

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 448**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**A61K 8/92** (2006.01)

**A61K 31/202** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2013 PCT/GB2013/050955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13153404**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2013 E 13718360 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2836599**

54 Título: **Producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga**

30 Prioridad:

**12.04.2012 GB 201206483**

**10.12.2012 GB 201222184**

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

**25.06.2020**

73 Titular/es:

**ROTHAMSTED RESEARCH LIMITED (100.0%)  
West Common Harpenden  
Hertfordshire AL5 2JQ, GB**

72 Inventor/es:

**NAPIER, JOHNATHAN;  
SAYANOVA, OLGA;  
LOPEZ, NOEMI RUIZ y  
HASLAM, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**RIZZO , Sergio**

ES 2 769 448 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

Producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga

Campo de la invención

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una planta o célula de semilla oleaginosa recombinante para producir ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga, como ácido eicosapentaenoico (EPA, por sus siglas en inglés) y ácido docosahexaenoico (DHA, por sus siglas en inglés). La invención se refiere además al aceite producido por dicha planta o célula de semilla oleaginosa recombinante.

Antecedentes de la invención

10 **[0002]** Dos familias principales de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos omega-3, ejemplificados por el EPA, y los ácidos grasos omega-6, ejemplificados por el ácido araquidónico (Figura 1).

**[0003]** El material de partida para la ruta metabólica del omega-6 es el ácido graso ácido linoleico mientras que la ruta del omega-3 transcurre por medio del ácido linolénico. El ácido linoleico está formado por la actividad de una desaturasa omega-3 (Tocher et al. 1998, *Prog. Lipid Res.* 37, 73-117; Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 4105-4113).

15 **[0004]** Los ácidos grasos altamente insaturados omega-3 se reconocen como compuestos dietéticos importantes para prevenir la arteriosclerosis y enfermedades coronarias, para paliar enfermedades inflamatorias y para atrasar el crecimiento de células tumorales. Estos efectos beneficiosos son resultado tanto de ácidos grasos altamente insaturados omega-3 que causan una inhibición competitiva de compuestos producidos a partir de ácidos grasos omega-6, como de compuestos beneficiosos producidos directamente a partir de los propios  
20 ácidos grasos altamente insaturados omega-3 (Simopoulos et al. (1986) *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*, Academic Press, Nueva York).

**[0005]** Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga son cruciales para el desarrollo del cerebro y el funcionamiento normal del mismo (Neuringer, et al., (1988) *Annu Rev Nutr* 8, 517-541), con el DHA particularmente importante para el funcionamiento del cerebro debido a su influencia en las propiedades de la membrana neural, que modula la señalización celular (Uauy, R., & Dangour, A. D. (2006) *Nutr Rev* 64, S24-33; discusión S72-91). La concentración de DHA en el cerebro disminuye con la edad en los humanos, lo que se ha postulado que es consecuencia de un deterioro relacionado con la edad en las funciones del sistema nervioso central (Soderberg et al. (1991) *Lipids* 26, 421-425). Existen pruebas de estudios con animales que lo respalda, con los animales a los que se les alimentó con una dieta baja en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de  
25 cadena larga mostrando déficits cognitivos (Suzuki et al. (1998) *Mech Ageing Dev* 101, 119-128) que mejoran con suplementos de DHA (Moriguchi, T., & Salem, N., Jr. (2003) *J Neurochem* 87, 297-309; Chung, et al. (2008) *J Nutr* 138, 1165-1171).

**[0006]** En humanos, se ha informado sistemáticamente de que un mayor consumo de pescado está relacionado con una reducción del deterioro cognitivo (van Gelder et al. (2007) *Am J Clin Nutr* 85, 1142-1147; Kalmijn et al. (1997) *Ann Neurol* 42, 776-782; Morris et al. (2005) *Arch Neurol* 62, 1849-1853; Kalmijn et al. (1997) *Am J Epidemiol* 145, 33-41) y de la incidencia de la demencia (Kalmijn et al. (1997) *Ann Neurol* 42, 776-782), y asociado a un mejor rendimiento cognitivo (Morris et al., (2005) *Arch Neurol* 62, 1849-1853; Kalmijn et al. (2004) *Neurology* 62, 275-280; Nurk et al. (2007) *Am J Clin Nutr* 86, 1470-1478; Dangour et al. (2009) *J Nutr Health Aging* 13, 198-202). También se han establecido relaciones positivas considerables entre resultados cognitivos y niveles de ingesta dietética de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga (van Gelder et al. (2007) *Am J Clin Nutr* 85, 1142-1147; Morris et al. (2003) *Arch Neurol* 60, 940-946; Kalmijn et al. (2004) *Neurology* 62, 275-280). Estas relaciones positivas se fortalecen de manera adicional si se considera el estado/nivel de eritrocitos o el plasma de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga. En este caso, los niveles de DHA/EPA se han asociado con una mejor función cognitiva en adultos mayores normales (Whalley et al. (2004) *Am J Clin Nutr* 80, 1650-1657; Whalley et al. (2008) *Am J Clin Nutr* 87, 449-454), mejores resultados cognitivos con el tiempo (Whalley et al. (2008) *Am J Clin Nutr* 87, 449-454), y una reducción del riesgo de deterioro cognitivo (Heude et al. (2003) *Am J Clin Nutr* 77, 803-808) y un menor riesgo de desarrollar demencia (Schaefer et al. (2006) *Arch Neurol* 63, 1545-1550).

30 **[0007]** Los estudios en poblaciones cognitivamente sanas no pudieron demostrar una eficacia en mejorar la cognición (Dangour et al. (2010) *Am J Clin Nutr* 91, 1725-1732; van de Rest et al. (2008) *Neurology* 71, 430-438). No obstante, se ha mostrado que los suplementos de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga son eficaces en individuos con problemas cognitivos (principalmente con un deterioro cognitivo leve), donde las intervenciones tuvieron un efecto beneficioso en los resultados cognitivos (Chiu et al. (2008) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, 1538-1544; Freund-Levi et al. (2006) *Arch Neurol* 63, 1402-1408; Yurko-Mauro et al. (2010) *Alzheimers Dement* 6, 456-464). Además, se ha demostrado que son beneficiosos en individuos con riesgo de alzhéimer que portan el alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (ApoE), mostrando estos  
35 40 45 50 55

individuos una mejora en la atención constante tras 26 semanas de intervención tanto con dosis bajas (226 mg de EPA, 176 mg de DHA) como con dosis altas (1093 mg de EPA, 847 mg de DHA) de aceite de pescado.

5 **[0008]** No se tiene constancia de que las bacterias y levaduras sinteticen ácidos grasos altamente insaturados omega-3 y solo se conocen unos pocos hongos que pueden producir trazas y cantidades menores de ácidos grasos altamente insaturados omega-3 (Weete (1980) *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organism*. Plenum Press, Nueva York; Wassef, M. (1977) «Fungal lipids». *Adv. Lipid Res.*).

10 **[0009]** Actualmente, la fuente dietética primaria de ácidos grasos altamente insaturados omega-3 es de determinados aceites de pescado que pueden contener hasta un 20-30 % de estos ácidos grasos en sus triacilglicéridos. En consecuencia, se procesan y encapsulan grandes cantidades de aceite de pescado al año para su venta como suplemento dietético.

15 **[0010]** No obstante, los recursos pesqueros pueden sufrir fluctuaciones naturales o pueden agotarse por la sobrepesca. Además, los aceites de pescado pueden acumular contaminantes ambientales y pueden contener altos niveles de vitaminas liposolubles que se encuentran naturalmente en los aceites de pescado. Cuando se ingieren, estas vitaminas se almacenan y metabolizan como grasa en el cuerpo humano en lugar de excretarse en la orina. De manera adicional, los aceites de pescado tienen un sabor y olor desagradables cuando experimentan una oxidación, y por tanto no pueden añadirse a alimentos procesados como aditivo alimentario, sin alterar el sabor del producto alimentario. Asimismo, el refinado de ácidos grasos altamente insaturados omega-3 puros a partir de extractos de aceites de pescado es un proceso costoso y complicado que da como resultado precios muy altos por formas puras de estos ácidos grasos.

20 **[0011]** La fuente natural principal de ácidos grasos insaturados omega-3 en el aceite de pescado es, de hecho, microbios unicelulares marinos, como algas y diatomeas, en la base de la red trófica acuática. Estos ácidos grasos altamente insaturados son componentes importantes de las membranas fotosintéticas. Los ácidos grasos altamente insaturados omega-3 se acumulan en la cadena trófica y con el tiempo se incorporan a los aceites de pescado.

25 **[0012]** Debido a las características positivas de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, se han identificado genes que están involucrados en la biosíntesis de estos ácidos grasos en una variedad de organismos.

30 **[0013]** El ácido linoleico (LA, 18:2<sup>Δ9,12</sup>) se convierte en ácido α-linolénico (ALA, 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>), el primero de los ácidos grasos omega-3, por la acción de una Δ15 desaturasa. Posteriormente, el ALA se convierte en ácido estearidónico (SDA, 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>) por la actividad de una Δ6 desaturasa; el SDA se convierte en ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup>) por la actividad de una elongasa; y el ETA se convierte en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) por la actividad de una Δ5 desaturasa. De manera alternativa, puede producirse ETA y EPA a partir de ácido dihomo-γ-linoleico (DGLA, 20:3<sup>Δ8,11,14</sup>) y ácido araquidónico (ARA, 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>) respectivamente, por la actividad de una Δ17 desaturasa. El EPA puede convertirse además en DHA por la actividad de una elongasa y una Δ4 desaturasa (véase la Figura 1).

35 **[0014]** Mientras que plantas más altas comprenden ácidos grasos poliinsaturados como ácido linoleico y ácido linolénico, no se encuentran ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como DHA y EPA en las semillas oleaginosas de dichas plantas, o solo en cantidades minúsculas y nutricionalmente irrelevantes. La producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, en concreto ácidos grasos omega-3, en plantas más altas sería ventajosa dado que pueden obtenerse de manera económica grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de gran calidad (y triacilglicéridos asociados) para la industria alimentaria, la nutrición animal y para fines farmacéuticos.

40 **[0015]** Se ha demostrado que las plantas oleaginosas de linaza transgénicas dan como resultado la acumulación de altos niveles de ácidos grasos C18 Δ6 desaturados. No obstante, solo se han obtenido niveles muy bajos de ácidos grasos poliinsaturados C20. Se ha observado anteriormente la síntesis y acumulación de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga como EPA y DHA en las semillas de plantas transgénicas en la literatura, pero con un éxito limitado y con resultados impredecibles.

45 **[0016]** Abbadi et al. (*Plant Cell*. 2004 Oct;16(10):2734-48. Epub 2004 Sep 17) describieron intentos de producir EPA en las semillas de linaza transgénica, utilizando un constructo de tres genes que contiene Δ6-desaturasa (D6D) de *Phaeodactylum tricorutum* (AY082393), Δ6-elongasa (D6E) de *Physcomitrella patens* (AF428243) y Δ5-desaturasa (D5D) de *Phaeodactylum tricorutum* (AY082392). Se eligió la linaza como una especie huésped para la expresión específica de semillas de estos genes debido a los niveles muy elevados de sustrato endógeno (ALA) para su conversión prospectiva en EPA. No obstante, a pesar de la presencia de casi un 50 % de ALA en las semillas de linaza en desarrollo, se generó menos de un 1 % de EPA (0,8 % del total de ácidos grasos). Además, se observaron niveles muy elevados de la sustancia intermedia indeseada biosintética, el ácido graso omega-6 ácido γ-linolénico (GLA) (16,8 % de los ácidos grasos totales). Esta acumulación simultánea de niveles elevados de GLA y síntesis baja de EPA se la atribuyó Abbadi et al. (*Plant Cell*. 2004 Oct;16(10):2734-48. Epub 2004 Sep 17) a los requisitos de sustrato dependientes de fosfolípidos de la D6D.

