleaginosa (tal como canola) maíz, girasol, soja, sorgo, aceite de palma o lino (linaza) Adicionalmente, la planta de semillas oleaginosas puede ser de diferentes *Brassicaceae*, algodón, cacahuete, amapola, mostaza semilla de ricino, sésamo, cártamo, o plantas productoras de nueces. La planta puede producir altos niveles de aceite en su fruto, tal como de oliva o coco.

Los ejemplos de algodón de, y/o útiles para, la presente invención incluye cualquier especie de *Gossypium*, que incluye, aunque no de forma limitativa, *Gossypium arboreum*, *Gossypium herbaceum*, *Gossypium barbadense* y *Gossypium hirsutum*.

5 Cuando se desea la producción de SDA es preferible que la especie de planta que se va a transformar tenga una relación endógena de ALA a LA que sea al menos de 1:1. de forma más preferente al menos 2:1. Los ejemplos incluyen la mayoría, si no todas, las semillas oleaginosas tales como linaza. Esto maximiza la cantidad de sustrato ALA disponible para la producción de SDA. Esto se puede conseguir por medios transgénicos, por ejemplo, mediante la
10 introducción de un gen de la desaturasa $\Delta 15$ en la planta para aumentar los niveles del sustrato ALA para la conversión en SDA.

Las plantas producidas para el uso en piensos de la invención pueden ser siempre transgénicas, y/o transformadas con genes adicionales a los descritos en detalle en el presente documento.

15 Las plantas de grano que proporcionan semillas de interés incluyen plantas de semillas oleaginosas y plantas leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de granos, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, etc. Las plantas leguminosas incluyen judías, guisantes, soja, altramuces y similares. Las judías incluyen guar, algarroba, alholva, habas de jardín, caupi, frijol mungo, frijol de lima, habas, lentejas, garbanzos, etc.

20 La expresión "extracto o porción del mismo" se refiere a cualquier parte de la planta. "Porción" se refiere generalmente a un tejido u órgano específico tal como una semilla o raíz, mientras que un "extracto" implica normalmente la ruptura de las paredes celulares y posiblemente la purificación parcial del material resultante. Naturalmente, el "extracto o su porción" comprenderá SDA. Los extractos pueden prepararse utilizando las técnicas normalizadas de la materia

25 Las plantas transgénicas, como se define en el contexto de la presente invención, incluyen plantas y su progenie que se han modificado genéticamente utilizando técnicas recombinantes. Esto por lo general sería causa o potenciaría la producción de al menos una proteína/enzima definida en el presente documento en la planta u órgano vegetal deseado. Las plantas transgénicas incluyen todas las partes y células de dichas plantas tales como, por ejemplo, tejidos cultivados, callo, protoplastos. Las plantas transformadas contienen material genético que no está incluido antes de la transformación. El material preferentemente queda integrado de forma estable en el genoma de la planta. dichas plantas se han incluido en el presente documento en "plantas transgénicas". Una "planta no transgénica" es aquella que no se ha modificado genéticamente mediante la introducción de material genético por técnicas de ADN recombinante. En una realización preferida, las plantas transgénicas son homocigóticas para todos y cada uno de los
35 genes que se han introducido (transgenes) de forma que su progenie no se segrega para el fenotipo deseado.

Existen varias técnicas para introducir el material genético extraño en una célula vegetal. Dichas técnicas incluyen la aceleración de material genético revestido sobre micropartículas dirigidas al interior de las células (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.945.050 y US 5.141.131). Las plantas se pueden transformar utilizando tecnología de *Agrobacterium* (véanse, por ejemplo, el documento US 5.177.010, el documento US 5.104.310, el documento US 5.004.863, el documento US 5.159.135). También se ha utilizado la tecnología de electroporación para transformar plantas (véanse, por ejemplo, el documento WO 87/06614, el documento US 5.472.869, 5.384.253, WO 92/09696 y WO 93/21335). Además de las numerosas tecnologías para transformar plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes extraños también puede variar. Dicho tejido incluiría, aunque no de forma limitativa, tejido embrionario, tejido de callo tipo I y II, hipocótilo, meristemo, y similares. Prácticamente todos los tejidos vegetales se pueden transformar durante el desarrollo o diferenciación usando técnicas adecuadas conocidas para los expertos en la materia.

50 Numerosos vectores adecuados para la transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas se han descrito en, por ejemplo, Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, Supl. 1987; Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; y Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, KluwerAcademic Publishers, 1990. Normalmente, los vectores de expresión en plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control de la transcripción de secuencias reguladoras en 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Dichos vectores de expresión en plantas también pueden contener una región reguladora promotora (por ejemplo, una región reguladora controladora inducible o constitutiva, regulada por el entorno o por el desarrollo, o de expresión específica en células o tejidos), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

60 Los ejemplos de promotores en plantas incluyen, aunque no de forma limitativa, la subunidad pequeña de la ribulose-1,6-bisfosfato carboxilasa, promotor de la beta-conglicinina, promotor de la faseolina, promotor de glutenina de alto peso molecular (HMW-GS), promotores de genes de almidón biosintético, promotor de ADH, promotores de choque térmico y promotores específicos de tejidos. Los promotores pueden contener también determinados elementos potenciadores de secuencias que pueden mejorar la eficacia de la transcripción. Los potenciadores típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, Adh-intrón 1 y Adh-intrón 6.
65 Los promotores constitutivos dirigen la expresión génica continua en casi todos los tipos de células y en todo momento

(por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S). Los promotores específicos de tejidos son responsables de la expresión génica en células o tejidos específicos, tales como las hojas o semillas (por ejemplo, zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y estos promotores también se pueden usar.

5 En una realización particularmente preferida, el promotor dirige la expresión en tejidos y órganos en los que tiene lugar la biosíntesis de lípidos y aceites, especialmente en semillas vegetales tales como las células del endospermo del embrión en desarrollo. Los promotores que son adecuados son el promotor del gen napin de la colza oleaginosa (documento US 5.608.152), el promotor USP de *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991), el promotor de oleosina de *Arabidopsis* (documento WO 98/45461), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (documento US 5.504.200),
 10 el promotor Bce4 de *Brassica* (documento WO 91/13980), el promotor del gen de linina del lino, o el promotor B4 de leguminosa (Baumlein et al., 1992), y promotores que conducen a la expresión específica en semillas en monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, y similares. Promotores notables son el promotor del gen 1pt2 o 1pt1 de la cebasa (documentos WO 95/15389 y WO 95/23230) o los promotores descritos en el documento WO 99/16890 (promotores del gen de hordeína de cebada, el gen de glutelina del arroz, el gen de orizina del arroz, el gen de prolamina del arroz, el gen de gliadina del trigo, el gen de glutelina del trigo, el gen de zeína del maíz, el gen de glutelina del avena, el gen de kasirina del sorgo, el gen de secalina del centeno). Otros promotores incluyen los descritos en Broun et al. (1998) y en el documento US 20030159173.

20 En determinadas circunstancias, puede ser deseable usar un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de los genes en respuesta a una señal específica, tal como: un estímulo físico (genes de choque térmico); luz (RUBP carboxilasa); hormona (Em); metabolitos; y estrés. Se pueden usar otros elementos deseables para la transcripción y traducción que funcionan en plantas,

25 Además de los promotores vegetales, se pueden usar promotores de diferentes fuentes eficazmente en células vegetales para expresar genes extraños. Por ejemplo, promotores de origen bacteriano, tal como el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; promotores de origen vírico, tal como el virus del mosaico de la coliflor (35S y 19S) y similares son también de utilidad.

EJEMPLOS

30 **Ejemplo 1. Materiales y métodos**

Extracción y aislamiento de lípido

35 Las muestras se criodesecaron y se extrajeron según un protocolo modificado de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959). Una extracción monofase, CHCl₃/MeOH/H₂O, (1:1:0,9, en vol), se usó para proporcionar un extracto lipídico total (TLE).

40 Las clases de lípidos se analizaron mediante un analizador latroscan MK V de cromatografía en capa fina-detector de ionización por llama (TLC- FID) (latron Laboratories, Japón). Las muestras se distribuyeron sobre Sill Chromarods de gel de sílice (tamaño de partículas 5 µm) y se revelaron en un tanque de vidrio revestido con papel de filtro extraído previamente. El disolvente utilizado en la separación de lípidos fue hexano: dietil éter: ácido acético (60:17:0,1, v/v/v) (Volkman y Nichols, 1991). Después de desarrollar durante 25 minutos, los chromarods se secaron en el horno y se analizaron inmediatamente para minimizar la adsorción de contaminantes atmosféricos. Las clases de lípidos se cuantificaron mediante el programa informático DAPA (Kalamunda, WA, Australia). El FID se calibró para cada clase de compuesto: fosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; ácido oleico; hidrocarburo (escualeno); éster de cera (derivado de aceite de pescado); triacilglicérido (derivado de aceite de pescado); y DAGE (purificado de aceite de hígado de tiburón).

50 Una alícuota del TLE se trans-metiló en metanol:cloroformo:ácido clorhídrico (10:1:1, v/v/v) durante 1 h a 100°C. Tras adición de agua, la mezcla se extrajo tres veces con hexano:cloroformo (4:1, v/v) para producir ésteres metílicos de ácido graso (FAME). Los FAME se concentraron bajo atmósfera de nitrógeno y se trataron con N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSFTA, 50 µl, 60°C, 1 h) para convertir los grupos hidroxilo en sus correspondientes ésteres de trimetilsililo. Las muestras se llevaron hasta un volumen conocido con patrón de inyección interno (23:0 o 19:0 FAME) y se analizaron mediante cromatografía de gases (GC) con un Agilent Technologies 6890N GC (Palo Alto, California, EE.UU.) provisto de una columna de gel de sílice fundida capilar de metilsilicona reticulada HP-5 (50 mx0,32 mm d.i.), y un FID. Se usó helio como gas portador. Las muestras se inyectaron, en un inyector con/sin división, y un autómestreador Agilent Technologies 7683 Series en modo sin división, para una temperatura de horno de 50°C. Después de 1 min, la temperatura del horno se aumentó hasta 150°C a 30°C min⁻¹, después hasta 250°C a 2°C por min y finalmente hasta 300°C a 5°C min⁻¹. Los picos se cuantificaron mediante el programa informático GC ChemStation de Agilent Technologies (Palo Alto, California, EE.UU.). Los componentes individuales se identificaron mediante los datos de sus espectros de masa y por comparación de los datos de sus tiempos de retención con los obtenidos con patrones auténticos y de laboratorio. Los resultados de GC están sometidos normalmente a un error de ±5 % del área componente individual. Los análisis GC-espectrometría de masas (GC-MS) se realizaron en un espectrómetro de masas Finnigan Thermoquest GCQ GC provisto de un inyector de columna con el programa informático ThermoquestXcalibur (Austin, Texas, EE.UU.). El GC estaba provisto de una columna capilar similar a la anteriormente descrita.

Se usó una columna polar para separar 18:1ω9 and 18:3ω3 que eluyeron simultáneamente en la columna HP5 Los FAME se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (GC) provisto de un detector de ionización por llama (FID) a 250°C. Las muestras de FAME se inyectaron usando un inyector con/sin división en una columna polar de sílice fundida BPX-70 (50 m x 0,32 mm d.i.). El gas portador fue helio. La temperatura del horno de GC se mantuvo inicialmente al 45°C durante 2 min tras la inyección y posteriormente se aumentó a 30°C/min hasta 120°C y a 3°C/min hasta 240°C, después se mantuvo isotérmicamente durante 10 min.

Análisis estadístico

Los valores medios se notifican más o menos el error estándar de la media. Los datos de porcentaje se transformaron según el arcoseno antes del análisis. La normalidad y la homogeneidad de la varianza se confirmaron y se consiguió una comparación entre medias por análisis monolateral de la varianza (ANOVA). Se consiguieron comparaciones múltiples mediante HSD de Turkey-Kramer. La significancia se aceptó como probabilidades de 0,05 o menos. El análisis estadístico se llevó a cabo usando SPSS para Windows versión 11.

Transformación de Brassica

Se esterilizaron semillas de *Brassica napus* (Línea BLN 1239) superficialmente enjuagándolas en etanol al 70 % (v/v) durante 2 min y a continuación se enjuagaron durante 10 min con agua corriente a 55°C. Se esterilizaron las semillas durante 20 min en lejía comercial al 25 % (10 g/l de hipoclorito de sodio) que contenía Tween-20 al 0,1 %. Las semillas se lavaron vigorosamente con H₂O destilada estéril, colocadas en un medio GEM en jarras de cultivo de tejido y se mantuvieron en la cámara fría durante dos días para la germinación. Las jarras se transfirieron a baja intensidad de luz (20 μMm²s⁻¹) durante aproximadamente cuatro a seis días a 24°C para el crecimiento de los cotiledones. Se retiraron las raíces y los ápices en condiciones asépticas. Los segmentos de hipocótilo escindidos (10 mm) se lavaron con 50 ml de medio CIM durante aproximadamente 30 min sin agitación en la cabina de flujo laminar. Se retiró el CIM y se transfirieron los segmentos a un matraz de 250 ml con 50 ml de CIM. Se precintó con una hoja de aluminio estéril y se agitó durante 48 horas a 24°C con baja intensidad de luz (10 μMm²s⁻¹).

Las cepas de *Agrobacterium* que contenían vectores de transformación de plásmidos se hicieron crecer en 5 ml de medio LB media con los antibióticos adecuados a 28°C durante aproximadamente dos días, se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 45 ml de LB sin antibióticos y se cultivaron durante cuatro horas a 28°C con agitación. Las células de *Agrobacterium* se aglomeraron mediante centrifugación, se lavaron, y se resuspendieron suavemente en aproximadamente 20 ml de BM. La densidad óptica a 600 nm de la suspensión de *Agrobacterium* resultante se ajustó a 0,2 con BM. La suspensión celular se añadió a los explantes que se habían drenado del medio CIM, se mezcló brevemente y se dejó reposar durante 20 min. Se retiró la suspensión de *Agrobacterium*, Los explantes de hipocótilo se lavaron una vez con 50 ml de CIM y se continuó el cultivo simultáneo durante 48 horas en un agitador planetario. Tras esto, el medio era ligeramente lechoso debido al crecimiento de *Agrobacterium*. Se retiró el CIM y se lavaron los explantes tres veces con 50 ml de CIM durante un minuto y a continuación dos veces durante una hora en un agitador planetario a 140x g. Tras los lavados, se añadieron 50 ml de CIM que contenían 200 mg/l de Timentin® y se colocaron en un agitador planetario durante 24 horas. En condiciones estériles, el medio CIM era transparente en esta etapa.

Se llevó a cabo la regeneración de las vainas transformadas en un proceso de selección en dos etapas. Inicialmente, la concentración de higromicina en el medio SIM utilizado era de 5 mg/l. Después de aproximadamente dos semanas, los explantes con callos desarrollado se transfirieron a SIM que contenía 20 mg/l de higromicina. Cuando las vainas que se regeneran habían desarrollado hojas más largas de un cm, se escindieron cuidadosamente y se transfirieron a SEM con 20 mg/l de higromicina. Después de dos semanas, los tallos normalmente se habían alargado y los ápices se transfirieron a RIM que contenía 10 mg/l de higromicina. Las vainas sin alargamiento se subcultivaron en SEM cada dos a tres semanas hasta que fueron suficientemente largas para transferirse a RIM. Cuando las raíces tuvieron aproximadamente dos cm de longitud, se retiraron las plántulas regeneradas de las macetas de cultivo de tejido y se transfirieron al suelo para el crecimiento adicional,

Recetas de medios

Se proporciona a continuación la composición de los medios de cultivo de tejidos utilizados en este procedimiento. Contienen sales MS (Murashige and Skoog, 1962), MS o vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), sacarosa y MES. Se ajustó el pH a 5,8 con KOH antes de la esterilización. Para los medios sólidos, se añadió agar y a continuación se autoclavaron. Se dejaron enfriar los medios que contenían agar por debajo de 50°C y se añadieron los compuestos esterilizados mediante filtro a los medios fundidos vertiéndolos tanto en sus placas Petri de plástico como en jarras de cultivo de tejido de 250 ml de policarbonato (Sarstedt, No: 75.9922519) A continuación se proporciona la composición de diversos medios con todos los aditivos: medio de germinación (GEM); medio basal (BM); medio inductor de callo (CIM, modificado por Radke et al., 1988); medio de lavado (WM); medio inductor de brotes (CIM, modificado por Radke et al., 1988); medio de elongación de brotes (SEM) y medio inductor de raíces (RIM, modificado a partir de Blocketal., 1989).

GEM: 1 x sales MS, 1 x vitaminas MS, Sacarosa (20 g l⁻¹), MES (500 mg l⁻¹), agar (8 g l⁻¹), pH a 5,8.

BM: 1 x sales MS, 1 x vitaminas B5, Sacarosa (30 gl⁻¹), MES (500 mg l⁻¹), pH a 5,8.

CIM: 2,4-D (1,0 mg l⁻¹) y Kinetin (1,0 mg l⁻¹) añadido al BM.

WM: 2,4-D (1,0 mg l⁻¹), Kinetin (1,0 mg l⁻¹) y Timentin® (200 mg l⁻¹) añadidos al BM

SIM: AgNO₃(500 mg l⁻¹), ribósido de zeatina (0,5 mg l⁻¹), BAP (2,0 mg l⁻¹), GA₃(0,01 mg l⁻¹), Timentin® (200 mg l⁻¹), Higromicina (5 a 30 mg l⁻¹), y Agar (8 gl⁻¹) añadidos al BM.