**[0017]** También observaron resultados similares Wu et al. (*Nat Biotechnol*, 2005, 23:1013-7), que describieron la expresión específica de las semillas de un constructo de 3 genes (D6D de *Pythium irregulare*, CAJ30866; D6E de

- Physcomitrella patens*; D5D de *Thraustochytrium*, AX467713) en *Brassica juncea*, produciendo un 0,8 % de EPA pero un 27,7 % del GLA de omega-6 indeseable. Wu et al. también observaron constructos genéticos más complejos, en los que intentaron impulsar la acumulación de EPA en *B. juncea* transgénica. Un constructo de cuatro genes que comprende las mismas actividades de D6D, D6E, D5D y adicionalmente la  $\Delta$ 12-desaturasa de FAD2 de *Calendula officinalis* (AF343065) dio como resultado un pequeño aumento de EPA hasta el 1,2 %, pero también un aumento simultáneo de GLA de hasta un 29,4 %. Un constructo de cinco genes, que comprende D6D, D6E, D5D y FAD2 y una segunda  $\Delta$ 6-elongasa D6E#2 de *Thraustochytrium* (AX214454) tuvo un impacto igualmente marginal sobre la composición de ácidos grasos de las semillas de *B. juncea* transgénicas, produciendo un 1,4 % de EPA y un 28,6 % de GLA. Un constructo de seis genes, que comprende los mismos D6D, D6E, D5D, FAD2, D6E#2 y una  $\omega$ 3-desaturasa  $\omega$ 3D de *Phytophthora infestans* (CS160901), produjo los mejores niveles de EPA en un 8,1 %; no obstante, los niveles de GLA se mantuvieron altos en un 27,1 %. En una iteración adicional, Wu et al. (*Nat Biotechnol*, 2005, 23:1013-7) también intentaron modificar la acumulación de EPA y DHA, a través de la expresión específica de semillas de nueve genes (D6D, D6E, D5D, FAD2, D6E#2,  $\omega$ 3D y adicionalmente una  $\Delta$ 5-elongasa (D5E) de pescado (*Oncorhynchus mykiss*; CS020097), una  $\Delta$ 4-desaturasa (D4D) de *Thraustochytrium* (AF489589), y una aciltransferasa también del mismo organismo). Esto produjo semillas de *B. juncea* que contenían una media de un 8,1 % de EPA y un 0,2 % de DHA. De nuevo, los niveles de GLA se mantuvieron considerablemente altos (27,3 %). Wu et al. reportaron un nivel máximo de EPA observado en *B. juncea* transgénica como un 15 % y un nivel máximo de DHA del 1,5 % (con base en plantas individuales para su constructo de nueve genes).
- [0018]** Se llevaron a cabo experimentos similares en la especie de semilla oleaginosa modelo *Arabidopsis thaliana*: Robert et al. (*Functional Plant Biol*, 2005, 32: 473-479) reportaron la acumulación de bajo nivel de EPA (3,2 % de ácidos grasos totales) en las semillas de *Arabidopsis* en la expresión de dos genes, una D6D/D5D bifuncional de pez cebra (*Danio rerio*, AF309556) y una D6E del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Z68749). Curiosamente, este constructo también mostró una acumulación de GLA considerablemente reducida, un hecho que Robert et al. atribuyeron al requisito de sustrato dependiente de acil-CoA de la D6D/D5D. Una transformación adicional de esta línea de *Arabidopsis* que acumula EPA con genes para la síntesis de DHA (D4D y D5E de *Pavlova salina*, AY926605, AY926606) dio como resultado un nivel medio del 0,3 % de DHA, de nuevo con niveles basales del coproducto de GLA indeseado (0,3 %).
- [0019]** Hoffmann et al. reportaron resultados muy similares (*J Biol Chem*, 2008, 283:22352-62), quienes postularon que el uso de una ruta «dependiente del acil-CoA» en plantas transgénicas disminuiría la acumulación de sustancias intermedias biosintéticas como GLA, mientras que aumentarían de manera simultánea la acumulación de EPA. No obstante, la expresión específica de semillas en la *Arabidopsis* de D6D dependiente de acil-CoA y las actividades de D5D de *Mantoniella squamata* (AM949597, AM949596) (en conjunto con la D6E de *P. patens* descrita previamente) produjo niveles de EPA apenas detectables (<0,1 % de ácidos grasos de semillas totales y <0,05 % de GLA). Ruiz-Lopez et al. han reportado datos análogos (*Transgenic Res*. 2012 (doi:10.1007/s11248-012-9596-0)) que expresaron varias combinaciones distintas de genes en *Arabidopsis*. Principalmente, un constructo de seis genes que comprende una D6D de *Pythium irregulare*, (CAJ30866); una D6E de *Physcomitrella patens* (AF428243); una D5D de *Thraustochytrium*, (AX467713); una D12/15 desaturasa bifuncional de *Acanthamoeba castellanii*, EF017656; una  $\omega$ 3D de *Phytophthora infestans* (CS160901) y una segunda D6E de *Thalassiosira pseudonana*, (AY591337) produjo un 2,5 % de EPA de los ácidos grasos totales de las semillas con la acumulación simultánea de un 13,3 % de GLA. Por el contrario, un constructo de cuatro genes que contenía una D6D dependiente de acil-CoA de *Ostreococcus tauri* (AY746357), una D6E de *Thalassiosira pseudonana* (AY591337), una D5D de *Thraustochytrium*, (AX467713) y un FAD2 de *Phytophthora sojae* (CS423998) generó bajos niveles tanto de EPA (2 % del total de ácidos grasos) como de GLA (1,0 %).
- [0020]** Más recientemente, Cheng et al. (*Transgenic Res*, 2010, 19:221-9) reportaron la acumulación de EPA en *Brassica carinata* transgénica. Por ejemplo, la expresión específica de semillas de tres genes (D6D de *Pythium irregulare*, CAJ30866; D6E de *Thalassiosira pseudonana*, AY591337; D5D de *Thraustochytrium*, AX467713) resultó en un nivel medio del 2,3 % de EPA, con un nivel alto de coacumulación de GLA (17,6 %). Un constructo de cuatro genes (D6D, D6E, D5D y  $\omega$ 3D de *Claviceps purpurea*, EF536898) dio como resultado un 4,2 % de EPA y un 11,8 % de GLA, mientras que un constructo de cinco genes (D6D, D6E, D5D,  $\omega$ 3D y una  $\omega$ 3-desaturasa adicional de *Pythium irregulare*, (FB753541)) produjo un 9,7 % de EPA y un 11,1 % de GLA. Dichos niveles son muy similares a los que se observaron con constructos de cinco y seis genes en *B. juncea* (Wu et al. 2005, *Nat Biotechnol*, 2005, 23:1013-7). Cheng et al. introdujo un constructo de 5 genes diferente (una D6D de *Pythium irregulare*, CAJ30866; una D6E de *Thraustochytrium*, HC476134; una D5D de *Thraustochytrium*, AX467713; un FAD2 de *Calendula officinalis*, AF343065 y una  $\omega$ 3D de *Pythium irregulare*, FB753541) en dos variedades distintas de *B. carinata*, que difieren en su acumulación del ácido graso monoinsaturado C22 ácido erúico. La expresión de este constructo en ácido erúico alto convencional de *B. carinata* volvió a dar como resultado una acumulación media de 9,3 % de EPA y 18,2 % de GLA. La expresión en el genotipo de ácido erúico-cero produjo un aumento de EPA aunque este genotipo también dio como resultado una coacumulación de altos niveles de GLA (26,9 %).
- [0021]** La presente invención aborda la necesidad de sistemas que produzcan niveles comercialmente útiles de ácidos grasos altamente insaturados omega-3 en las semillas de plantas terrestres.

Resumen de la invención

5 **[0022]** La *Camelina sativa* es un género de la familia de plantas con flores Brassicaceae. La Camelina es un cultivo de ciclo corto, y ha ganado notoriedad por su habilidad de soportar la escasez de agua en etapas tempranas de su desarrollo. En los últimos años, ha habido un interés creciente en el uso del aceite de camelina como biocombustible y biolubricante, principalmente en vista de los bajos requisitos de nitrógeno de este cultivo.

**[0023]** La presente invención se refiere al sorprendente hallazgo de que la camelina puede transformarse con enzimas desaturasa y elongasa para producir ácidos grasos omega-3. De hecho, tras la introducción de estas enzimas en la camelina, no solo es posible generar ácidos grasos omega-3, sino que es posible crear composiciones de aceites novedosas.

10 **[0024]** Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una planta o célula de camelina recombinante que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa y una  $\Delta 5$ -desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias reguladoras; donde la planta o célula de camelina recombinante comprende secuencias polinucleotídicas para las tres enzimas; donde la  $\Delta 6$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:20, y donde la planta o célula de camelina recombinante es capaz de producir ácido eicosapentaenoico (EPA).

**[0025]** Por tanto, se proporciona una planta o célula camelina transformada con genes que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa y una  $\Delta 5$ -desaturasa.

20 **[0026]** Las enzimas  $\Delta 6$ -desaturasa,  $\Delta 6$ -elongasa y  $\Delta 5$ -desaturasa pueden estar codificadas por un polinucleótido(s) único o separado. Lo que importa es que la planta o huésped de camelina recombinante según el primer aspecto de la invención comprenda secuencias polinucleotídicas para estas tres enzimas.

**[0027]** En un modo de realización preferido del primer aspecto de la invención, la planta o célula de camelina recombinante es producida al transformar una planta o célula de camelina con un polinucleótido que codifica una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa y una  $\Delta 5$ -desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias reguladoras.

**[0028]** De manera alternativa, la planta o célula de camelina recombinante puede producirse al transformar una planta o célula de camelina con polinucleótidos separados, codificado cada uno una  $\Delta 6$ -desaturasa y/o una  $\Delta 6$ -elongasa y/o una  $\Delta 5$ -desaturasa.

30 **[0029]** La planta o célula de camelina recombinante de este aspecto de la invención puede comprender además uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 12$ -desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias regulatorias. Por consiguiente, se proporciona una planta o célula de camelina recombinante que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 12$ -desaturasa y una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa a uno o más elementos reguladores. En un modo de realización preferido, la planta o célula de camelina recombinante es producida al transformar una planta o célula de camelina con un polinucleótido que codifica una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 12$ -desaturasa y una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias reguladoras.

40 **[0030]** Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir ácido eicosapentaenoico (EPA) que comprende cultivar una planta o célula según el primer aspecto de la invención en condiciones donde se expresan dichas enzimas desaturasa y elongasa y se produce EPA en dicha planta o célula.

45 **[0031]** Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un aceite vegetal de semillas que comprende cultivar una planta o célula de camelina recombinante del primer aspecto de la invención, por el que se expresan dichas enzimas elongasa y desaturasa y se produce aceite en dicha planta o célula.

**[0032]** Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un aceite vegetal de semillas producido por la planta o célula de camelina recombinante del primer aspecto de la presente invención, donde el EPA constituye al menos un 15 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y el  $\gamma$ -linolénico (GLA) constituye menos del 10 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;

50 preferiblemente donde el EPA constituye al menos un 20 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;  
preferiblemente donde el EPA constituye de un 20 % a un 31 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.

55 **[0033]** El EPA puede constituir al menos un 20, 25 o 30 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y el  $\gamma$ -linolénico (GLA) constituye menos del 10 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.

**[0034]** El EPA puede constituir de un 20 % a un 35 %, preferiblemente del 20 al 31 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.

5 **[0035]** El GLA puede constituir menos de un 7 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite. En un modo de realización, el GLA constituye de un 1 % a un 6 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.

**[0036]** La proporción de porcentajes molares de EPA a  $\gamma$ -linolénico (GLA) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 3:1, a aproximadamente 22:1, preferiblemente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, preferiblemente de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 20:1.

10 **[0037]** Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una planta o célula de camelina recombinante que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 5$ -elongasa y una  $\Delta 4$ -desaturasa unidas de forma operativa a una o más secuencias reguladoras.

**[0038]** Por tanto, se proporciona una planta o célula camelina transformada con genes que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 5$ -elongasa y una  $\Delta 4$ -desaturasa.

15 **[0039]** Las enzimas  $\Delta 6$ -desaturasa,  $\Delta 6$ -elongasa,  $\Delta 5$ -desaturasa  $\Delta 5$ -elongasa y  $\Delta 4$ -desaturasa pueden estar codificadas por un polinucleótido(s) único o separado. Lo que es esencial es que la planta o célula de camelina recombinante según el quinto aspecto de la invención comprende secuencias polinucleotídicas para estas cinco enzimas.

20 **[0040]** Preferiblemente, la planta o célula de camelina recombinante según este aspecto de la invención es producida al transformar una planta o célula de camelina con un polinucleótido que codifica una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 5$ -elongasa y una  $\Delta 4$ -desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias reguladoras.

25 **[0041]** De manera alternativa, la planta o célula de camelina recombinante puede producirse al transformar una planta o célula de camelina con polinucleótidos separados, codificado cada uno una  $\Delta 6$ -desaturasa y/o una  $\Delta 6$ -elongasa y/o una  $\Delta 5$ -desaturasa y/o  $\Delta 5$ -elongasa y/o una  $\Delta 4$ -desaturase.