SEM: 0,5 x sales MS, 0,5 x vitaminas B5, Sacarosa (10 gl⁻¹), MES (500 mg l⁻¹), Timentin® (200 mg l⁻¹), Higromicina (20 a 30 mg l⁻¹), agar (8 gl⁻¹), pH a 5,8.

RIM: 0,5 x sales MS, 0,5 x vitaminas B5, Sacarosa (10 gl⁻¹), MES (500 mg l⁻¹), IBA (0,1 mg l⁻¹), Timentin® (200 mg l⁻¹), Higromicina (20 a 30 mg l⁻¹), Agar (8 gl⁻¹), pH a 5,8.

Ejemplo 2. Peces alimentados con las composiciones que incluyen SDA derivado de plantas

El ácido estearidónico (SDA, 18:4 ω₃) es un precursor de LC-PUFA, derivado mediante desaturación de ALA mediante la desaturasa (Figura 1). La Δ₆ desaturasa también está implicada en otras etapas de la biosíntesis de LC-PUFA en la formación de DHA a partir de EPA en vertebrados (Yamazaki et al., 1992) y 18:2 ω₆ en 20:4 ω₆. Por lo tanto, es posible que la Δ₆ desaturación de ALA esté fuera de competencias de la ruta ω₆ en peces y crustáceos cuando la dietas contengan niveles elevados de 18:2 ω₆, presente en aceites vegetales tales como canola y girasol.

El aceite de unas pocas fuentes vegetales como *Echium plantagineum* tienen SDA en su perfil de ácido graso, hasta aproximadamente un 15-20 % en porcentaje de ácido graso en el aceite. Para determinar si el aceite rico en SDA sirve como sustrato eficaz para la acumulación de ω₃ LC-PUFA en peces, se realizó un ensayo de alimentación *in vivo* usando salmón (*Salmo salar* L.). Las dietas incluyeron un nivel de aceite de canola al utilizado como fuente de control de ALA, como se describe en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Ingredientes y composición lipídica (g/kg de materia seca) de las dietas experimentales.

	Dieta			
	Aceite CO (g)	Aceite SO (g)	Mezcla de aceite (g)	Aceite FO (g)
<i>Ingredientes de la composición (g kg⁻¹)</i>				
Harina de pescado (desgrasada)	150	150	150	150
Caseína	150	150	150	150
Gluten de trigo	100	100	100	100
Soja Hipro	226	226	226	226
Aceite de pescado	0	0	0	130
Aceite de canola	130	0	65	0
Aceite SDA	0	130	65	0
Almidón Pre-Gel	150	150	150	150
Mezcla de vitamina ^a	3	3	3	3
Mezcla mineral ^b	5	5	5	5
Stay C ^c	3	3	3	3
Cloruro de colina	2	2	2	2
Bentonita	50	50	50	50
CMC	10	10	10	10
Sodio Mono P	20	20	20	20
Óxido de itrio	10	10	10	10
FAME				
SFA total	6,7	10,8	12,2	44,9
MUFA total	81,2	41,3	56,2	32,9
18:3003 ALA	13,1	25,4	20,9	3,1
18:4ω ₃ SDA	0,0	14,3	7,2	4,2
20:5ω ₃ EPA	0,1	0,1	0,0	18,0
22:6ω ₃ DHA	0,6	0,4	0,0	10,7
Total ω ₃	13,9	40,2	28,6	39,6
18:2ω ₆	28,2	25,8	27,0	8,0
Total ω ₆	28,2	26,1	27,0	9,3
Otros PUFA	0,0	11,6	5,9	3,3
Total PUFA	42,1	77,9	61,5	52,2

SO, SA14 crosesencial rico en ácido estearidónico de Croda chemicals; CO, dieta de aceite de canola; Mezcla, mezcla 1:1 de dieta de aceite de canola y aceite de ácido estearidónico; FO, dieta de aceite de pescado, SFA, Ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; CMC, Carboximetilcelulosa; DHA, Ácido docosahexanoico; EPA, SDA, Ácido estearidónico; Ácido eicosapentanoico.

^a Mezcla de vitamina (ASV4) a suministrar por kilogramo de alimento: 2,81 mg de tiamina HCl, 1,0 mg de riboflavina, 9,15 mg de piridoxina HCl, 25 mg de ácido nicotínico, 54,35 mg de D-pantotenato de calcio, 750 mg mio-inositol, 0,38 mg D-biotina, 2,5 mg de ácido fólico, 0,03 mg de cianocobalamina, 6350 UI de acetato de retinol, 2800 UI colecalfiferol, 100 UI DL acetato de α -tocoferol, 5 mg menadona bisulfato de sodio, 100 mg Roche rovimix E50.

^b Mezcla mineral (TMV4) a suministrar por kilogramo de alimento: 117 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 7,19 mg de KI, 1815 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 307 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 659 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,29 mg de Na_2SeO_3 , 47,7 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

^c L-Ascorbil-2-polifosfato (Stay-C, Roche Vitamins Australia, French Forest, NSW, Australia).

Se formularon cuatro dietas para comparar el aceite de canola (CO), dos niveles diferentes de ácido estearidónico (100 % (SO), 1:1 SO:CO (Mezcla)), y aceite de pescado (FO) (Tablas 3 y 4). El aceite de pescado se desgrasó tres veces con una mezcla 2:1 de hexano y etanol (400 ml 100 g⁻¹ de aceite de pescado) Soja (Hamlet Protein A/S, Horsens, Dinamarca), caseína (MP Biomedicals Australasia Pty Ltd, Seven Hills NSW, Australia), gluten de trigo (Starch Australasia, Land Cove, NSW, Australia) y almidón de maíz pregelatinizado BOIIC (Penford Australia Limited, Lane Cove, NSW, Australia) se utilizaron. El aceite rico en ácido estearidónico se proporcionó como Crossential SA14 (Croda Chemicals, East Yorkshire, Reino Unido). El aceite de pescado era de Jack Mackerel (Skretting Australia, Cambridge, Tasmania Australia). Stay-C y Rovimix E50 fueron suministrados por Roche Vitamins Australia (French Forest, NSW, Australia), y los restantes ingredientes fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia). El óxido de itrio se usó como marcador de la digestibilidad. Las dietas se fabricaron en gránulos de 3 mm de diámetro con un California Pellet Mill (CL-2), se secaron y se almacenaron a -5°C.

El experimento de alimentación se llevó a cabo en la School of Aquaculture, Universidad de Tasmania, Launceston, Australia. Se obtuvieron alevines de salmón atlántico (*Salmo salar*) de Wayatinah Salmon hatchery (SALTAS, Tasmania, Australia) y se almacenaron aleatoriamente en tanques de 300 l con 25 peces por tanque. Se aclimataron durante 10 días. Los tanques se mantuvieron a una temperatura constante de 15,0°C y un fotoperiodo de 16:8 (luz-oscuridad). Los peces se mantuvieron en un sistema de circulación parcialmente con agua nueva. El agua se trató por medios físicos, UV y biofiltros, con una sustitución continua de aproximadamente un 15 % diario. El oxígeno disuelto, pH, amoníaco, nitrato, nitrito, y cloro se controlaron diariamente para garantizar que la calidad del agua permanecía en los parámetros recomendados para el salmón atlántico (Wedemeyer, 1996).

Tabla 4. Composición de ácido graso del lípido en las dietas (% de ácido graso total).

FA	CO	SE	SO	SE	Mix	SE	FO	SE
14:0	0,23	0,00	0,13	0,02	0,21	0,01	6,38	0,08
16:0	1,58	0,79	4,30	1,24	5,57	0,93	19,23	0,20
18:0	2,58	0,01	3,83	0,02	3,19	0,01	3,90	0,04
Otros Sat	0,75	0,01	0,06	0,00	0,44	0,00	5,02	0,01
Total Sat	5,13		8,33		9,40		34,53	
16:1 ω 7	0,28	0,00	0,17	0,03	0,25	0,00	7,06	0,05
18:1 ω 9	52,03	0,17	24,45	0,06	37,54	0,06	10,88	0,19
18:1 ω 7	3,28	0,02	1,04	0,02	2,18	0,02	2,69	0,01
20:1 ω 9	0,96	0,00	0,74	0,01	0,87	0,00	1,66	0,01
Otros Mono	5,92	0,06	5,32	0,17	2,42	0,12	3,02	0,03
Total Mono	62,47		31,73		43,26		25,31	
18:3 ω 3	10,07	0,03	19,57	0,04	16,04	0,03	2,39	0,04
18:4 ω 3	0,00	0,00	11,01	0,09	5,57	0,03	3,20	0,06
20:4 ω 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73	0,01
20:5 ω 3	0,05	0,02	0,05	0,02	0,00	0,00	13,85	0,12
22:5 ω 3	0,14	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	1,46	0,02
22:6 ω 3	0,43	0,01	0,33	0,06	0,41	0,01	8,26	0,08
Otros ω 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,00
Total ω 3	10,68		30,96		22,01		30,46	
18:2 ω 6	21,71	0,04	19,82	0,03	20,81	0,01	6,18	0,10
18:3 ω 6	0,00	0,00	8,20	0,06	4,33	0,02	0,64	0,06
20:3 ω 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4 ω 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,01
22:5 ω 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,03
Otros ω 6	0,00	0,00	0,23	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
Total ω 6	21,71		28,25		25,13		7,82	

Otros PUFA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total PUFA	32,40		59,21		47,15		38,28	

Los peces se anestesiaron inicialmente (50 mg l⁻¹, benzocaína) y se registraron los pesos y las longitudes. Se sacrificaron cuatro peces y se evaluaron para determinar el contenido y la composición de lípidos inicial. Veinticinco peces se distribuyeron aleatoriamente en doce tanques de 300 l. Los pesos de los peces no fueron significativamente diferentes entre los tanques (43,6g±0,7). Las cuatro dietas se alimentaron por triplicado en una relación de 1,1 % de peso corporal al día (% BW d⁻¹), en dos alimentaciones iguales a las 0900 y 1700 horas con alimentadores de cinta automáticos. Cada tres semanas, todos los peces se anestesiaron 50 mg l⁻¹, benzocaína) y se pesaron. Los peces se dejaban sin alimento el día anterior a la medición. Cada 7 días, se estimó el consumo de alimento total (kg DM) a partir del alimento que no se había consumido por recogida en los colectores de sedimentos. La cantidad de alimento no consumido se estimó a partir del número de gránulos no consumidos usando el peso promedio de un gránulo de cada alimento (Helland et al., 1996).

Las velocidades de crecimiento específicas (SGR) se calcularon como

$$SGR (\% \text{ día}^{-1}) = 100 \times (\ln (W_2/W_1)) \times d^{-1}$$

donde W₁ y W₂ son los pesos (g) a dos tiempos y d es el número de días.

Al finalizar el experimento, los peces se dejaron sin alimento el día anterior a ser anestesiados (50 mg l⁻¹, benzocaína) y se determinaron el peso y longitud de las aletas. Tres peces por tanque se sacrificaron por golpe en la cabeza tras inmersión en anestésico. Las muestras de tejido se disecaron, y el músculo rojo y el músculo blanco se muestrearon a lo largo de la aleta dorsal. Las muestras se congelaron a -80°C hasta el análisis.

Resultados

No se observaron diferencias significativas entre el pescado alimentado con las cuatro dietas con respecto al peso inicial y final, aumento de peso, velocidad de crecimiento específica (SPR), consumo total de alimento (FC), relación de eficacia del alimento (FER), índice hepatosomático (HSI) o supervivencia, determinados usando ANOVA (Tabla 5).

Después de 42 días no hubo diferencias estadísticas en la composición de los lípidos analizados con respecto a las clases de lípidos para los diferentes grupos de la dieta, tanto en el músculo rojo como en el blanco (Tablas 6 y 7). Las clases de lípidos predominantes en el músculo rojo fueron TAG (94,0-96,7 %). Hubo significativamente menos TAG (p>0,02) en el pescado alimentado (42,0-67,0 %) en comparación con la medida inicial (82,0 %) para el músculo blanco.

Para la composición de ácido graso, hubo niveles más elevados significativamente (p>0,01) para 18:3ω3 y 18:4ω3, en los tejidos tanto del músculo rojo como del músculo blanco, los peces alimentados con SO que en los peces alimentados con la dieta Mixta. Los niveles de 18:3ω3 y 18:4ω3 fueron significativamente mayores que en los peces alimentados con FO y CO (Tablas 6 y 7). Hubo niveles más elevados significativamente (p>0,01) en los tejidos de ambos músculos de 22:6 ω3 y total ω3 en las dietas FO y SO en comparación con las dietas Mixta y CO. Hubo niveles más elevados significativamente (p>0,01) de 20:5 ω3 en los peces alimentados con FO y SO en comparación con los peces alimentados con CO en los tejidos tanto del músculo rojo como del blanco. La relación de ω3/ω6 fue significativamente menor (p>0,01) en el pescado alimentado con la dieta CO y mixta en comparación con las dietas SO y FO.

Tabla 5. Crecimiento y eficacia del salmón atlántico alimentado con piensos experimentales de aceite de canola (CO), aceite rico en ácido estearidónico (SO), 1:1 CO:SO (Mezcla) y Aceite de pescado (FO) (media ± SE).

	Alimento									
	CO		Mix		SO		FO			
Inicial	46,2 ±	2,5	44,6 ±	1,1	44,8	± 1,1	42,3	±		1,2
Peso final (g)	81,4 ±	8,4	80,1 ±	1,9	76,9	± 2,2	76,5	±		3,3
Aumento de peso (g)	35,1 ±	5,9	35,5 ±	0,8	32,1	± 2,0	34,1	±		3,1
SGR (% día ⁻¹)	1,2 ±	0,2	1,3 ±	0,0	1,2	± 0,1	1,2	±		0,1
FC total (g DM)	41,4 ±	2,0	41,9 ±	0,8	40,5	± 0,7	38,0	±		1,8
FER (g/g)	0,8 ±	0,1	0,8 ±	0,0	0,8	± 0,1	0,9	±		0,0

ES 2 703 217 T3

DM)									
HSI (%)	1,0 ±	0,1	1,0 ±	0,1	0,9	± 0,2	0,9	±	0,1
Supervivencia	98,7 ±	1,4	98,7 ±	1,4	100,0	± 0,0	100,0	±	0,0

SO, dieta rica en ácido estearidónico; CO, dieta de aceite de canola; Mezcla, mezcla 1:1 de dieta rica en aceites de canola y de ácido estearidónico; FO, dieta de aceite de pescado;

DM, Materia seca

¹SGR, Velocidad de crecimiento específica = $100 \times (\ln (W_{\text{final(g)}}/W_{\text{inicial(g)}}) \times \text{número de días (d)})^{-1}$

²FC, Consumo total de alimento = Cantidad total (g DM) consumida por un individuo durante 42 días.

³FER, relación de eficacia del alimento = aumento de peso total (g) / consumo de alimento total (g DM).

⁴HSI, índice hepatosomático = $100 (\text{peso del hígado (g WW)} / \text{peso corporal total (g WW)})$. Supervivencia durante el experimento de crecimiento.

5 En ambos tejidos musculares, la dieta de FO sorprendentemente proporcionó niveles más elevados significativamente ($p > 0,01$) de 14:0, 16:0 y saturados totales en comparación con el alimento CO y Mixto. La dieta de FO proporcionó niveles más elevados significativamente ($p > 0,01$) de 14:0 en ambos tejidos musculares y de 16:0 y saturados totales en el músculo rojo en comparación con los peces alimentados con la dieta SO. En ambos tejidos musculares, El salmón alimentado con FO y SO tuvo niveles más bajos significativamente ($p > 0,01$) de 18:1 ω_9 y MUFA total MUFA en comparación con los peces alimentados con la dieta CO y mixta. Hubo niveles más elevados significativamente ($p > 0,01$) de 18:2 ω_6 y total ω_6 en los peces alimentados con la dieta CO y mixta.