30 **[0042]** La planta o célula de camelina recombinante de este aspecto de la invención puede comprender además uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 12$ -desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias regulatorias. Por consiguiente, se proporciona una planta o célula de camelina recombinante que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 12$ -desaturasa, una  $\Delta 5$ -elongasa, una  $\Delta 4$ -desaturasa y una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa a uno o más elementos reguladores. En un modo de realización preferido, la planta o célula de camelina recombinante es producida al transformar una planta o célula de camelina con un polinucleótido que codifica una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 5$ -elongasa, una  $\Delta 4$ -desaturasa, una  $\Delta 12$ -desaturasa y una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias reguladoras.

35 **[0043]** Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir ácido docosahexaenoico (DHA) y/o EPA, que comprende cultivar una planta o célula según el quinto aspecto de la invención en condiciones donde se expresan dichas enzimas desaturasa y elongasa y se produce DHA y/o EPA en dicha planta o célula.

40 **[0044]** Según un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un aceite vegetal de semillas que comprende cultivar una planta o célula de camelina recombinante del quinto aspecto de la invención, donde se expresan dichas enzimas elongasa y desaturasa y se produce aceite en dicha planta o célula.

45 **[0045]** Según un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un aceite vegetal de semillas producido por la planta o célula de camelina recombinante del quinto aspecto de la presente invención, donde el DHA constituye al menos un 5 %, al menos un 7 %, al menos un 10 %, al menos un 13 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y el  $\gamma$ -linolénico (GLA) constituye menos del 5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;

preferiblemente donde el DHA constituye al menos un 13 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;

50 preferiblemente donde el DHA constituye del 5 % al 15 %, del 10 % al 15 % o del 10 % al 13,7 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.

55 **[0046]** El  $\gamma$ -linolénico (GLA) puede constituir menos del 5 %, más preferiblemente menos del 4,5 %, aún más preferiblemente menos del 4 %, aún más preferiblemente menos del 3,5 %, aún más preferiblemente menos del 3 %, aún más preferiblemente menos del 2,5 %, aún más preferiblemente menos del 2 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.

**[0047]** El DHA puede constituir de un 5 % a un 20 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.

- [0048]** El DHA puede constituir de un 5 % a un 20 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0049]** El DHA puede constituir de un 10 % a un 20 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 5 **[0050]** En otro modo de realización, el DHA constituye de un 10 a un 15 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0051]** En otro modo de realización, el DHA constituye de un 10 a un 13,7 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 10 **[0052]** Preferiblemente, el porcentaje combinado de DHA y EPA es al menos un 20 % del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0053]** El porcentaje combinado de DHA y EPA puede ser de un 20 a un 30 % del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0054]** El porcentaje combinado de DHA y EPA puede ser del 21 al 27 % del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 15 **[0055]** El DHA puede constituir de un 4 % a un 10 %, preferiblemente de un 4 % a un 8 %, preferiblemente de un 5 % a un 7,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0056]** El GLA puede constituir de un 0 % a un 4,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0057]** El GLA puede constituir de un 0,5 % a un 4,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0058]** El GLA puede constituir de un 1,0 % a un 4,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 20 **[0059]** El GLA puede constituir de un 1,5 % a un 4,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0060]** El GLA puede constituir de un 0 % a un 3,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0061]** El GLA puede constituir de un 0,5 % a un 3,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0062]** El GLA puede constituir de un 1,0 % a un 3,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 25 **[0063]** En otro modo de realización, el GLA constituye de un 1,5 % a un 3,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0064]** El GLA puede constituir de un 1,5 % a un 3,2 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- [0065]** La proporción de porcentajes molares de EPA a DHA puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,8:1, a aproximadamente 1,4:1, preferiblemente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1,3.
- 30 **[0066]** En otro modo de realización, la proporción de los porcentajes molares del total de (EPA + DHA) a GLA es de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 3:1, 5:1, 7:1 o 10:1.
- [0067]** En otro modo de realización, la proporción de los porcentajes molares del total de (EPA + DHA) a GLA es de aproximadamente 17:1 a aproximadamente 3:1, 5:1, 7:1 o 10:1.
- 35 **[0068]** La proporción de los porcentajes molares del total de (EPA + DHA) a GLA puede ser de aproximadamente 16,4:1 a aproximadamente 3:1, 5:1, 7:1 o 10:1.
- [0069]** La proporción de los porcentajes molares del total de (EPA + DHA) a GLA puede ser de aproximadamente 8:1 a 3:1.
- 40 **[0070]** Según un noveno aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de la camelina en la fabricación de un ácido graso omega-3, preferiblemente EPA o DHA.
- [0071]** En el presente documento también se describe una semilla de camelina que comprende una fosfatidilcolina donde el número total de átomos de carbono de los grupos acilo de ácidos grasos de dicha fosfatidilcolina es 40. Preferiblemente, la semilla es una semilla de la planta del primer aspecto de la invención.
- 45 **[0072]** En el presente documento también se describe una semilla de camelina que comprende fosfatidilcolina, donde el número total de átomos de carbono:enlaces dobles de los grupos acilo de ácidos grasos de dicha fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en: 34:4, 34:0, 36:7, 38:11, 38:9, 38:8, 38:7, 38:6, 38:5, 40:11, 40:10, 40:9, 40:8, 40:7, 40:6, 40:5 y 40:4. Preferiblemente, la semilla comprende todas las especies de fosfatidilcolina 34:4, 34:0, 36:7, 38:11, 38:9, 38:8, 38:7, 38:6, 38:5, 40:11, 40:10, 40:9, 40:8, 40:7, 40:6, 40:5 y 40:4. Preferiblemente, la semilla es una semilla de la planta del primer aspecto de la invención.

- [0073]** En el presente documento también se describe una semilla de camelina que comprende una o más especies de fosfatidiletanolamina, donde el número total de átomos de carbono:enlaces dobles de los grupos acilo de ácidos grasos de dicha especie de fosfatidiletanolamina se selecciona del grupo que consiste en 34:4, 36:7, 38:8, 38:7, 38:6, 38:5, 40:10, 40:9, 40:8, 40:7, 40:6, 40:5. Preferiblemente, la semilla comprende todas las especies de fosfatidiletanolamina 34:4, 36:7, 38:8, 38:7, 38:6, 38:5, 40:10, 40:9, 40:8, 40:7, 40:6, 40:5. Preferiblemente, la semilla es una semilla de la planta del primer aspecto de la invención.
- [0074]** En el presente documento también se describe un aceite de semilla de camelina que comprende las especies de fosfatidilcolina 34:4, 34:0, 36:7, 38:11, 38:9, 38:8, 38:7, 38:6, 38:5, 40:11, 40:10, 40:9, 40:8, 40:7, 40:6, 40:5 y 40:4. Preferiblemente, la semilla es una semilla de la planta del quinto aspecto de la invención.
- [0075]** En el presente documento también se describe una semilla de camelina donde la semilla comprende una o más especies de fosfatidiletanolamina, donde el número total de átomos de carbono:enlaces dobles de los grupos acilo de ácidos grasos de dicha especie de fosfatidiletanolamina se selecciona del grupo que consiste en 34:4, 36:7, 38:8, 38:7, 38:6, 38:5, 40:10, 40:9, 40:8, 40:7, 40:6, 40:5. Preferiblemente, el aceite de camelina comprende todas las especies de fosfatidiletanolamina 34:4, 36:7, 38:8, 38:7, 38:6, 38:5, 40:10, 40:9, 40:8, 40:7, 40:6, 40:5. Preferiblemente, la semilla es una semilla de la planta del quinto aspecto de la invención.
- [0076]** También se describe en el presente documento un aceite o semilla de camelina donde dicha semilla o aceite comprende triglicéridos donde el número de enlaces dobles de átomos de carbono es 58:8, 58:9 y 58:10. La semilla o el aceite puede derivarse de la planta de camelina transgénica de la invención.
- [0077]** Además de las enzimas elongasa y desaturasa específicas a las que se les hace referencia en el presente documento, la célula o planta de camelina recombinante definida en el presente documento puede codificar además otras enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, en concreto enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. De manera alternativa, la planta de camelina recombinante solo puede transformarse con las enzimas de síntesis de ácidos grasos a las que se les hace referencia en el presente documento.
- [0078]** La planta de camelina recombinante definida en el presente documento puede estar en forma de semilla.
- [0079]** Las enzimas desaturasa y elongasa utilizadas en la presente invención pueden derivarse, por ejemplo, de algas, bacterias, moho o levadura.
- [0080]** En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -desaturasa utilizada en la presente invención procede de *Ostreococcus*, preferiblemente OtD6 de *Ostreococcus tauri* (Domergue et al. *Biochem. J.* 389 (PT 2), 483-490 (2005)). La  $\Delta 6$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:1. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2.
- [0081]** En otro modo de realización, la  $\Delta 6$ -desaturasa utilizada en la presente invención es O809D6 de *Ostreococcus* RCC809. La  $\Delta 6$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:19. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:20.
- [0082]** En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa utilizada en la presente invención procede de *Physcomitrella*, y procede preferiblemente de *Physcomitrella patens*. Preferiblemente, la  $\Delta 6$ -elongasa es PSE1 que proviene de *Physcomitrella patens* (Zank, et al., *Plant J.* 31 (3), 255-268 (2002); AB238914). La  $\Delta 6$ -elongasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:3. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:4.
- [0083]** En otro modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa utilizada en la presente invención es FcElo6, una  $\Delta 6$  elongasa de ácidos grasos de *Fragilariopsis cylindrus* CCMP 1102. La  $\Delta 6$ -elongasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:21. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:22.
- [0084]** En otro modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa utilizada en la presente invención es CeElo6, una  $\Delta 6$  elongasa de ácidos grasos de *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Jun 6;97(12):6421-6). La  $\Delta 6$ -elongasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:23. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:24.

**[0085]** En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -desaturasa utilizada en la presente invención procede de *Thraustochytrium sp.* Preferiblemente la  $\Delta 5$ -desaturasa es Tc $\Delta 5$  derivada de *Thraustochytrium sp.* (Qiu et al. *J Biol Chem.* 2001 Ago 24;276(34):31561-6; AF489588). La  $\Delta 5$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:5. En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:6.

**[0086]** En otro modo de realización, puede utilizarse la EMO $\Delta 5$   $\Delta 5$ -desaturasa de *E. huxleyi* (ID de Secuencia 9, 10). La  $\Delta 5$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:9. En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:10.

**[0087]** En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -elongasa utilizada en la presente invención procede de *Ostreococcus*, y procede preferiblemente de *Ostreococcus tauri*. Preferiblemente, la  $\Delta 5$ -elongasa es OtElo5 procedente de *Ostreococcus tauri* (WO 2005012316-A2; CS020123). La  $\Delta 5$ -elongasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:7. En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:8.

**[0088]** En un modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa procede de *Thraustochytrium sp* (ATCC21685). La  $\Delta 4$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:17. En un modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:18.

**[0089]** En otro modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa es EhD4 procedente de *Emiliana huxleyi* (WO 2009133145-A1; HC086723; et al. *Phytochemistry.* 2011 May; 72(7):594-600). La  $\Delta 4$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID 15. En un modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:16.

**[0090]** En otro modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa es TpDesk, una  $\Delta 4$ -desaturasa procedente de *Thalassiosira pseudonana* (Tonon et al, 2005 *FEBS J.* 2005 Jul;272(13):3401-12). La  $\Delta 4$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID 25. En un modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:26.

**[0091]** La  $\Delta 12$ -desaturasa utilizada en la presente invención puede derivarse de *Phytophthora*, y es preferiblemente Ps $\Delta 12$  de *Phytophthora sojae* (WO 2006100241 A2; CS423998). La  $\Delta 12$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:11. La  $\Delta 12$ -desaturasa puede comprender una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:12.

**[0092]** La  $\omega 3$ -desaturasa utilizada en la presente invención puede derivarse de *phytophthora*, preferiblemente de *phytophthora infestans*. Preferiblemente, la  $\omega 3$ -desaturasa es pi( $\omega 3$ ) derivada de *phytophthora infestans* (JP 2007527716; DJ418322). La  $\omega 3$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:13. La  $\omega 3$ -desaturasa puede comprender una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:14.

**[0093]** La  $\omega 3$ -desaturasa utilizada en la presente invención puede ser Hpw-3, un gen de  $\omega 3$  desaturasa de *Hyaloperonospora parasitica*. La  $\omega 3$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:27. La  $\omega 3$ -desaturasa puede comprender una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:28.

**[0094]** Preferiblemente, la camelina a la que se le hace referencia en el presente documento es *Camelina sativa*.

**[0095]** El aceite vegetal de semillas descrito en el presente documento puede comprender triglicéridos donde el número de átomos de carbono:enlaces dobles de dichos triglicéridos es 58:8, 58:9 y 58:10.

#### Descripción detallada

**[0096]** Varias características y modos de realización preferidos de la presente invención se describirán ahora mediante ejemplos no limitativos.