Tabla 6. Contenido en FAME y composición de clases lipídicas del lípido total en muestras de músculo rojo de salmón atlántico alimentado con aceite de canola (CO 1:1 mezcla de aceite de canola:ácido estearidónico (Mezcla), dieta de ácido estearidónico (SO) y aceite de pescado (FO))

FAME	Inicial	SE	CO	SE	Mix	SE	SO	SE	FO	SE	Sig	f
14:0	4,0	± 0,3b	3,3	± 0,2a	3,0	± 0,2a	3,9	± 0,1a	5,2	± 0,2b	0,01	21,9
16:0	16,7	± 0,4b,c	12,9	± 0,2a	12,7	± 0,3a	14,4	± 0,4a,b	16,7	± 0,3c	0,01	14,8
18:0	4,7	± 0,3	4,2	± 0,0	4,6	± 0,1	4,5	± 0,0	4,3	± 0,1		
Otro	2,0	± 0,0c	1,7	± 0,0b	1,4	± 0,0a	1,8	± 0,0b	1,9	± 0,0b,c	0,01	11,1
SFAe												
SFA total	27,3	± 0,7b,c	22,2	± 0,9a	21,7	± 0,4a	24,6	± 1,0a,b	28,2	± 0,4c	0,01	13,9
16:1ω7c	5,9	± 0,4c,d	5,0	± 0,2b,c	4,3	± 0,4a	5,8	± 0,2b,c	7,4	± 0,4d	0,01	16,3
18:1ω9c	13,4	± 0,6a	30,5	± 1,3b	27,9	± 1,1b	16,1	± 0,5a	14,9	± 0,2a	0,01	26,5
18:1ω7c	3,3	± 0,1c,d	3,3	± 0,0b,c	2,9	± 0,1a	3,0	± 0,1a,b	3,5	± 0,1d	0,01	9,3
20:1ω9c	1,4	± 0,1b	2,0	± 0,0b	1,3	± 0,4a,b	1,7	± 0,0b	0,4	± 0,4a	0,01	5,0
Otro	2,5	± 0,0a	2,3	± 0,0a	2,5	± 0,0a	2,5	± 0,0a	4,2	± 0,0b	0,01	10,2
MUFAt												
Total MUFA	26,4	± 0,5a	43,2	± 2,2b	38,9	± 1,1b	29,1	± 0,6a	30,5	± 0,5a	0,01	28,2
18:3003												
ALA	0,7	± 0,0a	2,0	± 0,1b	3,9	± 0,2c	5,7	± 0,2d	2,0	± 0,0b	0,01	65,8
18:4ω3												
SDA	2,3	± 0,2a	2,2	± 0,1a	3,7	± 0,1b	4,3	± 0,3c	2,6	± 0,1a	0,01	92,2
20:4ω3	1,1	± 0,0a	1,0	± 0,0a,b	1,2	± 0,0b	1,4	± 0,0c	1,2	± 0,0a,b	0,01	10,4
20:5ω3	8,6	± 0,2b	4,8	± 0,3a	4,4	± 0,3a	6,2	± 0,2b	7,6	± 0,3b	0,01	25,2
EPA												
22:5ω3	3,2	± 0,1c	2,3	± 0,1a,b	2,2	± 0,2a	3,1	± 0,1b,c	3,7	± 0,1c	0,01	11,0
DPA												
22:6ω3	19,2	± 1,0c	9,6	± 0,5a	9,0	± 0,7a	12,5	± 0,6b	14,4	± 0,7b	0,01	13,6
DHA												
Otros ω3	1,0	± 0,0	0,8	± 0,0	0,7	± 0,0	1,1	± 0,0	1,3	± 0,0		
Total ω3	36,2	± 0,6b	22,6	± 1,9a	25,0	± 1,1a	34,3	± 1,1b	32,8	± 0,6b	0,01	16,3
18:2ω6												
LA	2,8	± 0,1a	7,6	± 0,4b	9,1	± 0,7b	6,2	± 0,6a,b	3,9	± 0,7a	0,01	12,7
18:3ω6												
18:3ω6	0,2	± 0,0a	0,5	± 0,0b	0,5	± 0,0b	1,5	± 0,2c	0,8	± 0,2a,b	0,01	8,1
FAME												
Inicial												
SE												
CO												
Mix												
SE												
SO												
FO												
Sig												
f												
20:3ω6	0,2	± 0,0a	0,6	± 0,0b,c	1,0	± 0,1c	0,7	± 0,1c	0,2	± 0,1a,b	0,01	12,5
20:4ω6	1,3	± 0,2a,b	0,5	± 0,0a	0,5	± 0,0a	0,6	± 0,0a,b	0,6	± 0,0b	0,01	5,3
22:5ω6	0,3	± 0,0b	0,2	± 0,0a,b	0,2	± 0,0a	0,3	± 0,0a,b	0,3	± 0,0b	0,01	5,5
Otro ω6h	0,8	± 0,0	1,0	± 0,0	0,8	± 0,0	0,8	± 0,0	0,9	± 0,0		
Total ω6	5,3	± 0,2a	9,9	± 0,9c	11,6	± 0,8c	8,5	± 1,2b,c	5,8	± 0,1a,b	0,01	12,8

Otro PUFAl	4,8	±	0,2	2,0	±	0,0	2,8	±	0,1	3,4	±	0,1	2,7	0,1
Total PUFA	46,3	±	1,3b	34,6	±	2,1a	39,4	±	1,3a,b	46,3	±	1,2b	41,3	0,01
15,1														
Relaciones														
ω3/ω6	6,8	±	0,3b	2,3	±	0,4a	2,2	±	0,2a	4,0	±	0,1b	5,6	0,01
54,5														
Lípidos Clase														
TAG	96,7	±	0,4	96,7	±	0,3	95,4	±	0,2	96,6	±	0,4	94,0	±
FFA	0,7	±	0,1a	0,7	±	0,1a	1,8	±	0,1a,b	0,5	±	0,1a	2,5	±
ST	0,8	±	0,2	1,1	±	0,0	1,0	±	0,1	1,0	±	0,0	0,9	±
PL	1,8	±	0,2	1,5	±	0,2	1,7	±	0,2	1,8	±	0,3	2,6	±
mg/g Phum	17,8	±	1,0	22,9	±	0,7	22,2	±	1,1	24,5	±	1,8	28,1	±
mg/g PSeco	44,3	±	2,8	53,6	±	0,9	57,0	±	7,7	54,1	±	2,9	56,6	±
7,1														
SFA, Ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; DFIA, Ácido docosahexanoico; DPA, Ácido docosahexanoico; EPA, Ácido eicosapentanoico; SDA, Ácido estearidónico; LA, Ácido linoleico; ALA, Ácido α-linolénico; TAG; Triacilglicerol; FFA, Ácido graso libre; ST, esteroil; PL, lípido polar; WW, peso húmedo; Sig, Significancia; f, Promedio suma cuadrados a,b,c,d Valores medios de la raíz que no comparten una letra común fueron significativamente diferentes según se determina por FIST de Turkey-Kramer; off =4,15.														
e Otros SFA incluyen 15:0, 17:0, 20:0, 22:0 y 24:0														
f Otros MUFA incluyen 16:1ω9, 16:1ω5, 18:1ω5, 20:1ω7, 22:1ω9, 22:1ω11 y 24:1ω9														
g Otros ω3 PUFA incluyen 21:5ω3 y 24:6ω3														
h Otros ω6 PUFA incluyen 20:2ω6, 20:3ω6, 22:4ω6 y 24:5ω6' Otros PUFA incluyen 16:2ω4, 16:3ω4 y 18:2ω9														
i Determinado por TLC-FID														

Tabla 7. Contenido en FAME y composición de clases lipídicas del lípido total en muestras de músculo blanco de salmón atlántico

FAME	Inicial	SE	CO	SE	Mix	SE	SO	SE	FO	SE	f
14:0	3,9	± 0,4b	2,3	± 0,1a	1,9	± 0,2a	2,3	± 0,1a	3,6	± 0,2b	13,0
16:0	18,3	± 0,4a,b	14,8	± 0,3a	15,2	± 0,3a	16,8	± 0,6a,b	19,7	± 0,3b	5,0
18:0	5,7	± 0,3	4,8	± 0,0	5,6	± 0,1	5,6	± 0,1	5,0	± 0,1	
Otros SF/Ae	1,8	± 0,0	1,0	± 0,0	0,8	± 0,0	1,0	± 0,0	1,4	± 0,0	
SFA total	29,7	± 1,1 a,b	22,9	± 0,9a	23,5	± 1,7a	25,7	± 1,4a,b	29,6	± 0,5b	5,1
16:1ω7c	5,6	± 0,5b	3,1	± 0,2a	2,7	± 0,4a	3,1	± 0,1a	5,1	± 0,4b	14,1
18:1ω9c	14,2	± 0,7b	27,2	± 1,3c	22,2	± 1,3b,c	11,3	± 0,8a	11,0	± 6,7a	5,9
18:1ω7c	3,2	± 0,1c	2,9	± 0,0b,c	2,5	± 0,1a,b	2,2	± 0,1a	3,1	± 0,1c	18,0
20:1ω9c	1,1	± 0,2	1,5	± 0,0	0,9	± 0,4	1,0	± 0,0	0,5	± 0,4	
Otros MUFAf	3,3	± 0,1	2,1	± 0,0	2,0	± 0,0	1,7	± 0,0	2,4	± 0,0	
MUFA total	27,3	± 0,7b	36,8	± 2,3c	30,2	± 2,1b	19,3	± 2,4a	22,0	± 1,1a	4,7
18:3ω3 ALA	1,0	± 0,0a	2,1	± 0,1b	3,5	± 0,7c	6,3	± 0,4d	1,7	± 0,1b	30,1
18:4ω3 SDA	2,0	± 0,2a	1,6	± 0,0a	2,8	± 0,3a	3,9	± 0,1b	2,0	± 0,1a	10,8
20:4ω3	1,1	± 0,0a,b	0,8	± 0,0a	1,2	± 0,0a,b	1,3	± 0,1b	1,0	± 0,0a,b	4,7
20:5ω3 EPA	7,4	± 0,2b,c	4,8	± 0,3a	5,4	± 0,3a,b	7,3	± 0,5b,c	8,6	± 0,3c	7,0
22:5ω3 DPA	3,0	± 0,1b,c	2,1	± 0,1a	2,2	± 0,2a	2,6	± 0,1a,b	3,6	± 0,2c	10,3
22:6ω3 DHA	20,0	± 1,2a,b	16,2	± 0,9a	18,3	± 0,7a	22,2	± 0,6b	24,2	± 0,7b	8,0
Otros ω 39	0,8	± 0,1	0,5	± 0,0	0,3	± 0,0	0,6	± 0,0	0,9	± 0,0	
Total ω3	35,4	± 0,2b	28,2	± 2,1a	33,7	± 1,1 a,b	44,2	± 2,6c	42,0	± 2,4b,c	14,4
18:2ω6LA	2,9	± 0,2a	7,6	± 0,4b	7,5	± 0,7b	5,6	± 0,6b	3,2	± 0,7a	4,0
18:3ω6	0,6	± 0,2a	0,5	± 0,0a	0,9	± 0,4a,b	1,5	± 0,2b	0,4	± 0,3a	12,0
20:3ω6	0,1	± 0,0a	1,0	± 0,1b	1,1	± 0,1b	0,9	± 0,2b	0,1	± 0,1a	4,5
20:4ω6	1,3	± 0,2	1,0	± 0,0	1,3	± 0,0	1,0	± 0,1	0,9	± 0,0	

22:5ω6	0,2	±	0,0	0,4	±	0,0	0,2	±	0,0	0,3	±	0,0	0,2	±	0,0	
Otro ω6h	1,3	±	0,2	0,9	±	0,0	0,6	±	0,0	0,5	±	0,0	0,4	±	0,0	
Total ω6	5,9	±	0,1a	10,8	±	1,3b	10,6	±	1,8b	8,3	±	1,4a,b	4,7	±	0,2a	
Otros PUFAI	1,7	±	0,0	1,4	±	0,0	1,9	±	0,1	2,5	±	0,1	1,7	±	0,1	
Total PUFA	43,0	±	1,2a	40,4	±	1,4a	46,3	±	2,3 a,b	55,0	±	1,1c	48,4	±	0,9b	
FAME	Inicial	SE	CO	SE	Mix	SE	SO	SE	FO	SE	Sig	f				
Relaciones																
ω3/ω6	6,0	±	0,1b,c	2,6	±	0,5a	3,2	±	0,1a	5,3	±	0,1b	8,8	±	0,2c	16,2
Clase lipídica																
TAG	82,0	±	2,6c	46,2	±	4,9a	67,0	±	4,6a	59,9	±	2,0a	50,5	±	12,7a	3,1
FFA	1,7	±	0,3b,c	1,9	±	0,2c	0,4	±	0,1a	1,8	±	0,1b,c	0,5	±	0,2a,b	5,9
ST	2,1	±	0,4	4,0	±	0,2	2,1	±	0,2	3,8	±	0,3	2,2	±	0,3	
PL	14,2	±	2,1	47,6	±	4,9	30,5	±	4,7	34,6	±	1,9	46,8	±	12,4	
mg/g Phum	8,4	±	0,3	9,1	±	0,1	9,0	±	0,2	9,2	±	0,1	8,2	±	0,3	
mg/g Psec	10,1	±	1,0a	15,2	±	0,4b	14,2	±	0,6b	14,9	±	0,2b	15,1	±	1,0b	8,9
Abreviaturas y o tras definiciones como nota al pie, véase la Tabla 8.																

Discusión

La inclusión de SO a 130 o 65 g/kg de dieta para alevines de salmón atlántico no alteró significativamente el crecimiento o las tasas de conversión de alimento en comparación con otras dietas experimentales durante el ensayo de crecimiento de 42 días en agua dulce (Tabla 5). Hubo poco efecto entre las dietas según los perfiles de clase lipídica (Tablas 6 y 7). Hubo significativamente menos TAG en el músculo blanco de los peces alimentados en comparación con la dieta debido a la inclusión de aceite en la dieta a un nivel de 130 g/kg en comparación con la dieta comercial (aprox. 300 g/kg) con la que se alimentaban antes del experimento.

Los perfiles de FA en el músculo de los peces están estrechamente relacionados con el perfil de FA de su dieta. Se había demostrado anteriormente para el salmón alimentado usando aceites de canola, girasol y lino, es decir, dietas ricas en ALA y sin EPA y DHA, que había una reducción significativa en total ω 3 y ω 3 LC-PUFA, en particular DHA y EPA (Brandsen et al., 2003; Bell et al., 2003; Polvi y Ackman, 1992; Bell et al., 2004). Por lo tanto, una conversión mínima, o acumulación poco importante de, LC-PUFA se produjo cuando el pescado se alimentaba con aceite vegetal. En dichos estudios, las velocidades de crecimiento y la salud de los peces alimentados con los aceites vegetales no se vieron alterados.

En el estudio descrito en el presente documento, los tamaños de los alevines de salmón atlántico fueron inicialmente $43,6\text{g} \pm 0,7\text{ g}$ hasta un peso final de $72,4\text{ g} \pm 1,9\text{ g}$. Los peces estaban en una etapa de crecimiento importante. Antes de la esmoltificación, el salmón atlántico almacena FA, especialmente ω 3 LC-PUFA, antes de la energía que requiere la transferencia al agua salada, durante la cual, el salmón experimenta cambios principales en su metabolismo de los lípidos.

La inclusión de SDA a 14,3 o 7,2 g/kg afectó significativamente los perfiles de FA del salmón (Tablas 6 y 7). Los peces alimentados con la dieta que contenía los niveles más elevados de SDA tuvieron significativamente mayores niveles de EPA, DPA, DHA y total ω 3 en las muestras de músculo que los peces alimentados con dieta CO. En algunos aspectos, la composición de ácido graso de los tejidos de los peces mejoró con respecto a los peces alimentados con dieta FO. Por ejemplo, el nivel de grasa saturada se redujo. La dieta SO también tuvo ventajas por su característica al combinarse con los niveles elevados de LC-PUFA.

Ni la dieta CO ni la dieta SO contenían EPA o DHA en niveles importantes, siendo $< 0,7\%$ del ácido graso presente en el lípido, donde el nivel traza tiene probablemente su origen en el componente de harina de pescado. Por lo tanto, la mayor acumulación de EPA, DPA y DHA en los tejidos de los peces debe haber representado un aumento en la biosíntesis de ácidos grasos a partir de DHA en el pescado.

Este experimento mostró que niveles elevados de total ω 3, DHA y EPA se podrían mantener en un pez como el salmón sin inclusión como FA en la dieta. Este experimento también demostró que los niveles de ácidos grasos conseguidos, como se recoge en las Tablas 6 y 7, por ejemplo los niveles de SDA, EPA, DPA, DHA, total LC-PUFA ω 3, o total ω 3 PUFA (incluye los ácidos grasos C18), fueron niveles mínimos que se podrían lograr mediante alimentación de los peces con una dieta que incluyera SDA derivados de plantas, y que incluso podrían esperarse niveles más elevados usando dietas con niveles incluso más elevados de SDA y/o tiempos de alimentación más prolongados.

La conversión de ALA en SDA implica la desaturación en la posición Δ 6 de la cadena de carbono con etapas de elongación de la cadena adicionales, seguido por Δ 5 desaturación para formar EPA. La síntesis de EPA en DHA requiere elongaciones adicionales de la cadena y también implica Δ 6 desaturación en la conversión de 24:5 ω 3 en 24:6 ω 3 antes del acortamiento de la cadena para dar DHA (Figura 1); esto se denomina la ruta Sprecher. Con la conversión de 18:2 ω 6 en 20:4 ω 6 que también usa la Δ 6 desaturasa, fue posible que los elevados niveles de 18:2 ω 6 en aceites vegetales pudieran competir por esta enzima, y por tanto se produciría una conversión mínima de ALA en SDA en la ruta ω 3. Los inventores han descubierto aquí que este problema se puede atenuar añadiendo SDA a la dieta de los peces. Los resultados indican que se podría usar un aceite vegetal rico en SDA como fuente de aceite de la dieta para piensos de acuicultura y, de forma importante, que el uso de aceite de SDA no afecta a la cantidad de ω 3 LC-PUFA en el perfil de FA del músculo del salmón.

Ejemplo 3. Piensos de gamba y de langosta

Para alimentar a langostas, gambas u otros crustáceos con dietas con un alto contenido de aceite de SDA, se pueden usar las siguientes composiciones alimenticias (Tabla 8) Se proporcionan los valores como g/kg de materia seca.

Ejemplo 4. Aislamiento de un gen que codifica la Δ 6-Desaturasa de *Echium plantagineum*

Algunas especies de plantas tales como la onagra (*Oenothera biennis*), la borraja común (*Borago officinalis*), grosella negra (*Ribes nigrum*), y alguna especie de *Echium* que pertenece a la familia de las *Boraginaceae* contiene los ácidos grasos ω 6 y ω 3 desaturados, ácido γ -linolénico (18:3 ω 6, GLA) y ácido estearidónico (18:4 ω 3, DSA) en sus lípidos TAG de hojas y semillas (GuilGuerrero et al., 2000). GLA y SDA se han reconocido como ácidos grasos beneficiosos en la nutrición humana. La primera etapa en la síntesis de LC-PUFA es una Δ 6-desaturación. GLA se sintetiza mediante una Δ 6-desaturasa que introduce un doble enlace en la posición Δ 6 de LA. La misma enzima es también

capaz de introducir un doble enlace en la posición Δ6 de ALA, produciendo SDA. Se han clonado los genes de la Δ6-desaturasa a partir de miembros de las *Boraginaceae*, similares a la borraja (Sayanova et al., 1997) y dos especies de *Echium* (Garcia-Maroto et al., 2002).

Tabla 8. Piensos de gamba y de langosta

	Langosta espinosa	Gamba
Harina de pescado (desgrasada)	250	0
Harina de pescado (convencional)	0	200
Harina de krill	0	185
Harina de soja	150	150
Gluten de trigo	100	100
Aceite de <i>Echium plantagineum</i>	110	100
Colesterol	2	2
Lecitina	12	12
Almidón pregelatinizado	175	100
Manuacol	60	60
Premezcla de vitaminas	2,00	2,00
Banox E	0,20	0,20
Cloruro de colina	0,20	0,20
Vitamina C ^a	1,00	1,00
Carófilo rosa	1,50	1,50
Premezcla de minerales ^b	0,01	0,01
Fosfato TSP	20,00	20,00
Harina de mejillón	50,00	0,00
Carga	66,00	66,00
Total	1000	1000
SDA	1,54	1,40
SO, SA14 crosencial rico en ácido estearidónico de Croda chemicals; ^a L-Ascorbil-2-polifosfato (Stay-C, Roche Vitamins Australia, French Forest, NSW, Australia). ^b Mezcla mineral (TMV4) a suministrar por kilogramo de alimento: 117 mg de CuSO ₄ ·5H ₂ O, 7,19 mg de KI, 1815 mg de FeSO ₄ ·7H ₂ O 307 mg MnSO ₄ ·H ₂ O, 659 mg de ZnSO ₄ ·7H ₂ O 3,29 mg de Na ₂ SeO ₃ 47,7 mg de CoSO ₄ JH ₂ O Soja (Hamlet Protein A/S, Horsens, Dinamarca), gluten de trigo (Starch Australasia, Land Cove, NSW, Australia) y almidón de maíz pregelatinizado BOIIC (Penford Australia Limited, Lane Cove, NSW, Australia) se utilizaron. Stay-C y Carófilo rosa fueron suministrados por Roche Vitamins Australia (French Forest, NSW, Australia), Harina de mejillón obtenida de mejillones NewZealand Greenshell™, (Sealord P/L Nelson, New Zealand) y el resto de ingredientes fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia).		

5 *Echium plantagineum* es una planta anual nativa de la Europa mediterránea y África del norte. El aceite de sus semillas es poco usual ya que tiene una relación única de ácidos grasos ω3 y ω6 y contiene altas cantidades de GLA (9,2 %) y SDA (12,9 %) (GuilGuerrero et al., 2000), sugiriendo la presencia de actividad Δ6-desaturasa implicada en la desaturación de ácidos grasos ω3 y ω6 en las semillas de esta planta.

10 *Clonación del gen EpID6Des de E. plantagineum*

Se usaron cebadores degenerados incorporados en los sitios de restricción XbaI o SacI que corresponden a las secuencias de los aminoácidos de los extremos N y C MANAIKKY (SEQ ID NO: 14) y EALNTHG (SEQ ID NO:15) las conocidas *Echium pitardii* y *Echium gentianoides* (Garcia-Maroto et al., 2002) Se usaron Δ6-desaturasas para la amplificación de la RT-PCR de las secuencias de la Δ6-desaturasa de *E. plantagineum* usando a ADN polimerasa proofreading Pfu Turbo® (Stratagene). El producto de la amplificación de la PCR de 1,35 kb se insertó en pBluescript SK(+) en los sitios XbaI y SacI para generar el plásmido pXZP106. Se determinó la secuencia de nucleótidos de la inserción. Esta comprendía un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de 483 restos de aminoácidos (SEQ ID NO:10) que tenía un alto grado de homología con las otras Δ6-desaturasas de *E. gentianoides* notificadas (SEQ ID NO: 11), *E. pitardii* (SEQ ID NO:12) y *Borago officinalis* (SEQ ID NO:4). esta tiene un dominio del citocromo b5 en el extremo N, incluyendo el motivo HPGG (SEQ ID NO:16) en la región de unión a hemo, como se notificó para las otras Δ6- y Δ8-desaturasas (Sayanova et al. 1997; Napier et al. 1999). Además, la Δ6 desaturasa de *E. plantagineum* contiene tres secuencias de histidina conservadas presentes en la mayoría de las desaturasas de 'primera línea' (Napier et al., 1999). El análisis de los agrupamientos de los miembros representativos de las Δ6 y A8 desaturasas mostró un agrupamiento evidente del gen clonado con las otras Δ6-desaturasas, especialmente aquellas de las especies *Echium*,

Expresión heteróloga del gen de la Δ6-desaturasa E. plantagineum en levadura

Se llevaron a cabo experimentos de expresión en levaduras para confirmar que el gen de *E. plantagineum* (secuencia de ADNc proporcionada como SEQ ID NO:25) codificó una enzima Δ6-desaturasa. el fragmento génico se insertó como un fragmento Xfoal Sacl en los sitios SmaI-Sacl del vector de expresión en levadura pSOS (Stratagene) que contiene el promotor *ADH1* constitutivo, dando como resultado el plásmido pXZP271. este se transformó con la cepa de levadura S288Cα mediante un método de choque término y las colonias transformantes seleccionando mediante la siembra en placas en placas de medio mínimo. Para el análisis de la actividad enzimática, se hicieron crecer 2 ml de cultivos clonados de levaduras a una D.O.₆₀₀ de 1.0 en medio mínimo de levaduras en presencia de NP-40 al 0,1 % a 30°C con agitación. Precusores de ácidos grasos libres, se añadieron cualquiera de ácido linoleico como linoléico como soluciones madre 25 mM en etanol, con el fin de que la concentración final de ácido graso fuera 0,5 mM. Se transfirieron los cultivos a 20°C y se hicieron crecer durante 2-3 días con agitación. Se recogieron células de levaduras mediante centrifugación repetida y se lavaron en primer lugar con NP-49 al 0,1 %, a continuación NP-40 al 0,05 % y finalmente con agua. Se extrajeron los ácidos grasos y se analizaron. Se confirmaron las identidades de los picos de ácidos grasos mediante CG-EM.

Las células de levaduras transgénicas que expresaban *Echium Epid6Des* fueron capaces de convertir LA y ALA en GLA y SDA, respectivamente. Alrededor de 2,9 % de LA se convirtió en GLA y 2,3 % de ALA se convirtió en SDA, confirmando la actividad Δ6-desaturasa codificada por el gen clonado.

Expresión funcional del gen de la Δ6-desaturasea de E. plantagineum Δ6-desaturasa en tabaco transgénico

A fin de demostrar que el gen *Epid6Des* podría conferir la síntesis de ácidos grasos Δ6 desaturados en plantas transgénicas, el gen se expresó en plantas de tabaco. Para ello, el fragmento génico se escindió de pXZPIOt como un fragmento Xfoal-Sacl y se clonó en el vector de expresión de plantas pBI121 (Clonetech) en el sitio Xfoal y Sacl; bajo el control de un promotor CaMV de 35S constitutivo, para generar el plásmido de expresión en planta pXZP341 Este se introdujo en AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*, y se usó para la transformación del tejido de la planta de tabaco W38, mediante selección con kanamicina.

se llevó a cabo la hibridación de la transferencia Northern de las plantas transformadas para detectar la expresión del gen introducido, y los ácidos grasos totales presentes en los lípidos de las hojas del tabaco W38 silvestre y el tabaco transformado se analizaron como se describe anteriormente. Las plantas no transformadas contenían cantidades notables de LA (21 % de los ácidos grasos totales y ALL (37 % de los ácidos grasos totales) en lípidos de las hojas. Según se esperaba, ni GLA ni SDA, productos de Δ6-desaturación, se detectaron en la hoja no transformada. Asimismo, las plantas transgénicas de tabaco transformadas con el vector pBI121 tuvieron una composición de ácidos grasos similar en las hojas que las plantas W38 no transformadas. Por el contrario, las hojas de las plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *Epid6Des* mostraron la presencia de picos adicionales con tiempos de retención correspondientes a GLA y SDA. La identidad de los picos GLA y SDA se confirmaron mediante GC-MS. De forma destacable, los ácidos grasos de las hojas de las plantas que expresan el gen *Epid6Des* contenían consistentemente aproximadamente una concentración dos veces mayor de GLA que de SDA incluso cuando los ácidos grasos Δ6 desaturados totales llegaron hasta el 30 % de los ácidos grasos totales en los lípidos de las hojas (Tabla 9).

Tabla 9. Composición de ácido graso en el lípido procedente de hojas de tabaco transgénico (%).

Planta	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	18:3	SDA	Total productos Δ6-desaturados
W38	21,78	5,50	2,44	21,21	-	37,62	-	-
ET27-1	20,33	1,98	1,25	10,23	10,22	41,10	6,35	16,57
ET27-2	18,03	1,79	1,58	14,42	1,47	53,85	0,48	1,95
ET27-4	19,87	1,90	1,35	7,60	20,68	29,38	9,38	30,07
ET27-5	15,43	2,38	3,24	11,00	0,84	49,60	0,51	1,35
ET27-6	19,85	2,05	1,35	11,12	4,54	50,45	2,19	6,73
ET27-8	19,87	2,86	2,55	11,71	17,02	27,76	7,76	24,78
ET27-11	17,78	3,40	2,24	12,62	1,11	51,56	0,21	1,32
ET27-12	16,84	2,16	1,75	13,49	2,71	50,80	1,15	3,86

El análisis Northern de múltiples líneas independientes de tabaco transgénico mostró niveles variables del transcrito *Epid6Des* que por lo general se correlacionan con los niveles de productos Δ6-desaturados sintetizados en las plantas. Por ejemplo, la planta transgénica ET27-2 que contenía bajos niveles del transcrito *Epid6Des* sintetizaron solamente un 1,95 % de sus lípidos totales de las hojas como ácidos grasos Δ6-desaturados. Por otro lado, la planta transgénica ET27-4 contenía niveles significativamente mayores del transcrito *Epid6Des* y tenían también una proporción mucho más alta (30 %) de ácidos grasos Δ6-desaturados en los lípidos de las hojas.

El análisis de las plantas de tabaco individuales mostró que, sin excepción, GLA estaba presente a mayor concentración que SDA incluso aunque estuviera presente mayor concentración de ALA que de LA en las plantas no transformadas. Por el contrario, la expresión de *Epid6Des* en levadura ha resultado en niveles de aproximadamente

equivalentes de conversión de LA en GLA y de ALL en SDA. Las semillas de *Echium plantagineum*, por otra parte, contienen niveles más elevados de SDA que de GLA. EplD6Des probablemente realiza su propia desaturación *in vivo* en semillas de *Echium plantagineum* sobre LA y ALA esterificado a fosfatidilcolina (PC) (Jones and Harwood 1980). En el ensayo con hojas de tabaco, es más probable que la enzima que desatura LA y ALA esterificado al lípido de cloroplastos monogalactosildiacilglicerol (MGDG) (Browse and Slack, 1981). En el ensayo de levaduras, los precursores de ácido graso libre LA y ALA añadidos al medio muy probablemente entran en la combinación acil-CoA disponible para actuar en EplD6Des según esta forma.

En conclusión, la planta transgénica de tabaco descrita en el presente documento se puede usar para producir piensos de la invención

Expresión funcional del gen de la Δ6-desaturasa de E. platangineum en semillas transgénicas

Para mostrar la expresión específica de semillas del gen de la Δ6-desaturasa de *Echium*, la región de codificación se insertó en el casete de expresión específico de semilla de la siguiente forma. Un fragmento *NcoI-SacI* que incluye la región de codificación de la Δ6-desaturasa se insertó en pXZP6, un derivado de pBluescriptSK que contiene un terminador *Nos*, dando como resultado el plásmido pXZP157. El fragmento *SmaI-ApaI* que contiene la región de codificación y el terminador EplD6Des-*NosT* se clonó en pWVec8-Fp1 después del promotor *Fp1*, dando como resultado el plásmido pXZP345. El plásmido pXZP345 se usó para transformar plantas de *Arabidopsis silvestres*, ecotipo Columbia, y las plantas transgénicas se seleccionaron mediante selección con higromicina B. Las plantas transgénicas transformadas con este gen se designaron platos "DP".

El análisis de la composición de ácido graso del aceite de semilla de la semilla T2 procedente de las plantas T1 transformadas con la construcción mostró la presencia de GLA y SDA en todas las líneas, con niveles de productos de Δ6-desaturación que alcanzan al menos el 11 % (Tabla 10). Esto demuestra la eficaz Δ6-desaturación de LA y ALA en la semilla.

Ejemplo 5. Transformación de lino con una construcción génica de una Δ6 ácido graso desaturasa específica de las semillas de *Echium*

La región de codificación completa del gen de la proteína de la Δ6 ácido graso desaturasa de *Echium* se amplificó mediante PRC con los siguientes cebadores que incorporan un sitio *XhoI* en ambos extremos: Ed6F: 5'-ACTCGAGCCACCATGGCTAATGCAATCAA-3' (SEQ IC NO:17) y Ed6R: 5'-CCTCGAGCTCAACCATGAGTATTAAGAG-3' (SEQ ID N°: 18). La PCR se llevó a cabo por calentamiento a 94°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 40 s, 62°C durante 40 s y 72°C durante 1 min 20 s. Después del último ciclo, las reacciones se incubaron durante 10 min a 72°C. El fragmento de la PCR se clonó en un vector pGEMTeasy® (Promega) y se secuenció para garantizar que no se habían introducido errores inducidos por la PCR. La inserción se digirió a continuación con *XhoI* y se insertó en el sitio *XhoI* del vector binario, pWBVec8, en orientación de sentido directo entre el promotor derivado de un gen de la proteína de almacenamiento 2S del lino específicamente expresada en semillas, linina, y su sitio de poliadenilación/terminador de la transcripción.

Tabla 10. Composición de ácido grasos en semillas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan Δ6-desaturasa de *Echium*.

Planta	Ácido graso (%)								Total Δ6.	
	16:0	18:0	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,1} (LA)	18:3 ^{Δ6,9,12} (GLA)	18:3 ^{Δ9,12,15} (ALA)	18:4 ^{Δ6,9,12,15}	20:0	20:1	Productos de desaturación (%)
Columbia										
DP-2	8,0	2,8	22,9	27,3	2,5	11,3	0,7	1,6	15,8	3,2
DP-3	7,8	2,7	20,6	25,9	3,0	12,1	0,8	1,7	17,8	3,8
DP-4	7,8	2,8	20,4	28,5	1,2	13,7	0,4	1,7	16,1	1,5
DP-5	8,2	3,2	17,4	29,3	1,2	14,2	0,3	2,1	15,6	1,6
DP-7	8,2	2,9	18,4	26,7	5,0	12,7	1,4	1,7	15,2	6,4
DP-11	9,0	3,5	17,8	28,4	3,0	13,4	0,9	2,1	13,9	3,8
DP-12	8,6	3,0	18,9	27,8	3,3	12,6	1,0	1,8	15,4	4,3
DP-13	8,7	2,9	14,4	27,3	8,5	13,7	2,6	1,7	12,4	11,1
DP-14	9,3	2,9	14,2	32,3	2,1	15,4	0,7	1,8	12,8	2,8
DP-15	8,2	2,9	17,8	30,1	0,3	15,3	0,2	1,9	15,5	0,5
DP-16	8,0	2,8	19,5	29,2	2,7	13,1	0,8	1,7	14,2	3,5

El vector binario, pWBVec8 contenía un gen de resistencia a la higromicina como marcador seleccionable para la transformación de plantas (Wang et al., 1998). La construcción, designada pVLin-Ed6 y que contenía el gen de la Δ6 ácido graso desaturasa de *Echium* para expresión específica en semillas se muestra esquemáticamente en la Figura 2. Se había demostrado anteriormente que el promotor (SEQ ID NO:23) y el terminador (SEQ ID NO:24) de linina transmitían la expresión de una forma muy específica en embriones de lino en desarrollo, que se expresaban al

máximo en semillas de lino al mismo tiempo que se acumula el aceite en las semillas de lino. Ambos elementos promotor y terminador de linina fueron capaces de impulsar la expresión específica en semillas en los transgenes del lino en niveles comparables al promotor fuertemente activo de legumbres *faseolina*.