- [0097]** La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona experta en la materia. Tales técnicas se explican en la literatura. Véase, p. ej., J. Sambrook, E. F. Fritsch, & T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, & A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak & James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Ed), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley & J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; y E. M. Shevach & W. Strober, 1992 y suplementos periódicos, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY.

### Camelina

- [0098]** La *Camelina* es un género de la familia de plantas con flores Brassicaceae. La *Camelina* es un cultivo de biocombustible emergente, en concreto la *Camelina sativa*. También se la conoce por otros nombres, como sésamo alemán, linaza falsa, oro de placer, y semilla oleaginosa de Siberia. El interés renovado en la *C. sativa* como materia prima para biocombustible se debe en parte a su tolerancia a la escasez de agua y requisitos mínimos para el nitrógeno suplementario y otros insumos agrícolas (Gehring et al. (2006) *Genome* 49(12): 1555-63; Gugel & Falk (2006) *Canadian Journal of Plant Science* 86(4): 1047-1058).

- [0099]** De manera similar a otras materias primas de semillas oleaginosas renovables no convencionales como *Jatropha curcas L.* («jatropha»), la *C. sativa* crece en terreno marginal. A diferencia de la *jatropha*, que es un arbusto tropical y subtropical, la *C. sativa* es nativa de Europa y está naturalizada en Norteamérica, donde crece bien en el norte de Estados Unidos y en el sur de Canadá.

- [0100]** Además de su tolerancia a la escasez de agua y amplia distribución, algunos otros aspectos de la biología de *C. sativa* hacen que esté bien preparada para su desarrollo como un cultivo de semilla oleaginosa. En primer lugar, la *C. sativa* es un miembro de la familia de las *Brassicaceae*, y por tanto es un familiar del organismo de modelo genético *Arabidopsis thaliana* y el cultivo de semilla oleaginosa común *Brassica napus* (a la que también se le conoce como canola). En segundo lugar, el contenido de aceite de las semillas de *C. sativa* puede compararse con el de *B. napus*, variando desde un 30 al 40 % (p/p) (Budín et al. (1995). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(3): 309-315; Gugel & Falk (2006) *Canadian journal of plant science* 86(4): 1047-1058). Finalmente, las propiedades del biodiesel de *C. sativa* se han descrito ya ampliamente, y el aceite de semillas y el biodiesel de *C. sativa* se utilizaron como combustible en ensayos de motor con resultados prometedores (Bernardo et al. (2003) *Industrial Crops and Products* 17(3): 191-197; Frohlich & Rice (2005). *Industrial Crops and Products* 21(1): 25-31).

### Aceites, lípidos y ácidos grasos

- [0101]** Los ácidos grasos poliinsaturados pueden clasificarse en dos familias principales (dependiendo de la posición (n) del primer enlace doble más cercano al extremo de metilo de la cadena de carbono de los ácidos grasos. Por consiguiente, los ácidos grasos omega-6 presentan el primer enlace doble insaturado a seis átomos de carbono del extremo omega (metilo) de la molécula, y de manera adicional tienen un total de dos o más enlaces dobles, con cada insaturación posterior ocurriendo a 3 átomos de carbono adicionales hacia el extremo carboxilo de la molécula. En cambio, los ácidos grasos omega-3 presentan en el primer enlace doble insaturado a tres átomos de carbono de distancia del extremo omega de la molécula, y de manera adicional presentan un total de tres o más enlaces dobles, con cada insaturación posterior ocurriendo a 3 átomos de carbono adicionales hacia el extremo carboxilo de la molécula.

- [0102]** La Tabla 1 resume los nombres comunes de los ácidos grasos omega-3 y las abreviaturas que se utilizarán a lo largo de la memoria:

Tabla 1

Nombre común	Abreviatura	Notación abreviada
Ácido oleico	OA	18:1 <sup>Δ9</sup>
Ácido linoleico	LA	18:2 <sup>Δ9,12</sup>
γ-linolénico	GLA	18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>
Ácido di-homo γ-linolénico	DGLA	20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>
Ácido araquidónico	ARA	20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>
Ácido α-linolénico	ALA	18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>
Ácido estearidónico	SDA	18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>

Ácido eicosatetraenoico	ETA	20:4 <sup>Δ8,11,14,17</sup>
Ácido eicosapentaenoico	EPA	20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>
Ácido docosapentaenoico	DPA	22:5 <sup>Δ7,10,13,16,19</sup>
Ácido docosahexaenoico	DHA	22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>

5 **[0103]** Los ácidos grasos producidos por los procesos de la presente invención pueden aislarse de la camelina en la forma de un aceite, un lípido o un ácido graso libre. Un modo de realización de la invención es, por tanto, aceites, lípidos o ácidos grasos o fracciones de los mismos que se han producido por los métodos de la invención, especial y preferiblemente aceite, lípidos o una composición de ácidos grasos que comprenden EPA o DHA y que se derivan de camelina transgénica.

10 **[0104]** El término «aceite» o «lípido» se entiende como una mezcla de ácidos grasos que comprende ácidos grasos insaturados, preferiblemente esterificados. El aceite o lípido es preferiblemente rico en ácidos grasos omega-3 poliinsaturados o, ventajosamente, esterificados. En un modo de realización preferido de manera particular, el aceite o lípido presenta un alto contenido en ALA, ETA, EPA, DPA y/o DHA, preferiblemente un contenido alto en EPA y/o DHA.

**[0105]** Para el análisis, el contenido en ácidos grasos de la semilla puede, por ejemplo, estar determinado por una cromatografía de gases tras convertir los ácidos grasos en los ésteres de metilo por transesterificación de lípidos como triacilglicéridos y/o fosfolípidos.

15 **[0106]** Los ácidos poliinsaturados omega-3 producidos en el método de la presente invención, por ejemplo, EPA y DHA, pueden tener la forma de derivados de ácidos grasos, por ejemplo, esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glucolípidos, fosfolípidos, monoacilglicerol, diacilglicerol, triacilglicerol u otros ésteres de ácidos grasos.

20 **[0107]** El omega-3 y otros ácidos grasos poliinsaturados que están presentes pueden liberarse, por ejemplo, mediante un tratamiento con álcalis, por ejemplo, KOH acuoso o NaOH, o hidrólisis ácida, ventajosamente con la presencia de un alcohol como metanol o etanol, o mediante escisión enzimática, y aislarse mediante, por ejemplo, una separación de fase y una acidificación posterior mediante, por ejemplo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los ácidos grasos también pueden liberarse directamente sin la etapa de procesamiento descrita anteriormente.

25 **[0108]** Si es necesaria una purificación adicional, pueden emplearse métodos estándar. Dichos métodos incluyen extracción, tratamiento con urea, cristalización fraccionada, HPLC, destilación fraccionada, cromatografía en gel de sílice, destilación o centrifugación de alta velocidad, o combinaciones de estas técnicas. La protección de grupos reactivos, como los grupos alquenoilo o de ácido, puede hacerse en cualquier paso mediante técnicas conocidas (p. ej., alquilación, yodación, utilización de hidroxitolueno butilado (BHT)). Los métodos utilizados incluyen metilación de los ácidos grasos para producir ésteres de metilo. De manera similar, pueden retirarse los grupos protectores en cualquier paso. De manera deseable, la purificación de fracciones que contienen, por ejemplo, ALA, STA, ETA, EPA, DPA, y DHA puede conseguirse mediante el tratamiento con urea y/o destilación fraccionaria.

30 **[0109]** La presente invención abarca el uso del aceite, lípido, ácidos grasos y/o la composición de ácidos grasos en piensos, productos alimenticios, cosméticos o medicamentos. Los aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos según la invención pueden utilizarse de manera que los trabajadores especializados estén familiarizados a fin de mezclarlos otros aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos de origen animal, como, por ejemplo, aceites de pescado. Por tanto, la presente exposición también proporciona piensos, productos alimenticios, cosméticos o medicamentos que comprenden los aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos de la presente invención.

#### Contenido total de ácidos grasos

40 **[0110]** En el presente documento, el término «contenido total de ácidos grasos» se refiere al total de todos los ácidos grasos celulares que pueden derivarse de ésteres metílicos de ácidos grasos por el método de transesterificación de bases en una muestra determinada (tal como se conoce en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Sayanova et al., (1997) *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Abr 15;94(8):4211-6; Sayanova et al., (2003) *FEBS Lett*. 2003 Mayo;542(-3):100-4.).

#### Genes biosintéticos de ácidos grasos poliinsaturados

45 **[0111]** Los microorganismos, que incluyen algas, bacterias, mohos y levaduras, pueden sintetizar ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos omega en el curso ordinario del metabolismo celular. En concreto, algunos bien estudiados son hongos que incluyen *Schizochytrium aggregatum*, una especie del género *Thraustochytrium* y *Mortierella alpina*. De manera adicional, muchos dinoflagelados (Dinophyceae) producen de manera natural  
50 altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados. De este modo, se ha identificado una variedad de genes

## ES 2 769 448 T3

implicados en la producción de aceites a través de medios genéticos y las secuencias de ADN de algunos de estos tres genes están disponible públicamente. A continuación se muestran algunos ejemplos no limitativos:

N.º de registro	Descripción
AY131238	$\Delta 6$ desaturasa de <i>Argania spinosa</i>
Y055118	$\Delta 6$ desaturasa de <i>Echium pitardii</i> var. <i>pitardii</i>
AY055117	$\Delta 6$ desaturasa de <i>Echium gentianoides</i>
AF296076	$\Delta 6$ desaturasa de <i>Mucor rouxii</i>
AF007561	$\Delta 6$ desaturasa de <i>Borago officinalis</i>
L11421	$\Delta 6$ desaturasa de <i>Synechocystis</i> sp.
NM_031344	$\Delta 6$ desaturasa de ácido graso de <i>Rattus norvegicus</i>
AF465283,	$\Delta 6$ desaturasa de ácido graso de <i>Mortierella alpina</i>
AF465282	$\Delta 6$ desaturasa de ácido graso de <i>Mortierella isabellina</i>
AF419296	$\Delta 6$ desaturasa de ácido graso de <i>Pythium irregulare</i>
AB052086	ARNm de D6d de <i>Mucor circinelloides</i> para $\Delta 6$ desaturasa de ácido graso
AJ250735	ARNm de <i>Ceratodon purpureus</i> para $\Delta 6$ desaturasa de ácido graso
AF126799	$\Delta 6$ desaturasa de ácido graso de <i>Homo sapiens</i>
AF126798	$\Delta 6$ desaturasa de ácido graso de <i>Mus musculus</i>
AF199596,	$\Delta 5$ desaturasa de <i>Homo sapiens</i>
AF320509	$\Delta 5$ desaturasa de hígado de <i>Rattus norvegicus</i>
AB072976	ARNm de D5D de <i>Mus musculus</i> para $\Delta 5$ desaturasa
AF489588	$\Delta 5$ desaturasa de ácido graso de <i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC21685
AJ510244	ARNm de <i>Phytophthora megasperma</i> para $\Delta 5$ desaturasa de ácido graso
AF419297	$\Delta 5$ desaturasa de ácido graso de <i>Pythium irregulare</i>
AF07879	$\Delta 5$ desaturasa de ácido graso de <i>Caenorhabditis elegans</i>
AF067654	$\Delta 5$ desaturasa de ácido graso de <i>Mortierella alpina</i>
AB022097	ARNm de <i>Dictyostelium discoideum</i> para $\Delta 5$ desaturasa de ácido graso
AF489589.1	$\Delta 4$ desaturasa de ácido graso de <i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC21685
AY332747	ARNm de $\Delta 4$ desaturasa de ácido graso (des1) de <i>Pavlova lutheri</i>
AAG36933	$\Delta 12$ desaturasa de oleato de <i>Emericella nidulans</i>
AF110509,	ARNm de $\Delta 12$ desaturasa de ácido graso de <i>Mortierella alpina</i>
AAL13300	$\Delta 12$ desaturasa de ácido graso de <i>Mortierella alpina</i>
AF417244	$\Delta 12$ desaturasa de ácido graso de <i>Mortierella alpina</i> ATCC 16266
AF161219	ARNm de $\Delta 12$ desaturasa de <i>Mucor rouxii</i>
X86736 S	$\Delta 12$ desaturasa de piruline <i>platensis</i>
AF240777	$\Delta 12$ desaturasa de <i>Caenorhabditis elegans</i>
AB007640	$\Delta 12$ desaturasa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
AB075526	$\Delta 12$ desaturasa de <i>Chlorella vulgaris</i>
AP002063	$\Delta 12$ desaturasa microsómica de <i>Arabidopsis thaliana</i>
NP_441622,	$\Delta 12$ desaturasa de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
AAL36934	$\Delta 12$ desaturasa de <i>Perilla frutescens</i>

[0112] De manera adicional, la literatura de patente proporciona muchas secuencias de ADN adicionales de genes (y/o detalles sobre varios de los genes anteriores y sus métodos de aislamiento) involucrados en la producción de ácidos grasos poliinsaturados. Véase, por ejemplo: la patente estadounidense n.º 5,968,809 ( $\Delta 6$  desaturasa); la patente estadounidense n.º 5,972,664 y la patente estadounidense n.º 6,075,183 ( $\Delta 5$  desaturasa); el documento de patente WO 91/13972 y la patente estadounidense n.º 5,057,419 ( $\Delta 9$  desaturasa); el documento de patente WO 93/11245 ( $\Delta 15$  desaturasa); el documento de patente WO 94/11516, la patente estadounidense n.º 5,443,974 y el documento de patente WO 03/099216 ( $\Delta 12$  desaturasa); la solicitud de patente estadounidense U.S. 2003/0196217 A1 ( $\Delta 17$  desaturasa); el documento de patente WO 02/090493 ( $\Delta 4$  desaturasa); y el documento de patente WO 00/12720 y la solicitud de patente estadounidense U.S. 2002/0139974A1 (elongasa).