5 Se escindieron aproximadamente 150 hipocotilos de plántulas de 6-7 días de edad de cultivares Ward de lino hechos crecer en condiciones estériles en medio MS. Se ha descubierto que este cultivar produce la mayor eficacia de transformación entre los diferentes cultivares de lino, sin embargo, otros muchos cultivares también son adecuados para la transformación génica. Los hipocotilos se inocularon y se cultivaron simultáneamente con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene la construcción binaria pVLin-Ed6 de una forma similar a la descrita para la transformación de *Brassica* en el Ejemplo 1. Tras un periodo de cultivo simultáneo de 3-4 días a 24°C, los hipocotilos se transfirieron a un medio de selección que era medio MS que contenía 200 mg/l de cefotaxima, 10 mg/l de higromicina, 1 mg/l de BAP (6-bencil-aminopurina) y 0,1 mg/l de NAA (ácido naftalenoacético). El desarrollo de los brotes se inició al cabo de 2 semanas. Los brotes se transfirieron a medio MS nuevo con los mismos aditivos, salvo que NAA se redujo a 0,02 mg/l. Después de 2-3 semanas, los brotes verdes sanos se transfirieron a medio MS nuevo sin reguladores del crecimiento para la inducción de raíces. Los brotes enraizados se plantaron con sustrato en invernadero.

La naturaleza transgénica de las plantas de lino regeneradas se confirmó mediante amplificación por PCR de la secuencia de la $\Delta 6$ ácido graso desaturasa de *Echium* con los cebadores Ed6sl, 5'-ACTCTGTTTCTGAGGTGTCCA-3' (SEQ ID NO: 19); y Ed6a1, 5'-CATATTAACCCTAGCCATACACAT-3' (SEC ID N°: 20). El ADN extraído de las plantas de lino individuales regeneradas se usó como molde en reacciones de la PCR usando las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 40 s, 58°C durante 40 s y 72°C durante 1 min. Las semillas establecidas en las primeras 40 plantas transgénicas de lino se analizaron para determinar la presencia de SDA y GLA usando extracción de lípidos seguida por cromatografía de gases. Se espera que se produzcan elevados niveles de SDA en muchas de las plantas, y que los niveles de SDA serán más grandes que los niveles de GLA.

Las semillas de las plantas o extractos de lino transformadas tales como el aceite o el grano molido grueso de semillas se puede usar para alimentar peces o crustáceos.

30

Ejemplo 6. (no forma parte de la invención) Transformación de algodón con una construcción específica de semillas que expresa una $\Delta 6$ ácido graso desaturasa de *Echium*

Las semillas de algodón contienen solamente cantidades poco importantes (<0,5 % de ácidos grasos totales) de ácido α -linolénico (ALA). Para producir ALA en mayores niveles en el aceite de algodón, se transformó algodón (*Gossypium hirsutum*) con una construcción génica específica de semillas que expresa un gen *FAD3* de *Brassica napus* (Aron del et al., 1992) (secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se proporciona como SEQ ID NO:27). El número de registro del clon de ADNc de este gen fue L01418. La región de codificación de la proteína completa del gen *FAD3* de *B. napus* se amplificó mediante la PCR usando los cebadores BnFAD3-S1, 5'-CTC- CAGCGATGGTTGTTGCTAT-3' (SEQ ID NO:21) y BnFAD3-A1, 5'-AATGTCTCTGGTGACGTAGC-3' (SEC ID N°: 22). El producto de la PCR se clonó en un vector pGEMTeasy® (Promega) y se escindió mediante digestión de restricción con *NotI*. La secuencia de codificación de *FAD3* de *B. napus* se introdujo en la orientación de sentido directo en el sitio *NotI* entre las secuencias del promotor y el terminador del gen de lectina de soja (Cho et al., 1995), para proporcionar una construcción de expresión específica en semillas. Este vector contenía un gen NPTII que transmite resistencia a la kanamicina como marcador seleccionable para la transformación de plantas. Este vector se introdujo en *Agrobacterium* y se usó en la transformación del algodón como se describe en Liu et al (2002). Se obtuvieron plantas transgénicas independientes que expresaban el gen *FAD3*, y se guardaron las líneas que acumulaban ALA.

Se llevaron a cabo experimentos de transformación usando un casete de lectina específico de semilla similar que expresaba una $\Delta 6$ ácido graso desaturasa, para convertir LA en GLA y ALA en SDA. La región de codificación de la proteína completa de la $\Delta 6$ desaturasa de *Echium plantagineum* (Zhou et al., 2006; SEQ ID NO:25) se amplificó mediante la PCR usando los siguientes cebadores que incorporan un sitio *SmaI* en el extremo 5', y *SacI* en el extremo 3'. Ed6F: 5'-ATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGGCTAATGCAATCAAGAAGTA-3' (SEQ ID NO:30) y Ed6R: 5'-TTGGAGCTCAACCATGAGTATTAAGAGCTTC-3' (SEC ID N°: 31). El fragmento de la PCR se clonó en un vector pGEM-Teasy® (Promega) y se secuenció para garantizar no se habían introducido errores inducidos por la PCR. El gen de la $\Delta 6$ desaturasa amplificada por PCR se clonó en los correspondientes sitios *SmaI/SacI* en una orientación de sentido directo detrás del promotor del nabo (Fp1) y antes de la señal de terminación con poliadenilación nos3'. La cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* que tiene la construcción resultante, pGNapinE6D, se usó para la variedad de algodón Coker315 según el método descrito por Liu et al. (2002).

60

Se obtuvieron nueve plantas fértiles transformadas independientemente. Las plantas de algodón transformadas fueron positivas para la presencia del transgén, y la expresión de las semillas en desarrollo, mediante PCR y análisis de transferencia Northern del ARN expresado. 15 semillas maduras individuales de cada una de estas plantas transgénicas primarias se sometieron al análisis de la composición de ácidos grasos usando cromatografía de gases (GC) como se ha descrito anteriormente. Sorprendentemente, se descubrieron elevados niveles de ácido γ -linolénico (GLA) que se acumulaban en cuatro líneas transgénicas, mientras que no había GLA detectable en las plantas de

65

control no transformadas. Se observaron niveles de GLA mayores del 15 % en muchas semillas, y el nivel alcanzó más del 25 % en algunas semillas que probablemente no eran homocigóticas para el gen de la $\Delta 6$ desaturasa introducido. La acumulación de GLA se realiza principalmente a expensas del ácido linoleico. De hecho, la conversión de LA en GLA (medido como $\%GLA \times 100 / (\%LA + \%GLA)$ en la oleaginosa) fue muy eficaz en estas semillas de algodón con respecto a las semillas de otras plantas, que es más del 25 % en muchas semillas y alcanza más del 45 % en algunas semillas.

Las líneas de algodón que contienen ambos genes se producirán cruzando los transformantes que expresan el gen FAD3 y los transformantes que expresan el gen de la $\Delta 6$ desaturasa, para producir líneas que contienen SDA. Según los métodos anteriormente descritos, las plantas oleaginosas como algodón o lino se pueden producir, lo que produce al menos un 5,5 % de SDA en base peso en el ácido graso de la semilla oleaginosa. Preferentemente, el nivel de SDA en el ácido graso es al menos un 11 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 % o al menos un 50 % en base de peso. La eficacia de la conversión de ALA en SDA (medido como $\%SDA \times 100 / (\%ALA + \%SDA)$ en la oleaginosa) es al menos un 25 % y preferentemente al menos un 45 %. Es decir, al menos un 25 %, preferentemente al menos un 45 % del ácido graso poliinsaturado en la semilla de algodón o lino que tiene una cadena de carbono de C18 o mayor desaturada en la posición $\Delta 6$.

Esta solicitud reivindica la prioridad respecto del documento US 60/737.946.

Cualquier discusión de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una declaración que cualquiera de estas materias forma una parte de la base de la técnica anterior o que fueran parte del conocimiento general común en el campo relevante de la presente invención tal como existe antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

REFERENCIAS

- Abbadi et al. (2001) *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 103:106-113.
- Arondel et al. (1992) *Science* 258:1353-1355.
- Barlow (2000) *Global Aquae. Advo.* 3: 85-86.
- Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.
- Baumlein et al (1992) *Plant J.* 2:233-239.
- Bell et al. (1993) *Lipids.* 28: 819-826.
- Bell et al. (2002) *J. Nutr.* 132: 222-230.
- Bell et al. (2003) *J. Nutr.* 133:2793-2801.
- Bell et al. (2004) *Lipids.* 39: 223-232.
- Berberich et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 36:297-306.
- Bilyeu et al. (2003) *Crop Sci.* 43: 1833-1838.
- Bligh y Dyer (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bransden et al. (2003) *Comp. Biochem. Physiol. B.* 135: 611-625.
- Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
- Browse y Slack (1981) *FEBS Letters* 131:111-114.
- Carter et al. (2003) *Mar. Biotechnol.* 5: 480-492.
- Cho et al. (1995) *Plant Mol Biol Rep.* 13:255-269.
- Cho et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
- Chung et al. (1999) *Plant Cell Physiol.* 40: 114-118.
- De Block et al. (1989) *Plant Physiol.* 91:694-701.
- Domergue et al. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
- Drexler et al. (2003) *J. Plant Physiol.* 160:779-802.
- FAO (2001) *Fishery statistics Vol. 88/2 aquaculture production.* FAO Fisheries series No 58/FAO Statistics series No160. FAO. 178.
- Fonseca-Madriral et al. (2005) *Aquae. Nutr.* 11: 241-250.
- Gamborg et al. (1968) *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Garcia-Maroto et al. (2002) *Lipids* 37:417-426.
- Girke et al. (1998) *Plant J.* 15:39-48.
- Guil-Guerrero et al. (2000) *Phytochemistry* 53:451-456.
- Hamada et al. (1994) *Gene* 147: 293-294.
- Hamada et al. (1996) *Plant Cell Physiol.* 37: 606-611.
- Harel et al. (2002) *Aquaculture.* 213: 347-362.
- Hastings et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14304-14309.
- Helland et al. (1996) *Aquaculture.* 139: 157-163.
- Hong et al. (2002) *Lipids* 37:863-868.
- Horiguchi et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.
- Huang et al. (1999) *Lipids* 34:649-659.
- Jones and Harwood (1980) *Biochem J.* 190:851-854.

- Kajikawa et al. (2004) *Plant Mol Biol* 54:335-352.
 Kirsch et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2079-2084.
 Leonard, et al. (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.
 Li et al. (2003) *Plant Cell* 15:1646-1661.
 5 Liu et al. (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1743.
 Metz et al. (2001) *Science* 293:290-293.
 Meyer et al. (2003) *Biochemistry* 42:9779-9788.
 Michaelson et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.
 Morita et al. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* 28:872-879.
 10 Murashige y Skoog (1962) *Physiologica Plantarum* 28:147-150.
 Napier et al. (1998) *Biochem J.* 330:611-614.
 Napier et al. (1999) *Trends in Plant Sci* 4:2-4.
 Naylor et al. (2000) *Nature.* 405: 1017-1024.
 Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
 15 Pereira et al. (2004) *Biochem. J.* 378:665-671.
 Polvi and Ackman (1992) *J Agric. Food Chem.* 40:1001-1007.
 Qi et al. (2002) *FEBS Lett.* 510:159-165.
 Qiu et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566.
 Radke et al. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 75: 685-694.
 20 Reddy et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:293-300.
 Sakamoto et al. (1997) *Mol. Microbiol.* 23: 1281-1292.
 Sakuradani et al. (1999) *Gene* 238:445-453.
 Sargent et al. (2002) *The Lipids, in Fish Nutrition, J.E. Halver, Editor. 2002, Academic Press: San Diego. p. 181-257.*
 Sayanova et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4211-4216.
 25 Sayanova et al. (1999) *Plant Physiol.* 121:641-646.
 Sayanova et al. (2003) *FEBS Lett.* 542:100-104.
 Sayanova and Napier (2004) *Phytochemistry* 65:147-158.
 Seierstad et al. (2005) *Euro. J. Clin. Invest.* 35: 52-59.
 Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.
 30 Sperling and Heinz (2001) *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 103:158-180.
 Sprecher et al. (1995) *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.
 Spsychalla et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1142-1147.
 Suga et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1314-1327.
 Takeyama et al. (1997) *Microbiology* 143:2725-2731.
 35 Tanaka et al. (1999) *Biotechnol. Lett.* 21:939-945.
 Tang et al. (1999) *Plant Physiol.* 119 : 364.
 Tanhuanpaa et al. (2002) *Mol, Breed.* 10: 51-62.
 Torstensen et al. (2004) *Aquac. Nutr.* 10: 175-192.
 van de Loo y Somerville (1994) *Plant Physiol.* 105: 443-444.
 40 Volkman y Nichols (1991) *J. Planar Chromatogr.* 4: 19-26.
 Vrinten et al. (2005) *Plant Physiol.* 139: 79-87.
 Wallis y Browse (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.
 Wang et al. (1998) *Acta Horticulturae* 461: 401-405.
 Wedemeyer 1996. *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems, Chapman & Hall, New York.*
 45 Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.
 Yadav et al. (1993) *Plant Physiol.* 103: 467-476.
 Yamamoto et al. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33: 13-20.
 Yamazaki et al. (1992) *Biochim. Biophys. Acta.* 1123: 18-26.
 Yang et al. (2004) *J. Exp. Bot.* 55: 2251-2259.
 50 Yazawa (1996) *Lipids* 31:S297-S300.
 Yu et al. (2000) *Lipids* 35:1061-1064.
 Zhang et al. (2004) *FEBS Lett.* 556:81-85.
 Zhou et al. (2006) *Plant Sci.* 170:665-673.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation University of Tasmania

<120> Piensos para acuicultura

60

<130> 505028

<150> US 60/737.946

<151> 18-11-2005-11

65

<160>31

ES 2 703 217 T3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

5 <211> 444

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

10

```

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

```

ES 2 703 217 T3

Leu Gly Glu Trp Gln Pro Ile Glu Tyr Gly Lys Lys Lys Leu Lys Tyr
 245 250 255

Leu Pro Tyr Asn His Gln His Glu Tyr Phe Phe Leu Ile Gly Pro Pro
 260 265 270

Leu Leu Ile Pro Met Tyr Phe Gln Tyr Gln Ile Ile Met Thr Met Ile
 275 280 285

Val His Lys Asn Trp Val Asp Leu Ala Trp Ala Val Ser Tyr Tyr Ile
 290 295 300

Arg Phe Phe Ile Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Gly Ile Leu Gly Ala Leu
 305 310 315 320

Leu Phe Leu Asn Phe Ile Arg Phe Leu Glu Ser His Trp Phe Val Trp
 325 330 335

Val Thr Gln Met Asn His Ile Val Met Glu Ile Asp Gln Glu Ala Tyr
 340 345 350

Arg Asp Trp Phe Ser Ser Gln Leu Thr Ala Thr Cys Asn Val Glu Gln
 355 360 365

Ser Phe Phe Asn Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu
 370 375 380

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu His Lys Ile Ala
 385 390 395 400

Pro Leu Val Lys Ser Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu Tyr Gln Glu
 405 410 415

Lys Pro Leu Leu Arg Ala Leu Leu Asp Ile Ile Arg Ser Leu Lys Lys
 420 425 430

Ser Gly Lys Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His Lys
 435 440

<210>2

<211> 444

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400>2

Met Gly Lys Gly Gly Asn Gln Gly Glu Gly Ser Thr Glu Arg Gln Ala
 1 5 10 15

Pro Met Pro Thr Phe Arg Trp Glu Glu Ile Gln Lys His Asn Leu Arg
 20 25 30

Thr Asp Arg Trp Leu Val Ile Asp Arg Lys Val Tyr Asn Val Thr Lys
 35 40 45

Trp Ser Gln Arg His Pro Gly Gly His Arg Val Ile Gly His Tyr Ser
 50 55 60

Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Arg Ala Phe His Leu Asp Leu Asp
 65 70 75 80

Phe Val Gly Lys Phe Leu Lys Pro Leu Leu Ile Gly Glu Leu Ala Pro
 85 90 95

Glu Glu Pro Ser Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ser Gln Ile Thr Glu Asp
 100 105 110

ES 2 703 217 T3

Phe Arg Ala Leu Lys Lys Thr Ala Glu Asp Met Asn Leu Phe Lys Thr
115 120 125

Asn His Leu Phe Phe Phe Leu Leu Leu Ser His Ile Ile Val Met Glu
130 135 140

Ser Leu Ala Trp Phe Ile Leu Ser Tyr Phe Gly Thr Gly Trp Ile Pro
145 150 155 160

Thr Leu Val Thr Ala Phe Val Leu Ala Thr Ser Gln Ala Gln Ala Gly
165 170 175

Trp Leu Gln His Asp Tyr Gly His Leu Ser Val Tyr Lys Lys Ser Ile
180 185 190

Trp Asn His Val Val His Lys Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly Ala
195 200 205

Ser Ala Asn Trp Trp Asn His Arg His Phe Gln His His Ala Lys Pro
210 215 220

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

Leu Gly Glu Trp Gln Pro Leu Glu Tyr Gly Lys Lys Lys Leu Lys Tyr
245 250 255

Leu Pro Tyr Asn His Gln His Glu Tyr Phe Phe Leu Ile Gly Pro Pro
260 265 270

Leu Leu Ile Pro Met Tyr Phe Gln Tyr Gln Ile Ile Met Thr Met Ile
275 280 285

Ser Arg Arg Asp Trp Val Asp Leu Ala Trp Ala Ile Ser Tyr Tyr Met
290 295 300

Arg Phe Phe Tyr Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Gly Ile Leu Gly Ala Leu
305 310 315 320

Val Phe Leu Asn Phe Ile Arg Phe Leu Glu Ser His Trp Phe Val Trp
325 330 335

Val Thr Gln Met Asn His Leu Val Met Glu Ile Asp Leu Asp His Tyr
340 345 350

Arg Asp Trp Phe Ser Ser Gln Leu Ala Ala Thr Cys Asn Val Glu Gln
355 360 365

Ser Phe Phe Asn Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu
370 375 380

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu His Lys Ile Ala
385 390 395 400

Pro Leu Val Lys Ser Leu Cys Ala Lys His Gly Ile Glu Tyr Gln Glu
405 410 415

Lys Pro Leu Leu Arg Ala Leu Ile Asp Ile Val Ser Ser Leu Lys Lys
420 425 430

Ser Gly Glu Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu His Lys
435 440

5 <210> 3
<211> 459
<212> PRT
<213> *Pythium irregulare*

ES 2 703 217 T3

<400>3

Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu
1 5 10 15
Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His
20 25 30
Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val
35 40 45
Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe
50 55 60
His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp
65 70 75 80
Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp
85 90 95
Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr
100 105 110
Arg Arg Leu Arg Val Lys Val Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser
115 120 125
Ala Leu Tyr Tyr Ala Trp Lys Leu Val Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val
130 135 140
Leu Ser Met Ala Ile Cys Phe Phe Phe Asn Ser Phe Ala Met Tyr Met
145 150 155 160
Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu
165 170 175
Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly
180 185 190
Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Val
195 200 205
Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His His Ala Val Pro Asn Leu
210 215 220
His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr
225 230 235 240
Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu
245 250 255
Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe
260 265 270
Pro Leu Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe
275 280 285
Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe
290 295 300
Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu
305 310 315 320
Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr
325 330 335
Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu Ala Leu Val Phe

ES 2 703 217 T3

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

<210> 4
 <211 > 448
 <212> PRT

5

<213> *Borago officinalis*

<400>4

ES 2 703 217 T3

Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15

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

Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu
 35 40 45

Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60

Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80

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

Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105 110

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

Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly
 130 135 140

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

Ala Gly His Tyr Met Val Val Ser Asp Ser Arg Leu Asn Lys Phe Met
 165 170 175

Gly Ile Phe Ala Ala Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
 180 185 190

ES 2 703 217 T3

Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr
 195 200 205

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

Phe Gly Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Arg Leu Thr Phe Asp
 225 230 235 240

Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser Tyr Glu His Trp Thr Phe Tyr Pro
 245 250 255

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

Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Ser Tyr Arg Ala Gln Glu Leu Leu Gly
 275 280 285

Cys Leu Val Phe Ser Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro
 290 295 300

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

Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Ser Val
 325 330 335

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

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

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

Cys Asn Leu Arg Lys Ile Ser Pro Tyr Val Ile Glu Leu Cys Lys Lys
 385 390 395 400

His Asn Leu Pro Tyr Asn Tyr Ala Ser Phe Ser Lys Ala Asn Glu Met
 405 410 415

Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asn Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Ile Thr
 420 425 430

Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu His Thr His Gly
 435 440 445

<210> 5
 <211 > 446
 <212> PRT
 <213> *Anemone leveillei*
 <400> 5

5

ES 2 703 217 T3

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

ES 2 703 217 T3

Gly Ser Ala Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe His Ile Gly Tyr Leu Gln
 65 70 75 80
 Asp Tyr Val Val Ser Asp Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu Val Ser
 85 90 95
 Glu Phe Ser Lys Ala Gly Leu Tyr Glu Lys Lys Gly His Gly His Leu
 100 105 110
 Ile Arg Leu Leu Val Met Ser Leu Val Phe Ile Ala Ser Val Ser Gly
 115 120 125
 Val Val Leu Ser Asp Lys Thr Ser Val His Val Gly Ser Ala Val Leu
 130 135 140
 Leu Ala Val Ile Trp Met Gln Phe Gly Phe Ile Gly His Asp Ser Gly
 145 150 155 160
 His Tyr Asn Ile Met Thr Ser Pro Glu Leu Asn Arg Tyr Met Gln Ile
 165 170 175
 Phe Ser Val Asn Val Val Ser Gly Val Ser Val Gly Trp Trp Lys Arg
 180 185 190
 Tyr His Asn Ala His His Ile Ala Val Asn Ser Leu Glu Tyr Asp Pro
 195 200 205
 Asp Leu Gln Tyr Val Pro Phe Leu Val Val Ser Thr Ala Ile Phe Asp
 210 215 220
 Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Arg Lys Lys Met Thr Phe Asp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Phe Leu Val Ser Phe Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro Leu Met
 245 250 255
 Ala Ile Gly Arg Val Ser Phe Leu Ala Gln Ser Ile Gly Val Leu Leu
 260 265 270
 Ser Lys Lys Pro Leu Pro Asp Arg His Leu Glu Trp Phe Gly Leu Val
 275 280 285
 Val Phe Trp Ala Trp Tyr Ser Leu Leu Ile Ser Cys Leu Pro Asn Trp
 290 295 300
 Trp Glu Arg Val Ile Phe Ile Ala Val Asn Phe Ala Val Thr Gly Ile
 305 310 315 320
 Gln His Val Gln Phe Cys Leu Asn His Tyr Ser Ala Gln Thr Tyr Ile
 325 330 335
 Gly Ala Pro Cys Ala Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Lys Gly Ser
 340 345 350
 Ile Asp Ile Ser Cys Ser Pro Trp Thr Asp Trp Phe His Gly Gly Leu
 355 360 365
 Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Pro Arg Cys Asn
 370 375 380
 Leu Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Lys Glu Leu Cys Arg Lys His Asn
 385 390 395 400
 Leu Val Tyr Thr Ser Val Ser Phe Phe Glu Gly Asn Arg Arg Thr Leu
 405 410 415
 Ala Thr Leu Lys Asn Ala Ala Leu Lys Ala Arg Asp Leu Thr Ser Pro
 420 425 430
 Ile Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Val His Thr His Gly
 435 440 445

ES 2 703 217 T3

<210>6
 <211>
 <212>PRT
 <213> *Ceratodon purpureus*

5

<400>6

```

Met Val Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gln Gly Ser Ile Glu Glu Asn
 1          5          10          15

Ile Asp Val Glu His Leu Ala Thr Met Pro Leu Val Ser Asp Phe Leu
          20          25          30

Asn Val Leu Gly Thr Thr Leu Gly Gln Trp Ser Leu Ser Thr Thr Phe
          35          40          45

Ala Phe Lys Arg Leu Thr Thr Lys Lys His Ser Ser Asp Ile Ser Val
          50          55          60

Glu Ala Gln Lys Glu Ser Val Ala Arg Gly Pro Val Glu Asn Ile Ser
 65          70          75          80

Gln Ser Val Ala Gln Pro Ile Arg Arg Arg Trp Val Gln Asp Lys Lys
          85          90          95

Pro Val Thr Tyr Ser Leu Lys Asp Val Ala Ser His Asp Met Pro Gln
          100          105          110

Asp Cys Trp Ile Ile Ile Lys Glu Lys Val Tyr Asp Val Ser Thr Phe
          115          120          125

Ala Glu Gln His Pro Gly Gly Thr Val Ile Asn Thr Tyr Phe Gly Arg
          130          135          140

Asp Ala Thr Asp Val Phe Ser Thr Phe His Ala Ser Thr Ser Trp Lys
          145          150          155          160

Ile Leu Gln Asn Phe Tyr Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr
          165          170          175

Leu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg
          180          185          190

Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu
          195          200          205

Ile Asn Val Ser Ile Val Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr
          210          215          220

Lys Ser Tyr Arg Ala Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe
          225          230          235          240

Ile Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val
          245          250          255

Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn
          260          265          270

Val Val Leu Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu
          275          280          285

His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp
          290          295          300
    
```

ES 2 703 217 T3

Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His
 325 330 335
 Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe
 340 345 350
 Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys
 355 360 365
 Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser
 370 375 380
 Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val
 385 390 395 400
 Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu
 405 410 415
 Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn
 420 425 430
 Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp
 435 440 445
 Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro
 450 455 460
 Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr
 465 470 475 480
 Leu Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser
 485 490 495
 Gly Thr Tyr Arg Val Leu Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala
 500 505 510
 Ser His Gln Gln Leu Ala Ala Ser
 515 520

<210>7

<211> 525

5 <212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400>7

ES 2 703 217 T3

Met	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Gln	Gly	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn
1				5					10					15	
Ile	Asp	Val	Glu	His	Ile	Ala	Ser	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Asp	Phe	Phe
			20					25					30		
Ser	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Trp	Ser	Val	His	Ser	Ile	Gln
		35					40					45			
Pro	Leu	Lys	Arg	Leu	Thr	Ser	Lys	Lys	Arg	Val	Ser	Glu	Ser	Ala	Ala
	50					55					60				
Val	Gln	Cys	Ile	Ser	Ala	Glu	Val	Gln	Arg	Asn	Ser	Ser	Thr	Gln	Gly
65					70					75					80
Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Lys	Pro	Thr	Arg	Arg	Arg
				85					90					95	

ES 2 703 217 T3

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys
225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe
245 250 255

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

Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys
275 280 285

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
290 295 300

Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
305 310 315 320

Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
325 330 335

Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
340 345 350

Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
355 360 365

Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
370 375 380

Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
385 390 395 400

Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
405 410 415

Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
420 425 430

Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
435 440 445

Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu

ES 2 703 217 T3

```

          450              455              460
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
465              470              475
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
          485              490
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
          500              505              510
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
          515              520              525
```

5 <210>8
<211 > 457
<212>PRT
<213> *Mortierella alpina*

<400>8

ES 2 703 217 T3

Met Ala Ala Ala Pro Ser Val Arg Thr Phe Thr Arg Ala Glu Ile Leu
1 5 10 15

Asn Ala Glu Ala Leu Asn Glu Gly Lys Lys Asp Ala Glu Ala Pro Phe
20 25 30

Leu Met Ile Ile Asp Asn Lys Val Tyr Asp Val Arg Glu Phe Val Pro
35 40 45

Asp His Pro Gly Gly Ser Val Ile Leu Thr His Val Gly Lys Asp Gly
50 55 60

Thr Asp Val Phe Asp Thr Phe His Pro Glu Ala Ala Trp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Ala Asn Phe Tyr Val Gly Asp Ile Asp Glu Ser Asp Arg Ala Ile Lys
85 90 95

Asn Asp Asp Phe Ala Ala Glu Val Arg Lys Leu Arg Thr Leu Phe Gln
100 105 110

Ser Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Ala Tyr Tyr Ala Phe Lys Val
115 120 125

Ser Phe Asn Leu Cys Ile Trp Gly Leu Ser Thr Phe Ile Val Ala Lys
130 135 140

Trp Gly Gln Thr Ser Thr Leu Ala Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu
145 150 155 160

Gly Leu Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His
165 170 175

His Gln Val Phe Gln Asp Arg Phe Trp Gly Asp Leu Phe Gly Ala Phe
180 185 190

Leu Gly Gly Val Cys Gln Gly Phe Ser Ser Ser Trp Trp Lys Asp Lys
195 200 205

His Asn Thr His His Ala Ala Pro Asn Val His Gly Glu Asp Pro Asp
210 215 220

Ile Asp Thr His Pro Leu Leu Thr Trp Ser Glu His Ala Leu Glu Met
225 230 235 240

Phe Ser Asp Val Pro Asp Glu Glu Leu Thr Arg Met Trp Ser Arg Phe

ES 2 703 217 T3

			245						250				255			
Met	Val	Leu	Asn	Gln	Thr	Trp	Phe	Tyr	Phe	Pro	Ile	Leu	Ser	Phe	Ala	
			260					265					270			
Arg	Leu	Ser	Trp	Cys	Leu	Gln	Ser	Ile	Met	Phe	Val	Leu	Pro	Asn	Gly	
		275						280				285				
Gln	Ala	His	Lys	Pro	Ser	Gly	Ala	Arg	Val	Pro	Ile	Ser	Leu	Val	Glu	
	290					295					300					
Gln	Leu	Ser	Leu	Ala	Met	His	Trp	Thr	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Met	Phe	
305					310					315					320	
Leu	Phe	Ile	Lys	Asp	Pro	Val	Asn	Met	Ile	Val	Tyr	Phe	Leu	Val	Ser	
				325					330					335		
Gln	Ala	Val	Cys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ala	Ile	Val	Phe	Ser	Leu	Asn	His	
			340					345					350			
Asn	Gly	Met	Pro	Val	Ile	Ser	Lys	Glu	Glu	Ala	Val	Asp	Met	Asp	Phe	
		355					360					365				
Phe	Thr	Lys	Gln	Ile	Ile	Thr	Gly	Arg	Asp	Val	His	Pro	Gly	Leu	Phe	
	370					375					380					
Ala	Asn	Trp	Phe	Thr	Gly	Gly	Leu	Asn	Tyr	Gln	Ile	Glu	His	His	Leu	
385					390					395					400	
Phe	Pro	Ser	Met	Pro	Arg	His	Asn	Phe	Ser	Lys	Ile	Gln	Pro	Ala	Val	
				405					410					415		
Glu	Thr	Leu	Cys	Lys	Lys	Tyr	Gly	Val	Arg	Tyr	His	Thr	Thr	Gly	Met	
			420					425					430			
Ile	Glu	Gly	Thr	Ala	Glu	Val	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Glu	Val	Ser	Lys	
		435					440					445				
Ala	Ala	Ser	Lys	Met	Gly	Lys	Ala	Gln								
	450					455										

<210>9
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> *Caenorhabditis elegans*

5

Met	Val	Val	Asp	Lys	Asn	Ala	Ser	Gly	Leu	Arg	Met	Lys	Val	Asp	Gly	
1				5					10					15		
Lys	Trp	Leu	Tyr	Leu	Ser	Glu	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	His	Pro	Gly	Gly	
		20						25					30			
Ala	Val	Ile	Glu	Gln	Tyr	Arg	Asn	Ser	Asp	Ala	Thr	His	Ile	Phe	His	
		35					40					45				
Ala	Phe	His	Glu	Gly	Ser	Ser	Gln	Ala	Tyr	Lys	Gln	Leu	Asp	Leu	Leu	
	50					55					60					
Lys	Lys	His	Gly	Glu	His	Asp	Glu	Phe	Leu	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu	Lys	
65					70					75				80		
Arg	Leu	Asp	Lys	Val	Asp	Ile	Asn	Val	Ser	Ala	Tyr	Asp	Val	Ser	Val	
				85					90					95		
Ala	Gln	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Glu	Ser	Phe	Glu	Lys	Leu	Arg	Gln	Lys	

10

ES 2 703 217 T3

100					105					110					
Leu	His	Asp	Asp	Gly	Leu	Met	Lys	Ala	Asn	Glu	Thr	Tyr	Phe	Leu	Phe
		115					120					125			
Lys	Ala	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ile	Met	Ala	Phe	Ala	Phe	Tyr	Leu	Gln
	130					135					140				
Tyr	Leu	Gly	Trp	Tyr	Ile	Thr	Ser	Ala	Cys	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Trp
145					150					155					160
Gln	Gln	Phe	Gly	Trp	Leu	Thr	His	Glu	Phe	Cys	His	Gln	Gln	Pro	Thr
				165					170					175	
Lys	Asn	Arg	Pro	Leu	Asn	Asp	Thr	Ile	Ser	Leu	Phe	Phe	Gly	Asn	Phe
			180					185					190		
Leu	Gln	Gly	Phe	Ser	Arg	Asp	Trp	Trp	Lys	Asp	Lys	His	Asn	Thr	His
		195					200					205			
His	Ala	Ala	Thr	Asn	Val	Ile	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Ile	Asp	Leu	Ala
	210					215					220				
Pro	Leu	Phe	Ala	Phe	Ile	Pro	Gly	Asp	Leu	Cys	Lys	Tyr	Lys	Ala	Ser
225					230					235					240
Phe	Glu	Lys	Ala	Ile	Leu	Lys	Ile	Val	Pro	Tyr	Gln	His	Leu	Tyr	Phe
				245					250					255	
Thr	Ala	Met	Leu	Pro	Met	Leu	Arg	Phe	Ser	Trp	Thr	Gly	Gln	Ser	Val
			260					265					270		
Gln	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Asn	Gln	Met	Glu	Tyr	Lys	Val	Tyr	Gln	Arg
		275					280					285			
Asn	Ala	Phe	Trp	Glu	Gln	Ala	Thr	Ile	Val	Gly	His	Trp	Ala	Trp	Val
	290					295					300				
Phe	Tyr	Gln	Leu	Phe	Leu	Leu	Pro	Thr	Trp	Pro	Leu	Arg	Val	Ala	Tyr
305						310				315					320
Phe	Ile	Ile	Ser	Gln	Met	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Ile	Ala	His	Val	Val
				325					330					335	
Thr	Phe	Asn	His	Asn	Ser	Val	Asp	Lys	Tyr	Pro	Ala	Asn	Ser	Arg	Ile
			340					345					350		
Leu	Asn	Asn	Phe	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Asn	Met	Thr
		355					360					365			
Pro	Ser	Pro	Phe	Ile	Asp	Trp	Leu	Trp	Gly	Gly	Leu	Asn	Tyr	Gln	Ile
		370				375					380				
Glu	His	His	Leu	Phe	Pro	Thr	Met	Pro	Arg	Cys	Asn	Leu	Asn	Ala	Cys
385						390					395				400
Val	Lys	Tyr	Val	Lys	Glu	Trp	Cys	Lys	Glu	Asn	Asn	Leu	Pro	Tyr	Leu
				405					410					415	
Val	Asp	Asp	Tyr	Phe	Asp	Gly	Tyr	Ala	Met	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Lys
			420					425					430		
Asn	Met	Ala	Glu	His	Ile	Gln	Ala	Lys	Ala	Ala					
		435					440								

<210>10
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> *Echium plantagineum*