[0113] El término «desaturasa» se refiere a un componente de polipéptido de un complejo multienzimático que pueda desaturar, es decir, introducir un enlace doble en uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso mono o poliinsaturado o un precursor de interés. Algunas desaturasas presentan actividad en dos o más sustratos. Puede ser deseable determinar de manera empírica la especificidad de una desaturasa de ácido graso al transformar un huésped adecuado con el gen para la desaturasa de ácido graso y determinar su efecto en el perfil de ácidos grasos del huésped.

[0114] En el contexto de la presente invención, una  $\omega 3$  desaturasa cataliza la conversión de LA en ALA (WO 2008022963-A 30 28-FEB-2008; FB753570).

[0115] En el contexto de la presente invención, una  $\Delta 6$  desaturasa cataliza la conversión de ALA en SDA y también de LA en GLA. Las  $\Delta 6$ -desaturasas se describen en los documentos de patente WO 93/06712, US 5,614, 393, US 5614393, WO 96/21022, WO0021557 y WO 99/27111 y su aplicación para la producción en organismos transgénicos también se describe, por ejemplo, en los documentos de patente WO 9846763, WO 9846764 y WO 9846765. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -desaturasa utilizada en la presente invención procede de *Ostreococcus*, preferiblemente *OtD6* de *Ostreococcus tauri* (Domergue et al. *Biochem. J.* 389 (PT 2), 483-490 (2005); AY746357). En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -desaturasa está codificada por una secuencia polinucleotídica que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:1. En otro modo de realización, la  $\Delta 6$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:2.

[0116] En el contexto de la presente invención, una  $\Delta 5$  desaturasa cataliza la conversión de ETA en EPA. En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -desaturasa utilizada en la presente invención procede de *Thraustochytrium sp.* Preferiblemente la  $\Delta 5$ -desaturasa es Tc $\Delta 5$  derivada de *Thraustochytrium sp.* (Qiu et al. *J Biol Chem.* 2001 Ago 24;276(34):31561-6; AF489588). La  $\Delta 5$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:5. En otro modo de realización, la  $\Delta 5$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:6.

[0117] En el contexto de la presente invención, una  $\Delta 12$  desaturasa cataliza la conversión de OA en LA. En un modo de realización, la  $\Delta 12$ -desaturasa utilizada en la presente invención es Ps $\Delta 12$  procedente de *Phytophthora*, preferiblemente *Phytophthora sojae* (WO 2006100241 A2; CS423998). La  $\Delta 12$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:11. En un modo de realización, la  $\Delta 12$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:12.

[0118] En el contexto de la presente invención, una  $\Delta 4$  desaturasa cataliza la conversión de DPA en DHA. En un modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa procede de *Thraustochytrium sp* (ATCC21685). La  $\Delta 4$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99% o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:17. En un modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99% o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:18.

[0119] En otro modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa es EhD4 procedente de *Emiliana huxleyi* (Sayanova et al. *Phytochemistry.* 2011 May; 72(7):594-600). La  $\Delta 4$ -desaturasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99% o 100 % de identidad con la SEQ ID 15. En un modo de realización, la  $\Delta 4$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:16.

[0120] El término «elongasa» se refiere a un polipéptido que puede elongar una cadena de carbono de ácidos grasos para producir un ácido dos carbonos más largo que el sustrato de ácido graso en el que actúa la elongasa.

[0121] Ejemplos de reacciones catalizadas por sistemas de elongasa son la conversión de GLA en DGLA, SDA en ETA, ARA en DTA, y EPA en DPA. En general, la selectividad de sustrato de elongasas es algo amplio, pero está segregado tanto por longitud de cadena como por tipo de insaturación.

**[0122]** Por ejemplo, una elongasa C14/C16 utilizará un sustrato C14 (p. ej., ácido mirístico), una elongasa C16/18 utilizará un sustrato C16 (p. ej., palmitato), una elongasa C18/20 utilizará un sustrato C18 (p. ej., GLA, SDA, LA, ALA) y una elongasa C20/22 (a la que también se le hace referencia como  $\Delta 5$  elongasa) utilizará un sustrato C20 (p. ej., ARA, EPA).

5 **[0123]** Como algunas elongasas presentan una amplia especificidad, una única enzima puede ser capaz de catalizar varias reacciones de elongasa (p. ej., actuando por tanto como una elongasa C16/18 y una elongasa C18/20). Puede ser deseable determinar de manera empírica la especificidad de una elongasa de ácido graso al transformar un huésped adecuado con el gen para la elongasa de ácido graso y determinar su efecto en el perfil de ácidos grasos del huésped.

10 **[0124]** En el contexto de la presente invención, una  $\Delta 6$  elongasa cataliza la conversión de SDA en ETA. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa utilizada en la presente invención procede de *Physcomitrella*, y procede preferiblemente de *Physcomitrella patens*. Preferiblemente, la  $\Delta 6$ -elongasa es PSE1 que proviene de *Physcomitrella patens* (Zank, et al., Plant J. 31 (3), 255-268 (2002); AB238914). La  $\Delta 6$ -elongasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99% o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:3. En un modo de realización, la  $\Delta 6$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99% o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:4.

20 **[0125]** En el contexto de la presente invención, una  $\Delta 5$  elongasa cataliza la conversión de EPA en DPA. En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -elongasa utilizada en la presente invención procede de *Ostreococcus*, y procede preferiblemente de *Ostreococcus tauri*. Preferiblemente, la  $\Delta 5$ -elongasa es OtElo5 procedente de *Ostreococcus tauri* (WO 2005012316-A2; CS020123). La  $\Delta 5$ -elongasa puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:7. En un modo de realización, la  $\Delta 5$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO:8.

25 **[0126]** Aunque la fuente concreta de una elongasa o desaturasa de ácidos grasos poliinsaturados no es fundamental en la invención de la presente memoria, será obvio para un experto en la materia que se expresarán genes heterólogos con eficiencias variables en un huésped alternativo. De manera adicional, puede ser deseable modificar la expresión de las enzimas de vía biosintética de ácidos grasos poliinsaturados concretas para conseguir una eficacia de conversión óptima de cada una, según la composición específica del producto de ácidos grasos poliinsaturados de interés. Una variedad de técnicas de ingeniería genética está disponible para optimizar la expresión de una enzima concreta. Dos de dichas técnicas incluyen la optimización de codones y la mutación de genes, tal como se ha descrito anteriormente. Los genes producidos por ejemplo por cualquiera de estos dos métodos que presentan actividad(es) de desaturasa y/o elongasa serían útiles en la presente invención para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados omega-3.

### 35 Homología de secuencia o identidad de secuencia

**[0127]** La «homología de secuencia» o «identidad de secuencia» se utilizan en el presente documento de manera intercambiable. Los términos «idéntico» o porcentaje de «identidad» en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias proteicas se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o presentan un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, tal como se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Si dos secuencias que se han de comparar entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia preferiblemente se refiere al porcentaje de los residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga.

45 **[0128]** La identidad de secuencia puede determinarse de manera convencional con el uso de programas informáticos, como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de alineamiento local de Smith & Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, a fin de encontrar el segmento que presenta la identidad de secuencia más alta entre dos secuencias. Cuando se utiliza Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia concreta presenta, por ejemplo, 50 un 95 % de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de este modo de manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de referencia y que se permiten huecos de homología de hasta el 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se utiliza Bestfit, los llamados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores predefinidos («por defecto»). Las desviaciones que aparecen en la comparación 55 entre una secuencia determinada y las secuencias de la invención descritas anteriormente pueden causarse por ejemplo mediante la adición, delección, sustitución, inserción o recombinación. Dicha comparación de secuencias también puede llevarse a cabo preferiblemente con el programa «fasta20u66» (versión 2.0u66, Septiembre 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos, y <http://workbench.sdsc.edu/>). A tal efecto pueden utilizarse la 60 configuración de parámetros «por defecto».

**[0129]** Preferiblemente, la referencia a una secuencia que presenta un porcentaje de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO. tal como se ha detallado en el presente documento se refiere a una secuencia que presenta el porcentaje de identidad señalado sobre la longitud completa de la SEQ ID NO. a la que se le hace referencia.

5 **[0130]** Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas.

#### Hibridación

**[0131]** La hibridación es la unión de cadenas complementarias de ADN, ADN/ARN o ARN.

10 **[0132]** También pueden utilizarse en la invención polinucleótidos que hibriden con las secuencias polinucleótídicas proporcionadas en el presente documento. En concreto, se prefieren polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos descritos en el presente documento. Tal como se entiende en el presente documento, los términos «condiciones rigurosas» y «condiciones de hibridación rigurosas» significan que la hibridación solo ocurre si hay al menos un 90 %, 95 % y preferiblemente al menos un 97 % de identidad entre las secuencias. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante toda la noche a 42 °C en una solución que comprende: formamida al 50 %, SSC 5x (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7,6), solución Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado, seguido de un lavado del soporte de hibridación en SSC 0,1x a aproximadamente 65 °C.

15 **[0133]** Los polinucleótidos de la invención pueden utilizarse como una sonda de hibridación para ARN, ADNc y ADN genómico para aislar otros genes que presentan una identidad alta, en concreto una identidad de secuencia alta.

#### Optimización de codones

20 **[0134]** La degeneración de codones se refiere a la naturaleza en el código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin que afecte a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. Un experto en la materia es muy consciente del «sesgo de codones» exhibido por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido determinado. Tal como apreciará un experto en la materia, a menudo es útil modificar una porción de los codones que codifican un polipéptido concreto que se ha de expresar en un huésped extraño, de manera que el polipéptido modificado utiliza codones que prefiere el huésped alternativo. La utilización de codones preferidos por el huésped puede potenciar considerablemente la expresión del gen extraño que codifica el polipéptido.

30 **[0135]** En general, los codones preferidos por los huéspedes pueden determinarse dentro de una especie de huésped concreta de interés al examinar la utilización del codón en proteínas (preferiblemente las que se expresan en mayor cantidad) y al determinar qué codones se utilizan con más frecuencia. Por tanto, la secuencia codificadora para un polipéptido de interés que presente actividad de desaturasa o elongasa puede sintetizarse por completo o en parte utilizando los codones preferidos en la especie huésped. Todo (o partes) del ADN también pueden sintetizarse para retirar cualquier región o secuencia desestabilizadora de estructura secundaria que estaría presente en el ARNm transcrito. Todo (o partes) del ADN también pueden sintetizarse para alterar la composición de base a una más preferible en la célula huésped deseada.

35 **[0136]** En la presente invención, puede ser deseable modificar una porción de los codones que codifican el polipéptido que presenta la actividad relevante p. ej., actividad de desaturasa o elongasa, para potenciar la expresión del gen en la camelina.

#### Mutación genética

40 **[0137]** En la literatura se han consolidados métodos para sintetizar secuencias y aunar secuencias. Por ejemplo, puede emplearse una selección y mutagénesis *in vitro*, una mutagénesis dirigida, una PCR propensa a errores (Melnikov et al., *Nucleic Acids Research*, 27(4):1056-1062 (Feb. 15, 1999)), un «barajado de genes» u otros medios para obtener mutaciones de genes de elongasa o desaturasa naturales. Esto permitiría la producción de un polipéptido que presenta actividad de desaturasa o elongasa, respectivamente, *in vivo* con parámetros físicos y cinéticos más deseables para su función en la célula huésped como una vida media más larga o un índice más alto de producción de un ácido graso poliinsaturado deseado.