ES 2 703 217 T3

<400> 10

Met Ala Asn Ala Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ala Glu Glu Leu Lys Lys
1 5 10 15
His Asp Lys Ala Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ile Tyr
20 25 30
Asp Val Ser Asp Trp Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Asn Phe Pro Leu
35 40 45
Leu Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
50 55 60
Ser Gly Thr Thr Trp Lys Leu Leu Glu Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
65 70 75 80
Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
85 90 95
Val Phe Glu Phe Asn Lys Met Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His Ile
100 105 110
Val Leu Val Thr Val Leu Phe Ile Ala Met Leu Phe Gly Met Ser Val
115 120 125
Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Leu Ala Gly
130 135 140
Gly Leu Met Gly Phe Val Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
145 150 155 160
Ala Gly His Tyr Ile Val Met Pro Asp Ala Arg Leu Asn Lys Leu Met
165 170 175
Gly Ile Val Ala Ala Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
180 185 190
Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr
195 200 205
Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Leu
210 215 220
Phe Ser Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Lys Leu Thr Phe Asp
225 230 235 240
Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser His Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro
245 250 255
Val Met Cys Met Ala Arg Val Asn Met Phe Val Gln Ser Leu Ile Met
260 265 270
Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Phe Tyr Arg Ser Gln Glu Leu Leu Gly
275 280 285
Leu Val Val Phe Trp Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro
290 295 300
Asn Trp Gly Glu Arg Val Met Phe Val Val Ala Ser Leu Ser Val Thr
305 310 315 320
Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Ser Val
325 330 335

ES 2 703 217 T3

Tyr Val Gly Gln Pro Lys Gly Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Cys
 340 345 350

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

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

Cys His Leu Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Met Glu Leu Cys Lys Lys
 385 390 395 400

His Asn Leu Ser Tyr Asn Cys Ala Ser Phe Ser Glu Ala Asn Asn Met
 405 410 415

Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asp Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr
 420 425 430

Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu Asn Thr His Gly
 435 440 445

<210> 11

<211> 448

5 <212>PRT

<213> *Echium gentianoides*

<400> 11

ES 2 703 217 T3

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

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

Asp Val Ser Asp Trp Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Lys Phe Pro Leu
 35 40 45

Leu Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60

Ser Gly Ser Thr Trp Lys Phe Leu Asp Ser Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80

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

Val Phe Glu Phe Asn Lys Met Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105 110

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

Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Leu Ala Gly
 130 135 140

Gly Leu Met Gly Phe Val Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
 145 150 155 160

Ala Gly His Tyr Ile Val Met Pro Asn Pro Arg Leu Asn Lys Leu Met
 165 170 175

Gly Ile Val Ala Gly Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
 180 185 190

Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr
 195 200 205

ES 2 703 217 T3

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

Phe Ser Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Lys Leu Thr Phe Asp
 225 230 235 240

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

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

Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Phe Tyr Arg Ser Gln Glu Leu Leu Gly
 275 280 285

Leu Val Val Phe Trp Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro
 290 295 300

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

Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ala Ser Val
 325 330 335

Tyr Val Gly Gln Pro Lys Gly Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Cys
 340 345 350

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

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

Cys His Leu Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Met Glu Leu Cys Lys Lys
 385 390 395 400

His Asn Leu Ser Tyr Asn Cys Ala Ser Phe Ser Glu Ala Asn Glu Met
 405 410 415

Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asp Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr
 420 425 430

Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu Asn Thr His Gly
 435 440 445

<210> 12
 <211 > 448
 <212>PRT
 <213> *Echium pitardii*

5

<400 12

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

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

Asp Val Ser Asp Trp Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Lys Phe Pro Leu
 35 40 45

Leu Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His
 50 55 60

Ser Gly Ser Thr Trp Lys Leu Leu Asp Ser Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr
 65 70 75 80

ES 2 703 217 T3

Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu
 85 90 95
 Val Phe Glu Phe Asn Lys Met Gly Leu Phe Asp Lys Lys Gly His Ile
 100 105 110
 Val Leu Val Thr Val Phe Phe Ile Ala Met Met Phe Ala Met Ser Val
 115 120 125
 Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Leu Ala Gly
 130 135 140
 Gly Leu Met Gly Phe Val Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp
 145 150 155 160
 Ala Gly His Tyr Ile Val Met Pro Asn Pro Lys Leu Asn Lys Leu Met
 165 170 175
 Gly Ile Val Ala Ser Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp
 180 185 190
 Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Asp Tyr
 195 200 205
 Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Leu
 210 215 220
 Phe Ser Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Lys Leu Thr Phe Asp
 225 230 235 240
 Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser His Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Val Met Cys Ser Ala Arg Val Asn Met Phe Val Gln Ser Leu Ile Met
 260 265 270
 Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Phe Tyr Arg Ser Gln Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Leu Val Val Phe Trp Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro
 290 295 300
 Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Val Val Ala Ser Leu Ser Val Thr
 305 310 315 320
 Gly Leu Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ala Ala Ser Val
 325 330 335
 Tyr Val Gly Gln Pro Lys Gly Ile Asp Trp Phe Glu Lys Gln Thr Cys
 340 345 350
 Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Pro Ser Trp Met Asp Trp Phe His Gly
 355 360 365
 Gly Leu Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro Lys Leu Pro Arg
 370 375 380
 Cys His Leu Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Met Glu Leu Cys Lys Lys
 385 390 395 400
 His Asn Leu Ser Tyr Asn Cys Ala Ser Phe Ser Gln Ala Asn Glu Met
 405 410 415
 Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asp Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Leu Thr
 420 425 430
 Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu Asn Thr His Gly
 435 440 445

<210> 13
<211 > 444

ES 2 703 217 T3

<212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 13

5

Met Gly Gly Gly Gly Gln Gln Thr Asp Arg Ile Thr Asp Thr Asn Gly
 1 5 10 15
 Arg Phe Ser Ser Tyr Thr Trp Glu Glu Val Gln Lys His Thr Lys His
 20 25 30
 Gly Asp Gln Trp Val Val Val Glu Arg Lys Val Tyr Asn Val Ser Gln
 35 40 45
 Trp Val Lys Arg His Pro Gly Gly Leu Arg Ile Leu Gly His Tyr Ala
 50 55 60
 Gly Glu Asp Ala Thr Glu Ala Phe Thr Ala Phe His Pro Asn Leu Gln
 65 70 75 80
 Leu Val Arg Lys Tyr Leu Lys Pro Leu Leu Ile Gly Glu Leu Glu Ala
 85 90 95
 Ser Glu Pro Ser Gln Asp Arg Gln Lys Asn Ala Ala Leu Val Glu Asp
 100 105 110
 Phe Arg Ala Leu Arg Glu Arg Leu Glu Ala Glu Gly Cys Phe Lys Thr
 115 120 125
 Gln Pro Leu Phe Phe Ala Leu His Leu Gly His Ile Leu Leu Leu Glu
 130 135 140
 Ala Ile Ala Phe Met Met Val Trp Tyr Phe Gly Thr Gly Trp Ile Asn
 145 150 155 160
 Thr Leu Ile Val Ala Val Ile Leu Ala Thr Ala Gln Ser Gln Ala Gly
 165 170 175
 Trp Leu Gln His Asp Phe Gly His Leu Ser Val Phe Lys Thr Ser Gly
 180 185 190
 Met Asn His Leu Val His Lys Phe Val Ile Gly His Leu Lys Gly Ala
 195 200 205
 Ser Ala Gly Trp Trp Asn His Arg His Phe Gln His His Ala Lys Pro
 210 215 220
 Asn Ile Phe Lys Lys Asp Pro Asp Val Asn Met Leu Asn Ala Phe Val
 225 230 235 240
 Val Gly Asn Val Gln Pro Val Glu Tyr Gly Val Lys Lys Ile Lys His
 245 250 255
 Leu Pro Tyr Asn His Gln His Lys Tyr Phe Phe Phe Ile Gly Pro Pro
 260 265 270
 Leu Leu Ile Pro Val Tyr Phe Gln Phe Gln Ile Phe His Asn Met Ile
 275 280 285
 Ser His Gly Met Trp Val Asp Leu Leu Trp Cys Ile Ser Tyr Tyr Val
 290 295 300
 Arg Tyr Phe Leu Cys Tyr Thr Gln Phe Tyr Gly Val Phe Trp Ala Ile
 305 310 315 320

ES 2 703 217 T3

Ile Leu Phe Asn Phe Val Arg Phe Met Glu Ser His Trp Phe Val Trp
 325 330 335
 Val Thr Gln Met Ser His Ile Pro Met Asn Ile Asp Tyr Glu Lys Asn
 340 345 350
 Gln Asp Trp Leu Ser Met Gln Leu Val Ala Thr Cys Asn Ile Glu Gln
 355 360 365
 Ser Ala Phe Asn Asp Trp Phe Ser Gly His Leu Asn Phe Gln Ile Glu
 370 375 380
 His His Leu Phe Pro Thr Val Pro Arg His Asn Tyr Trp Arg Ala Ala
 385 390 395 400
 Pro Arg Val Arg Ala Leu Cys Glu Lys Tyr Gly Val Lys Tyr Gln Glu
 405 410 415
 Lys Thr Leu Tyr Gly Ala Phe Ala Asp Ile Ile Arg Ser Leu Glu Lys
 420 425 430
 Ser Gly Glu Leu Trp Leu Asp Ala Tyr Leu Asn Lys
 435 440

5 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Motivo conservado de d6 desaturadas
 <400> 14

Met Ala Asn Ala Ile Lys Lys Tyr
 1 5

15 <210> 15
 <211> 7
 <212>PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Motivo conservado de d6 desaturadas
 <400> 15

Glu Ala Leu Asn Thr His Gly
 1 5

25 <210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Motivo conservado de d6 desaturadas
 <400> 16

His Pro Gly Gly
 1

ES 2 703 217 T3

<210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223>Cebador de oligonucleótido
 <400> 17
 10 actcgagcca ccatggctaa tgcaatcaa 29
 <210> 18
 <211> 28
 <212>ADN
 15 <213>Artificial
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido
 20 <400> 18
 cctcgagctc aaccatgagt attaagag 28
 <210> 19
 <211>21
 25 <212>ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido
 30 <400> 19
 actctgtttc tgaggtgtcc a 21
 <210> 20
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213>Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador de oligonucleótido
 <400> 20
 catattaacc ctagccatac acat 24
 45 <210>21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213>Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido
 <400> 21
 55 ctccagcgat ggtgttgct at 22
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido
 <400> 22
 65 aatgtctctg gtagcgtagc 20

ES 2 703 217 T3

<210> 23
 <211> 2070
 <212> ADN
 <213> *Linum usitatissimum*

5

<400> 23
 ctgactcaa gcatacggac aagggtaaat aacatagtca ccagaacata ataaacaaaa 60
 agtgcagaag caagactaaa aaaattagct atggacattc aggttcatat tggaaacatc 120
 attatcctag tcttgtgacc atccttcctc ctgctctagt tgagaggcct tgggactaac 180
 gagaggtcag ttgggatagc agatccttat cctggactag cctttctggg gtttcagagt 240
 cttogtgccg ccgtctacat ctatctccat taggtctgaa gatgactctt cacaccaacg 300
 acgtttaagg tctctatcct actcctagct tgcaatacct ggcttgcaat acctggagca 360
 tcgtgcacga tgattggata ctgtggagga ggagtgtttg ctgatttaga gctcccgggt 420
 ggggtgattg acttogatth cagtttaggc ttgttgaaat ttttcagggt ccattgtgaa 480
 gccttttagag cttgagcttc cttccatggt aatgccttga tcgaattctc ctagagaaaa 540
 gggaaagtcga tctctgagta ttgaaatcga agtgcacatt ttttttcaac gtgtccaatc 600
 aatccacaaa caaagcagaa gacaggtaat ctttcatact tatactgaca agtaatagtc 660
 ttaccgtcat gcataataac gtctcgttcc ttcaagaggg gttttccgac atccataacg 720
 acccgaagcc tcatgaaagc attagggaaag aacttttggg tcttcttgtc atggccttta 780
 taggtgtcag ccgagctcgc caattcccgt ccgactggct ccgcaaaata ttcgaacggc 840
 aagttatgga cttgcaacca taactccacg gtattgagca ggacctattg tgaagactca 900
 tctcatggag cttcagaatg tggttgtcag caaaccaatg accgaaatcc atcacatgac 960
 ggacgtccag tgggtgagcg aaacgaaaca ggaagcgcct atctttcaga gtcgtgagct 1020
 ccacaccgga ttccggcaac tacgtgttgg gcaggcttcg ccgtattaga gatatgttga 1080
 ggcagacca tctgtgccac tcgtacaatt acgagagttg ttttttttgt gattttccta 1140
 gtttctcgtt gatggtgagc tcatattcta catcgtatgg tctctcaacg tcgtttcctg 1200
 tcatctgata tcccgtcatt tgcattccac tgcgcgcct cccgtgccaa gtccttaggt 1260
 gtcattgcacg ccaaattggt ggtggtgcgg gctgccctgt gcttcttacc gatgggtgga 1320
 ggttgagttt ggggtctcc gcggcgatgg tagtgggttg acggtttggt gtgggtgac 1380
 ggcattgatc aatttacttc ttgcttcaa ttctttggca gaaaacaatt cattagatta 1440
 gaactggaaa ccagagtgat gagacggatt aagtcagatt ccaacagagt tacatctctt 1500
 aagaaataat gtaaccctt tagactttat atatttgcaa ttaaaaaaat aatttaactt 1560
 ttagacttta tatatagttt taataactaa gtttaaccac tctattattt atatcgaac 1620
 tatttgtatg tctcccctct aaataaactt ggtattgtgt ttacagaacc tataatcaaa 1680
 taatcaatac tcaactgaag tttgtgcagt taattgaagg gattaacggc caaatgcac 1740

ES 2 703 217 T3

tagtattatc aaccgaatag attcacacta gatggccatt tccatcaata tcatcgccgt 1800
 tcttcttctg tccacatatc coctctgaaa cttgagagac acctgcactt cattgtcctt 1860
 attacgtggt acaaaatgaa acccatgcat ccatgcaaac tgaagaatgg cgcaagaacc 1920
 cttcccctcc atttcttatg tggcgacat coatttcacc atctcccgct ataaaacacc 1980
 cccatcactt cacctagaac atcatcacta cttgcttata catccaaaag ataccacca 2040
 tggatccctg cagtaaatcc cgggctcgag 2070

<210> 24

<211> 476

5 <212> ADN

<213> *Linum usitatissimum*

<400> 24

ctcgagcaag cttatgtgac gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata 60
 ataaagccac aaagtgagaa tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg 120
 gtgctaattt tgtatcgtat tgtcaataaa tcatgaattt tgtggttttt atgtgttttt 180
 ttaaatacatg aatttttaaat tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata 240
 tccatgcatg gatgtttctt taccaaaatc tagttcttga gaggcgttcc aaagatccca 300
 aacgaaacat attatctata ctaatactat attattaatt actactgccg ggaatcacia 360
 tcctgaatg attcctatta actacaagcc ttgttggcgg cggagaagtg atcggcgcgg 420
 10 cgagaagcag cggactcgga gacgaggcct tggaagatct gagtcgacac gggccc 476

<210> 25

<211> 1425

15 <212> ADN

<213> *Echium plantagineum*

<400> 25

ES 2 703 217 T3

atgaagcatc accgaacagt tctgcaacta tccctcaaaa gctttaaaat gaacaacaag 60
 gaacagagca accaccatgg ctaatgcaat caagaagtac attactgcag aggagctgaa 120
 gaagcatgat aaagcagggg atctctggat ctccattcaa ggaaaaatct atgatgtttc 180
 agattgggtg aaggaccatc caggtgggaa cttccccttg ctgagccttg ctggccaaga 240
 ggtaactgat gcatttggtg catttcattc tggtaacaact tggagcttc ttgaaaaatt 300
 cttcactggt tattacctta aagattactc tgtttotgag gtgtccaaag attacaggaa 360
 gcttggtgtt gagtttaata aaatgggctt gtttgacaaa aagggtcata ttgttcttgt 420
 gactgtcttg tttatagcta tgttgtttg tatgagtgtt tatggggttt tgttttgtga 480
 ggggtgtttg gtacatttgc ttgctggggg gttgatgggt tttgtctgga ttcagagtgg 540
 ttggattggt catgatgctg ggcattatat tgttatgcct gatgctaggc ttaataagct 600
 tatgggtatt gttgotgcca attgtttatc tggaaataagc attggttggt ggaaatggaa 660
 ccataatgca catcacattg cctgtaatag cctcgattac gaccggatt tgcagtacat 720
 tccgtttctt gttgtgtcgt ccaagttgtt tagctcgctc acctctcatt tctatgaaaa 780
 gaaactgaca tttgactcct tatogagatt ctttgtaagc catcagcatt ggacgtttta 840
 cccggttatg tgtatggcta gggttaatat gtttgtgcag tctctgataa tgttgttgac 900
 taagcgaaat gtgttctata gaagtcaaga actggtggga ttggtggtgt tttggatttg 960
 gtaccctgtt cttgtttcct gcttgccctaa ttggggagaa cgagtaatgt tcgttgttgc 1020
 tagtctctcg gtgactggaa tgcaacaagt gcagttctct ttgaaccatt tctcgtcgag 1080
 tgtttatggt ggtcagccta aagggaacga ttggttcgag aaacaaacat gtgggacgct 1140
 cgacatttct tgcccttcgt ggatggattg gtttcatggt ggattgcaat tccaagttga 1200
 gcatcatttg ttccctaagc tgcccagatg ccaccttogg aaaatctccc cgttcgtgat 1260
 ggagttatgc aagaagcata atttgtctta caattgtgca tctttctccg aggccaacaa 1320
 tatgacactc agaacattaa gggacacagc attgcaagct cgcgatttaa ccaagccgct 1380
 cccaagaat ttggtatggg aagctcttaa tactcatggt tgagc 1425