45 **[0138]** Si se desea, las regiones de un polipéptido de interés (es decir, una desaturasa o una elongasa) importante para una actividad enzimática puede determinarse a través de una mutagénesis rutinaria, la expresión de los polipéptidos mutantes resultantes y la determinación de sus actividades. Los mutantes pueden incluir delecciones, inserciones y mutaciones puntuales, o combinaciones de las mismas. Un análisis funcional común comienza con una mutagénesis de delección para determinar los límites de los extremos N- y C-terminales de la proteína necesarios para su función, y luego se hacen delecciones internas, inserciones o mutantes puntuales para determinar de manera adicional regiones necesarias para su función. También pueden utilizarse otras técnicas como mutagénesis por inserción de un casete o una síntesis total. Una mutagénesis de delección se

consegue, por ejemplo, utilizando exonucleasas para eliminar de manera secuencial las regiones codificadoras 5' o 3'. Hay kits disponibles para dichas técnicas. Tras la delección, la región codificadora se completa al ligar oligonucleótidos que contienen codones de inicio o terminación a la región codificadora delecionada tras la delección de 5' o 3', respectivamente. De manera alternativa, los oligonucleótidos que codifican codones de terminación o de inicio se insertan en la región codificadora por una variedad de métodos que incluyen mutagénesis dirigidas, PCR mutagénicas, o por ligamiento en ADN digerido en sitios de restricción existentes. Pueden hacerse delecciones internas de manera similar a través de una variedad de métodos que incluyen el uso de sitios de restricción existentes en el ADN, el uso de cebadores mutagénicos mediante mutagénesis dirigida o PCR mutagénica. Se realizan inserciones a través de métodos como mutagénesis por escaneo de enlaces, mutagénesis dirigida o PCR mutagénica, mientras que las mutaciones puntuales se realizan mediante técnicas como mutagénesis dirigida o PCR mutagénica.

#### Transformación

**[0139]** El término «transgénico» o «recombinante» se entiende preferiblemente como la expresión de los ácidos nucleicos que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos omega-3 a las que se les hace referencia en el presente documento en un locus innatural en el genoma, es decir, preferiblemente, se produce una expresión heteróloga de los ácidos nucleicos. Por tanto, los genes introducidos en la camelina según la presente invención se derivan preferiblemente de un organismo diferente.

**[0140]** Los polinucleótidos que codifican las enzimas (p. ej., enzimas desaturasa y elongasa) pueden introducirse en los casetes y/o vectores de expresión. En principio, los casetes de expresión pueden utilizarse de manera directa para su introducción en la camelina. No obstante, preferiblemente los ácidos nucleicos se clonan en casetes de expresión, que después se utilizan para transformar camelina con la ayuda de vectores como *Agrobacterium*.

**[0141]** Tras su introducción en la planta o célula vegetal de camelina, los polinucleótidos utilizados en la presente invención pueden o bien estar presentes en un plásmido separado o, de manera ventajosa, integrados en el genoma de la célula huésped.

**[0142]** Tal como se utiliza en el presente contexto, el término «vector» se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que se une. Un tipo de vector es un «plásmido», un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Un tipo adicional de vector es un vector viral, siendo posible que segmentos de ADN adicionales sean ligados al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se han introducido. Otros vectores se integran de manera ventajosa en el genoma de una célula huésped cuando se introducen en la célula huésped, y por tanto se replican conjuntamente con el genoma huésped. Asimismo, determinados vectores pueden regular la expresión de genes con los que están en enlace operativo. A estos vectores se les hace referencia en el presente documento como «vectores de expresión». Normalmente, los vectores de expresión que son adecuados para las técnicas de recombinación de ADN tienen forma de plásmidos.

**[0143]** Los vectores de expresión recombinantes utilizados en la presente invención son adecuados para expresar ácidos nucleicos en una célula huésped de camelina. Los polinucleótidos/vectores de expresión recombinantes comprenden preferiblemente una o más secuencias reguladoras, las cuales está(n) unidas de forma operativa con la secuencia de ácido nucleico que se ha de expresar.

**[0144]** El término «unido de forma operativa» se refiere a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos en un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de una esté afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido de forma operativa a una secuencia codificadora cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificadora (es decir, la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden estar unidas de forma operativa a secuencias reguladoras en una orientación antisentido o sentido.

**[0145]** El término «secuencia reguladora» está destinado a comprender promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión como señales de poliadenilación. Estas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), o véase: Gruber & Crosby, en: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, Ed.: Glick & Thompson, Cap 7, 89-108, incluyendo las referencias citadas en el presente documento.

**[0146]** Entre los ejemplos de vectores de expresión de plantas se incluyen los que se describen con detalle en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., & Masterson, R. (1992) «New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border», *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; Bevan, M.W. (1984) «Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation», *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721; y *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; en: *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, Ed.: Kung & R. Wu, Academic Press, 1993, p. 15-38.

[0147] El vector/polinucleótido comprende preferiblemente secuencias reguladoras que son capaces de controlar la expresión de genes en células vegetales y que están unidas de forma operativa de manera que cada secuencia pueda cumplir con su función, como la terminación transcripcional, por ejemplo, de señales de poliadenilación. Entre los ejemplos de señales de poliadenilación se encuentran aquellas derivadas de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, como el gen 3 del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984) 835 et seq.), que se conoce como octopina-sintasa, o equivalentes funcionales de los mismos, pero también son adecuadas otras secuencias de terminación que están funcionalmente activas en plantas.

[0148] Como, con frecuencia, la expresión genética de las plantas no está limitada al nivel transcripcional, un vector o casete de expresión vegetal comprende preferiblemente otras secuencias que están unidas de manera operativa, como potenciadores de traducción.

[0149] La expresión genética de las plantas está preferiblemente unida de forma operativa con un promotor adecuado que desencadena una expresión génica en el momento oportuno o de manera específica de la célula o el tejido. Algunos ejemplos de promotores son promotores constitutivos (Benfey et al., *EMBO J.* 8 (1989) 2195-2202), como los que se derivan de fitovirus, como 35S CaMV (Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (véase también los documentos de patentes US 5352605 y WO 84/02913), o promotores vegetales, como el promotor de la subunidad de rubisco, que se describe en el documento de patente US 4,962,028. Otras secuencias para su utilización en una unión operativa en los casetes de expresión fitogénica son secuencias de focalización, que se requieren para dirigir el producto génico en su compartimento celular correspondiente (véase un análisis en Kermodé, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996) 285-423 y las referencias citadas en el presente documento), por ejemplo dentro de la vacuola, dentro el núcleo, todo tipo de plastos, como amioplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, los elaioplastos, los peroxisomas y otros compartimentos de células vegetales.

[0150] La expresión fitogénica también puede conseguirse mediante un promotor químicamente inducible (véase el análisis en Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108). Los promotores químicamente inducibles son particularmente adecuados cuando se desea que la expresión génica se produzca en un momento específico. Entre los ejemplos de dichos promotores se encuentran un promotor inducible por ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2, 397-404) y un promotor inducible por etanol.

[0151] También son adecuados los promotores que responden a condiciones de estrés abiótico o biótico, por ejemplo, el promotor del gen PRP1 inducido por patógenos (Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993) 361-366), el promotor de hsp80 de tomate inducible por calor (US 5,187,267), el promotor de alfa-amilasa de patata inducible por refrigeración (WO 96/12814), el promotor de pinII inducible por heridas (EP-A-O 375 091) el promotor sensible a la cis-jasmona (Matthes MC, Bruce TJ, Ton J, Verrier PJ, Pickett JA, Napier JA. «The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence». *Planta* 2010 Oct;232(5):1163-80).

[0152] Se prefieren especialmente aquellos promotores que provocan la expresión de un gen en tejidos y órganos en los que sucede la biosíntesis de ácidos grasos, lípidos y aceites, en células de semillas, como células del endospermo y del embrión en desarrollo. Algunos ejemplos de dichos promotores son los promotores de napina de semilla oleaginosa de colza (US 5,608,152), el promotor de USP de Vicia faba (Baeumlein et al., *Mol Gen Genet*, 1991, 225 (3):459-67), el promotor de oleosina de *Arabidopsis* (WO 98/45461), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), el promotor de Bce4 de Brassica (WO 91/13980) o el promotor de B4 de legumina (LeB4; Baeumlein et al., 1992, *Plant Journal*, 2 (2):233-9). Se prevé también que un promotor específico del mesocarpio podría dirigir la síntesis del rasgo de omega-3 en aceite de palma y cultivos similares.

[0153] Otros promotores son aquellos que provocan una expresión específica de plastos, dado que los plastos constituyen el compartimento en el que se sintetizan los precursores y algunos productos finales de la biosíntesis de lípidos. Algunos ejemplos de promotores, como el promotor de ARN polimerasa vírico, se describen en los documentos de patente WO 95/16783 y WO 97/06250, y el promotor de clpP de *Arabidopsis*, se describe en el documento WO 99/46394.

[0154] Para asegurar una integración estable de los genes de biosíntesis en la planta transgénica durante una pluralidad de generaciones, normalmente es necesario que cada uno de los ácidos nucleicos que codifica una proteína de interés se exprese bajo el control de un promotor separado, preferiblemente un promotor que difiere del resto de promotores, ya que la repetición de motivos secuenciales puede provocar una inestabilidad del ADN-T, o para eventos de recombinación. No obstante, también es posible insertar una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos tras un promotor, y, si procede, antes de una secuencia terminadora. En la presente memoria, el sitio de inserción, o la secuencia, de los ácidos nucleicos insertados en el casete de expresión no es de importancia crítica, es decir, una secuencia de ácidos nucleicos puede insertarse en la primera o la última posición en el casete sin que su expresión esté sustancialmente influida de este modo.

[0155] Preferiblemente, cada gen introducido en la planta o célula de camelina está bajo el control de un promotor específico.

[0156] Un vector de ADN puede introducirse en las células mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Los términos «transformación» y «transfección», conjugación y transducción, tal como se utilizan en el presente contexto, pretenden comprender una multiplicidad de métodos conocidos en la técnica anterior para la introducción de ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo una coprecipitación de cloruro cálcico o fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, competencia natural, transferencia mediada químicamente, electroporación o bombardeo de partículas. Pueden encontrarse métodos adecuados para la transformación o transfección de células huésped, incluyendo células vegetales, en Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros libros de texto de laboratorios como *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium protocols*, Ed.: Gartland & Davey, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey.

[0157] En la técnica se conocen sistemas de transformación para camelina. Por ejemplo, en el documento US 2009/0151023 se describe un método que implica:

- (a) Proporcionar semillas de *Camelina sativa* esterilizadas recogidas de una planta cultivada en condiciones controladas;
- (b) Hacer germinar las semillas en agar en condiciones esterilizadas y cultivar plántulas *in vitro*;
- (c) Obtener explantos de los plántulas cultivados *in vitro*;
- (d) Inocular los explantos con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene al menos un constructo de ADN recombinante;
- (e) Cocultivar el explanto con la cepa de *Agrobacterium*;
- (f) Transferir los explantos a un medio de formación de callos, estando complementado dicho medio con hormonas y conteniendo sacarosa al 2 %;
- (g) Transferir los explantos a un medio de regeneración de brotes, estando complementado dicho medio con hormonas y conteniendo sacarosa al 2-6 %;
- (h) Transferir los brotes a un medio de elongación de raíces, estando complementado dicho medio con hormonas y conteniendo un 1-4 %; y
- (i) Transferir los brotes regenerados a la tierra y cultivarlos hasta convertirse en plantas de *Camelina sativa* transgénicas.

[0158] Las plantas transgénicas que comprenden los ácidos grasos poliinsaturados sintetizados en el proceso según la invención pueden comercializarse de forma ventajosa directamente sin que exista la necesidad de que los aceites, lípidos o ácidos grasos estén aislados.

[0159] Las plantas para los procesos según la invención figuran como plantas intactas, y todas las partes de plantas, órganos de plantas, o partes de plantas como hojas, tallos, semillas, raíces, tubérculos, anteras, fibras, pelos radiculares, tronchos, embriones, callos, cotiledones, peciolo, material cosechado, tejido vegetal, tejido reproductivo y cultivos celulares que se derivan de la planta transgénica real y/o pueden utilizarse para producir la planta transgénica. En este contexto, la semilla comprende todas las partes de la semilla como el episperma, las células epidérmicas, las células de semillas, el endospermo o el tejido embrionario.

[0160] Los compuestos producidos en el proceso según la invención también pueden aislarse de los organismos, ventajosamente de las plantas, en forma de sus aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres. Esto puede hacerse mediante el prensado o la extracción de las partes de la planta de camelina, preferiblemente de las semillas de la planta. En este contexto, los aceites, grasas, lípidos, y/o ácidos grasos libres pueden obtenerse por lo que se conoce como machacado o prensado en frío sin aplicar calor. Para permitir una mayor facilidad para la alteración de las partes de las plantas, en concreto de las semillas, previamente se desmenuzan, se cuecen al vapor o se tuestan. Las semillas que se han pretratado de este modo pueden prensarse o extraerse posteriormente con disolventes como hexano tibio. Posteriormente, los productos resultantes se procesan de manera adicional, es decir, se refinan. En este proceso, primero se retiran sustancias como los mucílagos vegetales y la materia en suspensión. Lo que se conoce como limpiar el limo puede llevarse a cabo de manera enzimática o, por ejemplo, químicamente, mediante la adición de ácido como ácido fosfórico. Después, los ácidos grasos libres se retiran mediante un tratamiento con una base, por ejemplo, solución de hidróxido de sodio. El producto resultante se lava minuciosamente con agua para retirar el álcali que queda en el producto y luego se seca. Para retirar el pigmento que se queda en el producto, los productos se someten a un blanqueamiento, por ejemplo, utilizando tierras de batán o carbón activo. Al final, el producto se desodoriza, por ejemplo, utilizando vapor.

#### Cultivo

[0161] En el caso de las plantas (incluyendo tejido vegetal u órganos vegetales) o células vegetales, «cultivar» se entiende como, por ejemplo, la siembra sobre o en un medio nutritivo, o de la planta intacta sobre o en un sustrato, por ejemplo, en un cultivo hidropónico, tierra para macetas, o sobre tierra cultivable.

[0162] Ahora se describirán varias características y modos de realización preferidos adicionales de la presente invención mediante ejemplos no limitativos y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un diagrama que muestra la vía de biosíntesis para ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

La figura 2 muestra un diagrama de los constructos de vectores utilizados para la transformación de Camelina.

5 La figura 3 muestra un estudio de la pérdida neutra de triglicéridos de semilla totales (TAG, por sus siglas en inglés) de líneas de origen natural y de líneas de Camelina transformadas con el constructo de cinco genes BC.

La figura 4 muestra un análisis por ESI-MS de líneas de Camelina de origen natural y transformadas con el constructo de cinco genes BC.

10 La figura 5 muestra una composición de acilo según lo determinado por un barrido de iones precursores de fosfatidilcolina para la línea natural y las líneas de Camelina transformadas con el constructo de cinco genes BC.

La figura 6 muestra la distribución de cadenas de acilo con fosfatidilcolina de líneas salvajes y de Camelina transformadas con el constructo de cinco genes BC.

15 La figura 7 muestra la distribución de cadenas de acilo dentro de la fosfatidiletanolamina de líneas salvajes y de Camelina transformadas con el constructo de cinco genes BC.

La figura 8 muestra la distribución de cadenas de acilo con ácido fosfátidico y fosfoinositol de líneas tipo salvaje y de Camelina transformadas con el constructo de cinco genes BC.

20 La figura 9 muestra la distribución de cadenas de acilo con ácido fosfatidilserina y fosfatidilglicerol de líneas naturales y de Camelina transformadas con el constructo de cinco genes BC.

Las figuras 10 y 11 muestran la acumulación de acil-CoA de semillas de Arabidopsis y de Camelina transgénica cosechadas en la fase intermedia del desarrollo de las semillas.

### **Ejemplo 1 - Materiales y métodos**

#### *Análisis de ácidos grasos*

25 **[0163]** Se extrajeron y se metilaron ácidos grasos tal como se describe en Sayanova et al., (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Abr 15;94(8):4211-6 y Sayanova et al., (2003) *FEBS Lett.* 2003 Mayo 8;542(1-3):100-4. Los derivados de éster metílico de ácidos grasos totales extraídos se analizaron por GC y GC-MS. Los datos presentados como números representativos proceden de análisis replicados.

#### *Perfilado de Acil-CoA*

30 **[0164]** Se recogieron veinte miligramos de material de semilla en desarrollo (15 días después de brotar), se congelaron en nitrógeno líquido y se extrajeron al modo de Larson & Graham 2001 (Larson TR, Graham IA. (2001), *Plant J.* 2001 Ene;25(1):115-25), para una cromatografía líquida de fase inversa con análisis cuantitativos de derivados de acil-eteno-CoA fluorescente o con una espectrometría de masas en cascada con ionización por electrospray (monitorización de reacciones múltiple) en modo de ion positivo. Para el análisis de derivados de eteno-CoA, se llevó a cabo una HPLC (sistema de cromatografía líquida Agilent 1200; columna Phenomenex LUNA 150 · 2 mm C18(2)) utilizando la metodología y las condiciones de gradiente descritas anteriormente (Larson & Graham 2001); mientras que el análisis LC-MS/MS +MRM siguió los métodos descritos por Haynes et al. 2008 (sistema de cromatografía líquida Agilent 1200; columna Gemini C18, 2 mm de diámetro interno, 150 mm con partículas de 5 mm). Para el propósito de la identificación y calibración, se adquirieron ésteres de acil-CoA estándar con longitudes de cadena de acilo de C14 a C20 de Sigma como ácidos libres o sales de litio.

35

40

#### *Perfilado de lípidos*

**[0165]** Las especies moleculares de TAG y PL se analizaron por espectrometría de masas con triple cuadrupolo de ionización por electrospray (API 4000 QTRAP; Applied Biosystems). Las especies moleculares de lípidos polares se definen por la presencia de un fragmento de un grupo principal, y la masa/carga del ion del lípido intacto formado por ESI (Welti et al., 2002, *J Biol Chem.* 2002 Ago 30;277(35):31994-2002. Devaiah et al., 2006, *Phytochemistry.* 2006 Sep;67(17):1907-24. con modificaciones descritas por Xiao et al. 2010; *Plant Cell.* 2010 May;22(5):1463-82.). Dicho precursor de la ESI-MS/MS en cascada y barrido de iones precursores, con base en el fragmento de grupo principal, no determina la especie de acilo graso individual. En su lugar, los lípidos polares se identifican a nivel de clase, de carbonos de acilo totales, y del número de enlaces dobles de carbono-carbono acilo. Los lípidos polares se cuantificaron en comparación con una serie de estándares internos de lípidos polares. Los triacilceroles (TAG) medidos al modo de Krank et al. (2007, *Methods Enzymol.* 2007;432:1-20) se definieron por la presencia de un fragmento de acilo y la carga/masa del ion formado a partir del lípido intacto (perfilado de la pérdida neutra). Esto permite la identificación de una especie de acilos TAG y los carbonos de

45

50

acilo totales y el número total de enlaces dobles de acilo en las otras dos cadenas. El procedimiento no permite la identificación de los otros dos ácidos grasos de manera individual ni las posiciones (sn-1, sn-2, o sn-3) que las cadenas de acilo individuales ocupan en el glicerol. Los TAG se cuantificaron de una manera similar a los lípidos polares, incluyendo la sustracción del fondo, atenuación, integración, deconvolución de isótopos, y comparación de picos de muestra con los del estándar interno (utilizando LipidView, Applied Biosystems). No obstante, mientras que los lípidos polares de una clase exhiben factores de respuesta espectral de masa similares, las respuestas espectrales de masa de varias especies de TAG son variables, debido a la ionización diferencial de especies de TAG molecular individuales. En los datos mostrados en el presente documento, no se aplicaron correcciones de respuesta a los datos. Los datos se normalizaron a los estándares internos tri15:0 y tri19:0.

## 10 **Ejemplo 2 - Producción de EPA en Camelina transgénica**

**[0166]** Nos interesaba modificar la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA, por sus siglas en inglés) omega-3 auténticos asociados normalmente con aceites de pescado como ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ) y ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6  $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ ). A este respecto, se emprendió una reconstrucción modular de su vía biosintética (Fig 1) en Camelina transgénica. Las actividades biosintéticas heterólogas se situaron bajo los controles reglamentarios de promotores específicos de semillas comunes. Además, dada la variación en el uso de condones observado entre angiospermas y algas marinas, un número de genes se resintetizaron con optimización de codones para su expresión en Cruciferae.

### *Diseño de constructos*

**[0167]** Se construyeron cuatro constructos que contenían de 3- a 7- casetes génicos utilizando el sistema de recombinación Gateway® (Invitrogen). Se insertaron respectivos genes como fragmentos de Ncol/Pacl en los casetes terminadores/promotores y luego se movieron a los vectores pENTRY (Fig 2). Tal como se muestra, el constructo más simple (MC) contenía tres casetes de expresión, comprendiendo 1) un promotor específico de semillas (el promotor SBP1800 de la proteína de unión a sacarosa), Ot $\Delta$ 6, el gen de  $\Delta$ 6-desaturasa de *Ostreococcus tauri* (Domergue et al. *Biochem. J.* 389 (PT 2), 483-490 (2005); **AY746357**) y CatpA, terminador; 2) un promotor específico de semillas (promotor USP1 (Bäumlein et al. 1991 *Mol Gen Genet.* 1991 Mar;225(3):459-67), PSE1, una  $\Delta$ 6 elongasa de ácidos grasos de *Physcomitrella patens* (Zank, et al., *Plant J.* 31 (3), 255-268 (2002); AB238914) y un terminador CaMV35S; 3) un promotor específico de semillas (Cnl, un promotor de conlinin1 (Truksa 2003; *Plant Physiol Biochem* 41:141-147), Tc $\Delta$ 5, una  $\Delta$ 5-desaturasa de *Thraustochytrium sp.* (Qiu et al. *J Biol Chem.* 2001 Ago 24;276(34):31561-6) y OCS, una región terminadora de OCS, un gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens*.

**[0168]** El constructo de BC contenía casetes de cinco genes que incluían los mismos 3 casetes génicos que en el MC descrito anteriormente más dos casetes génicos adicionales que consisten en Ps $\Delta$ 12, un gen  $\Delta$ 12-desaturasa de *Phytophthora sojae* (véase supra) y Pi $\omega$ 3, un gen  $\omega$ 3 desaturasa de *Phytophthora infestans* (Wu et al., 2005 *Nat Biotechnol.* 2005 Ago;23(8):1013-7) flanqueado por Np, un promotor de BnNapin y regiones terminadoras E9.

**[0169]** Para construir un constructo DHA-1 combinamos un constructo de BC con casetes de dos genes adicionales, que contenían OtElo5, una  $\Delta$ 5 elongasa de ácido graso de *Ostreococcus tauri* (Meyer et al., *J Lipid Res.* 2004 Oct;45(10): 1899-909) y Eh $\Delta$ 4, una  $\Delta$ 4-desaturasa de *Emiliania huxleyi* (Sayanova et al. 2011 *Phytochemistry.* 2011 May;72(7):594-600) flanqueado por promotores de napina y terminadores de OCS.

### 40 *Síntesis de EPA en Camelina transgénica*

**[0170]** En una primera iteración el constructo de tres genes más simple (MC) se introdujo en Camelina transgénica utilizando una técnica de infiltración floral estándar para infectar inflorescencias con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que portan vectores de transformación binarios. La tabla 2 ejemplifica la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga no nativos como el ácido eicosapentaenoico (EPA). A continuación se muestra la composición de ácidos grasos totales de semillas de plantas naturales y transgénicas de líneas de *C.sativa* que expresan el constructo de MC, confirmando la presencia de EPA en transgénicos en un intervalo del 12,9-17,3 % del total de ácidos grasos de las semillas. Nótese la ausencia total de este ácido graso del control no transgénico de origen natural.

Tabla 2

	16:0	18:0	18:1	LA	GLA	ALA	SDA	20:1	DHGLA	ARA	ETA	<b>EPA</b>	Otros
Natural	7,0	3,1	15,1	21,2	0,0	29,6	0,0	14,1	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	9,9
Línea 2	9,3	5,0	4,7	24,7	1,8	12,2	1,8	7,8	0,6	2,4	2,0	<b>16,8</b>	10,9
Línea 3	9,3	4,9	6,4	25,6	2,1	13,4	2,0	8,3	0,7	2,0	1,8	<b>12,9</b>	10,6
Línea 4	9,2	5,6	4,1	21,3	1,4	13,5	1,3	6,2	1,5	2,2	5,1	<b>17,3</b>	11,3

**[0171]** En una segunda iteración de la modificación de Camelina con la capacidad de acumular altos niveles de EPA, transformamos C. Sativa con el constructo de cinco genes BC, de nuevo por infiltración floral. Tal como se muestra a continuación en la tabla 3, la composición de ácidos grasos totales de semillas T2 de plantas transgénicas de C. sativa que expresan el constructo BC contiene niveles muy altos de EPA (en el intervalo de 20,0 - 30,7 %). Además, tal como se muestra a continuación en la tabla 4, también es posible obtener EPA a un nivel de EPA al 30,7 %. Este ácido graso está totalmente ausente en los controles de origen natural.