5 <210 26
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> *Perillafrutescens*

10 <400> 26

ES 2 703 217 T3

Met Ala Val Ser Ser Gly Ala Arg Leu Ser Lys Ser Gly Ala Asp Gly
1 5 10 15

Glu Val Phe Asp Gly Gln Gln Gln Tyr Glu Gly Ile Gly Lys Arg Ala
20 25 30

Ala Asp Lys Phe Asp Pro Ala Ala Pro Pro Pro Phe Lys Ile Ala Asp
35 40 45

Ile Arg Ala Ala Ile Pro Ala His Cys Trp Val Lys Ser Pro Trp Arg
50 55 60

Ser Leu Ser Tyr Val Val Trp Asp Val Ala Ala Val Ser Ala Arg Pro
65 70 75 80

Ala Ala Val Tyr Ile Asn Ser Trp Ala Phe Trp Pro Val Tyr Trp Ile
85 90 95

Ala Gln Gly Thr Met Phe Trp Ala Leu Phe Val Leu Gly His Asp Cys
100 105 110

Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Asn Thr Thr Leu Asn Asn Val Val Gly
115 120 125

His Val Leu His Ser Ser Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp Arg Ile
130 135 140

Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val Glu Lys Asp Glu
145 150 155 160

Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Asn Leu Tyr Lys Lys Leu Asp Phe Ser
165 170 175

Thr Lys Phe Leu Arg Tyr Lys Ile Pro Phe Pro Met Phe Ala Tyr Pro
180 185 190

Leu Tyr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Thr Gly Ser His Phe Asn
195 200 205

ES 2 703 217 T3

Pro Tyr Ser Asp Leu Phe Lys Pro Asn Glu Arg Gly Leu Ile Val Thr
 210 215 220

Ser Thr Met Cys Trp Ala Ala Met Gly Val Phe Leu His Tyr Ala Thr
 225 230 235 240

Thr Ile Val Gly Pro Asn Met Met Phe Lys Leu Tyr Gly Val Pro Tyr
 245 250 255

Leu Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Thr Val Thr Tyr Leu His His His
 260 265 270

Gly Tyr Asp Lys Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Ser Lys Glu Trp Ile Tyr
 275 280 285

Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Val Asp Gln Asp Tyr Gly Phe Phe Asn
 290 295 300

Lys Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His His Leu Phe Pro
 305 310 315 320

Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Glu Ala Thr Arg Glu Ala Lys Arg
 325 330 335

Val Leu Gly Asn Tyr Tyr Arg Glu Pro Arg Lys Ser Gly Pro Val Pro
 340 345 350

Leu His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Lys Ser Leu Gly Arg Asp His Tyr
 355 360 365

Val Ser Asp Asn Gly Asp Ile Val Tyr Tyr His Thr Val Asp Glu Leu
 370 375 380

Phe Pro Ser Lys Lys Ile
 385 390

<210> 27
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Brassica napus*

5

<400> 27

ES 2 703 217 T3

Met	Val	Val	Ala	Met	Asp	Gln	Arg	Ser	Asn	Val	Asn	Gly	Asp	Ser	Gly
1				5					10					15	
Ala	Arg	Lys	Glu	Glu	Gly	Phe	Asp	Pro	Ser	Ala	Gln	Pro	Pro	Phe	Lys
			20					25					30		
Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Ala	Ala	Ile	Pro	Lys	His	Cys	Trp	Val	Lys	Ser
		35					40					45			
Pro	Leu	Arg	Ser	Met	Ser	Tyr	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Phe	Ala	Val	Ala
	50					55					60				
Ala	Leu	Ala	Met	Ala	Ala	Val	Tyr	Phe	Asp	Ser	Trp	Phe	Leu	Trp	Pro
65					70					75					80
Leu	Tyr	Trp	Val	Ala	Gln	Gly	Thr	Leu	Phe	Trp	Ala	Ile	Phe	Val	Leu
				85					90					95	
Gly	His	Asp	Cys	Gly	His	Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Ile	Pro	Leu	Leu	Asn
			100					105					110		
Ser	Val	Val	Gly	His	Ile	Leu	His	Ser	Phe	Ile	Leu	Val	Pro	Tyr	His
		115					120					125			

ES 2 703 217 T3

Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val
 130 135 140

Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Lys Leu Tyr Lys Asn
 145 150 155 160

Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val Pro Leu Pro Met
 165 170 175

Leu Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Glu Gly
 180 185 190

Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Pro Ser Glu Arg Lys
 195 200 205

Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Met Leu Ala Thr Leu
 210 215 220

Val Tyr Leu Ser Phe Leu Val Asp Pro Val Thr Val Leu Lys Val Tyr
 225 230 235 240

Gly Val Pro Tyr Ile Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Ala Val Thr Tyr
 245 250 255

Leu His His His Gly His Asp Glu Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
 260 265 270

Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr
 275 280 285

Gly Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His
 290 295 300

His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp Ala Thr Arg
 305 310 315 320

Ala Ala Lys His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser
 325 330 335

Gly Ala Ile Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys
 340 345 350

Lys Asp His Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr
 355 360 365

Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ser Lys Ile Asn
 370 375 380

<210> 28
 211> 386
 <212> PRT
 <213> *Betula pendula*
 <400> 28

5

ES 2 703 217 T3

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

ES 2 703 217 T3

Val Phe Val Val Ile Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ile Tyr Phe Lys Ala
65 70 75 80

Trp Ile Phe Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Ala Gln Gly Thr Met Phe Trp
85 90 95

Ala Leu Phe Val Leu Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp
100 105 110

Asn Pro Glu Leu Asn Asn Leu Val Gly His Val Leu His Ser Ala Ile
115 120 125

Leu Val Pro Tyr His Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln
130 135 140

Asn His Gly Asn Val Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val Pro Leu Thr Glu
145 150 155 160

Lys Leu Tyr Lys Ser Leu Gly Tyr Ser Thr Arg Leu Leu Arg Phe Thr
165 170 175

Val Pro Phe Pro Leu Phe Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu Trp Ser Arg Ser
180 185 190

Pro Gly Lys Glu Gly Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Asn Leu Phe Ser
195 200 205

Pro Asn Glu Arg Lys Asp Val Ile Thr Ser Thr Leu Cys Trp Ser Leu
210 215 220

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

Met Leu Lys Leu Tyr Gly Val Pro His Leu Ile Phe Val Met Trp Leu
245 250 255

Asp Leu Val Thr Tyr Leu His His His Gly Tyr Glu Gln Lys Leu Pro
260 265 270

Trp Tyr Arg Gly Lys Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr
275 280 285

Val Asp Arg Asp Tyr Gly Trp Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly
290 295 300

Thr His Val Ile His His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu
305 310 315 320

Val Glu Ala Thr Asn Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Lys Tyr Tyr Arg
325 330 335

Glu Pro Lys Arg Ser Gly Pro Phe Pro Ile His Leu Ile Lys Asn Leu
340 345 350

Val Arg Ser Ile Ser Glu Asp His Tyr Val Asn Asp Asn Gly Asp Ile
355 360 365

Val Tyr Tyr Gln Thr Asp Pro Glu Leu Tyr Lys Ser Ser Asn Thr Lys
370 375 380

Ser Asp
385

<210>29
<211> 386

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 29

5

ES 2 703 217 T3

Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Thr Asn Val Asn Gly Asp Pro Gly
1 5 10 15

Ala Gly Asp Arg Lys Lys Glu Glu Arg Phe Asp Pro Ser Ala Gln Pro
20 25 30

Pro Phe Lys Ile Gly Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp
35 40 45

Val Lys Ser Pro Leu Arg Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Ile
50 55 60

Ala Val Ala Ala Leu Ala Ile Ala Ala Val Tyr Val Asp Ser Trp Phe
65 70 75 80

Leu Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile
85 90 95

Phe Val Leu Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro
100 105 110

Leu Leu Asn Ser Val Val Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu Val
115 120 125

Pro Tyr His Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His
130 135 140

Gly His Val Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Arg Val
145 150 155 160

Tyr Lys Lys Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val Pro
165 170 175

Leu Pro Met Leu Ala Tyr Pro Leu Tyr Leu Cys Tyr Arg Ser Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Gly Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Pro Ser
195 200 205

Glu Arg Lys Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Met Phe
210 215 220

Val Ser Leu Ile Ala Leu Ser Phe Val Phe Gly Pro Leu Ala Val Leu
225 230 235 240

Lys Val Tyr Gly Val Pro Tyr Ile Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Ala
245 250 255

Val Thr Tyr Leu His His His Gly His Asp Glu Lys Leu Pro Trp Tyr
260 265 270

Arg Gly Lys Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Ile Asp
275 280 285

Arg Asp Tyr Gly Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His
290 295 300

Val Ile His His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp
305 310 315 320

Ala Thr Lys Ala Ala Lys His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro
325 330 335

ES 2 703 217 T3

Lys Thr Ser Gly Ala Ile Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val Ala
 340 345 350

Ser Ile Lys Lys Asp His Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asp Ile Val Phe
 355 360 365

Tyr Glu Thr Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ser Lys
 370 375 380

Ile Asn
 385

- 5 <210> 30
- <211> 46
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador de oligonucleótido

- <400> 30
- atccccgggt accggtcgcc accatggcta atgcaatcaa gaagta 46

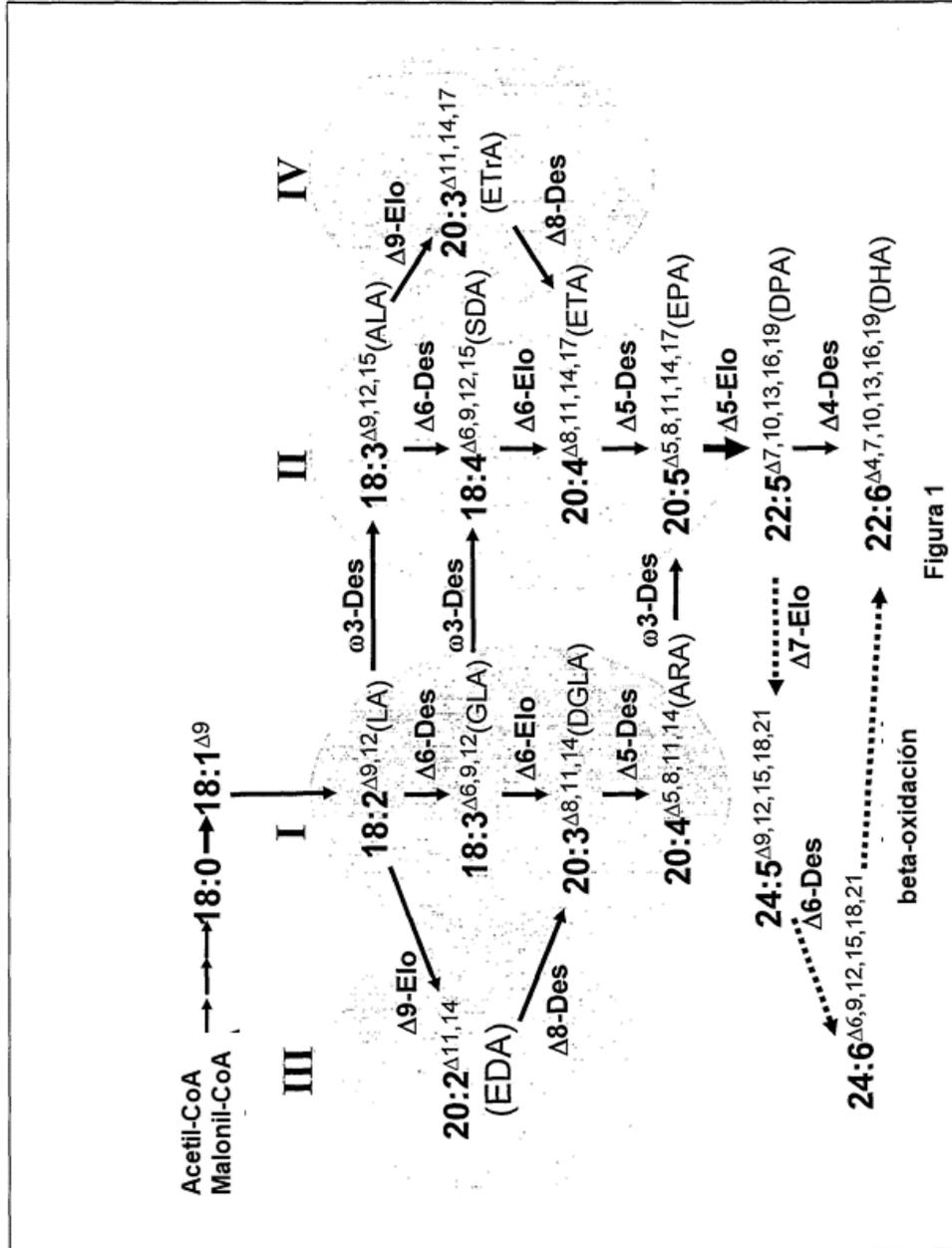
- 15 <210> 31
- <211 > 31
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador de oligonucleótido

- <400> 31
- ttggagctca accatgagta ttaagagctt c 31

REIVINDICACIONES

1. Un método para criar un salmón que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, comprendiendo el método alimentar el salmón con un pienso que comprende lípido, comprendiendo los ácidos grasos libres y esterificados del lípido total del pienso al menos un 5,5 % (p/p) de ácido estearidónico (SDA), en donde el salmón, tras haberse alimentado con el pienso durante al menos 6 semanas, tiene niveles de SDA y ácido eicosatetraenoico (ETA) más altos en el tejido muscular cuando se compara con un salmón alimentado con el mismo pienso pero que carece prácticamente de SDA.
2. El método de la reivindicación 1 en el que los ácidos grasos libres y esterificados de dicho lípido total comprenden al menos un 11 % (p/p) de SDA.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el lípido del pienso comprende un lípido vegetal.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la planta es una planta transgénica que comprende una $\Delta 6$ desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 75 % a la secuencia de aminoácidos definida en el n.º de registro de GenBank AY234127.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que los ácidos grasos libres y esterificados del lípido total del músculo blanco del salmón obtenido mediante el mismo comprende menos del 29,6 % de ácido graso saturado (SFA), al menos un 18,3 % de ácido docosahexanoico (DHA), y al menos un 2,1 % de SDA.
6. El método de la reivindicación 5, en el que los ácidos grasos libres y esterificados del lípido total del músculo blanco del salmón comprenden al menos un 2,7 % de SDA.
7. Un pienso adecuado para un salmón que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, comprendiendo el pienso lípido, comprendiendo los ácidos grasos libres y esterificados del lípido total del pienso al menos un 11 % (p/p) de ácido estearidónico (SDA), en donde el pienso comprende uno o más de harina de pescado en una cantidad de 20 a 700 g por kg de peso seco, una fuente de proteínas que no sea harina de pescado y almidón a 10-150 g/kg, y en donde la fuente de proteína comprende trigo u otro gluten de cereal, harina de soja, harina de otras legumbres, caseína, sangre o plumas.
8. El pienso de la reivindicación 7, en el que el lípido comprende un lípido vegetal.
9. El pienso de la reivindicación 8, en el que la planta es una planta transgénica que comprende una $\Delta 6$ desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 75 % a la secuencia de aminoácidos definida en el n.º de registro de GenBank AY234127.
10. Un salmón que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, en donde los ácidos grasos libres y esterificados del lípido total del músculo blanco del salmón tienen menos del 29,6 % de SFA, al menos un 18,3 % de ácido docosahexanoico (DHA) y al menos un 2,7 % de ácido estearidónico (SDA).
11. El salmón de acuerdo con la reivindicación 10, en donde los ácidos grasos libres y esterificados del lípido total del músculo blanco del salmón comprenden al menos un 3,5 % de SDA.
12. Un método para producir un pienso para salmón que es un *Salmo sp.* o un *Oncorhynchus sp.*, comprendiendo el método premezclar aceite obtenido de una planta con al menos otro ingrediente seleccionado entre harina de pescado en una cantidad de 20 a 700 g por kg de peso seco, una fuente de proteínas que no sea harina de pescado y almidón a 10-150 g/kg, para producir un pienso que comprende lípido y dicho otro ingrediente, comprendiendo los ácidos grasos libres y esterificados del lípido del pienso al menos un 11 % (p/p) de ácido estearidónico (SDA), en donde la fuente de proteína comprende trigo u otro gluten de cereal, harina de soja, harina de otras legumbres, caseína, sangre o plumas.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha planta es una planta transgénica que comprende una $\Delta 6$ desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 75 % a la secuencia de aminoácidos definida en el n.º de registro de GenBank AY234127.
14. Un método para producir un aceite de pescado que comprende ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexanoico (DHA) o cualquier combinación de los mismos, comprendiendo dicho método extraer aceite de un salmón de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11.



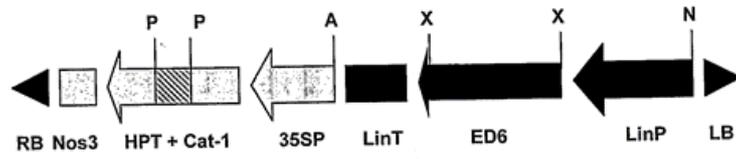


Figura 2