Tabla 3

																EPA (% MOL)			
	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	ALA	SDA	20:1	DHGLA	ARA	20:3n3	ETA	EPA	Otros	Total	Media	SD		
162a	9.8	7.6	4.6	18.3	2.4	10.8	1.5	6.5	0.5	2.0	1.6	2.4	25.0	7.0	100.0				
162b	8.6	7.1	5.0	18.7	3.6	11.4	2.3	7.4	0.5	1.8	1.4	2.2	22.8	7.1	100.0				
162c	11.3	7.0	4.9	20.4	4.0	9.4	2.1	5.3	0.6	1.9	1.3	2.0	24.0	5.8	100.0	23.9	1.1		
26a	9.9	6.2	4.0	19.1	1.9	10.3	1.1	6.4	0.8	2.1	1.6	3.5	26.0	7.0	100.0				
26b	8.9	5.6	4.5	18.6	1.2	14.9	0.8	7.7	1.4	2.0	1.5	4.7	21.6	6.6	100.0				
26c	9.2	5.8	4.8	18.6	1.6	14.9	1.1	7.3	1.2	1.9	1.5	4.2	21.6	6.3	100.0	23.1	2.6		
169a	10.3	5.4	4.8	19.8	1.0	15.0	0.7	6.4	1.3	1.8	1.6	4.6	21.3	6.0	100.0				
169b	11.3	6.7	4.0	18.0	1.2	14.4	0.8	5.8	1.1	1.6	1.6	4.5	22.4	6.5	100.0				
169c	11.3	6.5	4.7	19.9	2.2	13.5	1.3	6.5	1.3	1.9	1.4	4.1	18.9	6.5	100.0	20.9	1.8		
158a	8.5	8.0	5.3	20.2	3.5	10.7	2.0	7.2	0.6	1.9	1.3	2.5	21.3	7.0	100.0				
158b	10.4	9.0	5.0	19.5	5.9	8.1	3.1	6.4	0.6	1.8	1.2	1.8	19.0	8.2	100.0				
158c	8.9	8.5	5.2	19.8	3.6	9.8	1.9	6.6	0.5	2.1	1.3	2.3	21.6	7.8	100.0	20.6	1.4		
216a	7.6	8.1	5.3	21.5	2.1	11.2	1.1	8.1	0.6	1.9	1.5	2.5	19.8	8.5	100.0				
216b	7.8	7.7	5.3	21.2	2.4	10.9	1.2	7.9	0.6	2.0	1.6	2.4	20.7	8.5	100.0				
216c	7.4	7.8	5.2	21.3	1.8	11.2	1.0	8.1	0.6	2.0	1.6	2.6	20.8	8.7	100.0	20.4	0.5		
29a	9.2	6.3	4.9	21.2	1.5	13.3	0.7	7.0	0.9	2.1	1.7	3.3	21.2	6.6	100.0				
29b	8.8	6.8	5.7	20.8	1.7	15.5	1.0	7.7	1.1	2.0	1.3	3.5	17.9	6.3	100.0				
29c	8.6	6.2	5.1	20.1	1.5	14.5	0.8	8.0	0.8	2.0	1.5	3.2	21.1	6.5	100.0	20.1	1.9		
105a	8.6	8.9	5.3	20.3	2.3	10.1	1.2	7.4	0.5	2.1	1.6	2.0	21.0	8.5	100.0				
105b	8.9	9.8	5.4	20.3	3.2	9.8	1.7	7.2	0.5	1.9	1.4	1.8	19.2	8.9	100.0				
105c	9.2	10.1	5.5	20.8	2.2	8.8	1.0	7.0	0.6	2.3	1.5	1.9	19.8	9.3	100.0	20.0	1.0		

Tabla 4

		% MOL	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	ALA	SDA	20:1	DHGLA	ARA	20:3n3	ETA	EPA	Otros	Total	
Semillas T3 LíneaBBC_3_26	1semilla/vial	26_10	10.4	6.3	4.0	14.2	2.1	8.2	1.6	6.5	0.3	1.4	2.1	2.9	30.7	9.2	100.0 NVR1	36
Semillas T3 LíneaBBC_3_162	1semilla/vial	162_13	11.3	7.3	4.1	19.4	2.6	7.6	1.2	6.2	0.3	1.6	1.5	2.1	26.1	8.6	100.0 NVR1	16
Semillas T3 LíneaBBC_3_26	1semilla/vial	26_15	9.9	7.7	4.2	17.1	3.0	9.3	1.4	6.8	0.3	1.6	1.6	2.8	25.8	8.4	100.0 NVR2	6
Semillas T3 LíneaBBC_3_26	1semilla/vial	26_19	9.3	6.1	4.2	15.8	1.3	13.8	1.0	7.7	0.5	1.4	1.9	3.9	24.9	8.0	100.0 NVR2	11
Semillas T3 LíneaBBC_3_169	1semilla/vial	169_16	10.3	7.2	4.2	20.7	1.9	7.8	0.9	6.0	0.5	1.7	1.8	2.9	24.9	9.3	100.0 NVR2	32
Semillas T3 LíneaBBC_3_162	1semilla/vial	162_20	8.9	7.0	5.0	16.6	2.1	12.2	1.3	8.1	0.4	1.7	1.6	2.7	24.6	7.9	100.0 NVR1	24

*Análisis lipídómico dirigido de Camelina transgénica que acumula EPA*

**[0172]** Para proporcionar una caracterización adicional y más detallada de las plantas de Camelina que acumulan altos niveles de EPA en el aceite de semillas, se realizó un análisis detallado utilizando la espectrometría de masas en cascada tal como se ha detallado anteriormente. Tal como se muestra en la Fig 3, los estudios de la pérdida neutra de los triacilglicérols (TAG) totales de las semillas de o bien líneas de origen natural o bien de dos líneas de EPA altas (162, 26 - cf Tabla 3) confirmaron la presencia de EPA en TAG de las líneas 162 y 26 y confirmaron la ausencia total de este ácido graso en el aceite de semillas de origen natural. Para definir de manera adicional la composición de los TAG presente en las líneas de EPA altas, se utilizó una ESI-MS para identificar su composición molecular, en comparación con las de origen naturales. Tal como se muestra en la Fig 4, varias especies nuevas de TAG están presentes claramente en las líneas 162 y 26 que no están presentes en las de origen natural, principalmente 58:8, 58:9 y 58:10. Dado que las especies de TAG predominantes en las cepas naturales son 54:5-8, esta variación al alza representa la acumulación de ácidos grasos de cadena larga que contienen enlaces dobles adicionales, es decir, el EPA se acumula en 1 (o posiblemente en 2) posiciones de la cadena principal de glicerol de TAG.

**[0173]** Como corolario al análisis de lípidos neutros en estas líneas de Camelina, también analizamos la composición de acilo de los fosfolípidos. Utilizando un barrido de iones precursores, la composición de acilo de la fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés, el mayor fosfolípido presente en las semillas vegetales) se determinó para las líneas naturales y las líneas 162 y 26 (Fig 5). De nuevo, se identificaron diferencias significativas entre el natural y los transgénicos con EPA alto, incluyendo la identificación de una serie de lípidos C38 y C40 que estaban esencialmente ausentes en el natural.

**[0174]** Esta alteración de la composición de los fosfolípidos resultante de la acumulación y síntesis transgénica de EPA se investigó adicionalmente por un perfilado más detallado de las clases de fosfolípidos individuales (Figs 6-9). Tal como se observa en la Fig 6, este análisis confirmó la presencia de una serie de especies nuevas de PC, que surge de la incorporación de EPA en este fosfolípido. También está claro que un número de especies de PC endógenas se reducen como consecuencia de esta acumulación, en particular la reducción de las

especies de PC C36 que contenían 1-4 enlaces dobles. Se observó un perfil muy similar para la fosfatidiletanolamina (PE, por sus siglas en inglés) (Fig 8), que también mostró la acumulación de especies poliinsaturadas nuevas C38 y C40, con una reducción concomitante en los niveles de la especie de PE C36. Perfilamos la otras especies de fosfolípidos menores (ácido fosfatídico [PA], fosfoinositol [PI], fosfatidiserina [PS] y fosfatidilglicerol [PG]) y se observaron más perturbaciones pronunciadas. Por ejemplo, se aumentaron los niveles generales de todas las especies de PA en las líneas transgénicas, aunque desde una base de línea muy baja (Fig 8). En cambio, muchas especies de PI C34 y C36 disminuyeron en los transgénicos de EPA alto, aunque estas líneas también contenían algunas especies nuevas que contienen ácidos grasos poliinsaturados C38 (Fig 8). De manera interesante, la PS, que normalmente acumula di + C20 monoinsaturado + ácidos grasos, se redujo en las líneas transgénicas, al igual que las especies de PG C34/36 (Fig 9). No pudieron detectarse especies nuevas de PS C38/40 en nuestras líneas transgénicas, mientras que se observaron nuevas especies que contenían ácidos grasos poliinsaturados PG C38 (Fig 9).

**[0175]** También se utilizó un perfilado de acil-CoA para definir la composición de este centro metabólico principal. Tal como puede verse en las Figuras 10 y 11, la reserva de acil-CoA de semillas de Camelina transgénicas cosechadas en la fase intermedia del desarrollo de las semillas reveló la presencia de niveles considerables de EPA-CoA.

### **Ejemplo 3 - Producción de DHA en Camelina transgénica**

**[0176]** Tras haber modificado con éxito la acumulación significativa de EPA en semillas de Camelina transgénicas, intentamos a continuación dirigir la síntesis de DHA. Como el DHA es un metabolito de EPA (Fig 1), presentar niveles suficientes de EPA es un prerrequisito para dichas manipulaciones. Al utilizar el constructo detallado en la Fig 2, se generaron plantas de Camelina transgénica modificadas para acumular tanto EPA como DHA.

**[0177]** Como el genotipado de la generación T2 indicó que este material no era homocigótico para el transgén, decidimos realizar un análisis a media semilla, en el que una porción de la semilla se somete a un análisis por FAMES, pero la porción residual que contiene el embrión se retiene y puede utilizarse para regenerar una planta. Tal como se muestra a continuación en la Tabla 5, el análisis de (medias) semillas únicas confirmó en efecto la presencia de transgenes nulos (muestras 9-11) tal como se esperaría de una población no homocigótica. No obstante, el análisis por éster metílico de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) de los lípidos totales de las semillas confirmó, en efecto, la presencia de EPA y de DHA, estando esta última a niveles de más del 13 % de ácidos grasos totales. La línea que mejor muestra los niveles combinados de EPA y DHA (C20 + LC-PUFA omega-3) estaba al 26,3 % de los ácidos grasos totales. Cabe destacar que esta línea contenía solo niveles muy bajos de ácidos grasos omega-6 ARA, GLA y DHGLA y las sustancias intermedias biosintéticas omega-3 SDA, ETA y DPA. Por consiguiente, este nuevo aceite de Camelina representa una nueva fuente terrestre valiosa de LC-PUFA omega-3 C20+ que normalmente se encuentran en entornos acuáticos.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos totales de semillas T2 de las mejores líneas de plantas de *C. sativa* transgénicas que expresan un constructo de DHA-1 (análisis de medias semillas)

**Análisis de medias semillas en semillas T2**

% MOL	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	ALA	SDA	20:0	20:1	20:2	DHGLA	ARA	20:3n3	ETA	EPA	22:0	22:1	DPA	DHA	Otros			
BBC_OE3	1	15.0	7.5	7.2	23.4	1.6	6.4	0.9	3.5	6.7	1.4	1.3	1.5	0.9	1.9	5.3	0.5	1.0	1.3	4.4	8.4	NXX1	7
	2	12.1	8.0	6.4	20.7	3.2	11.2	2.4	3.6	6.0	1.1	1.0	1.5	0.8	2.6	5.6	0.6	0.7	1.7	4.2	6.8	NXX1	56
	3	15.7	7.5	5.4	18.5	2.5	10.4	2.0	4.0	6.7	1.3	1.0	1.3	0.9	2.6	5.2	0.6	0.8	1.4	4.1	8.1	NXX1	9
	4	14.8	4.9	7.5	18.8	1.6	13.2	1.4	1.8	7.4	1.5	1.0	1.2	1.0	2.7	4.9	0.4	0.9	1.5	4.7	8.6	NXX1	10
	5	11.1	4.8	6.5	23.3	1.9	14.6	1.3	2.5	8.5	1.5	1.5	1.4	1.1	3.3	5.2	0.4	0.9	1.3	4.3	4.6	NXX1	57
	6	11.5	4.4	8.6	23.1	2.3	13.4	1.7	2.1	8.5	1.4	1.7	1.5	0.8	3.0	4.8	0.3	0.8	1.1	3.8	5.3	NXX1	13
	7	11.3	5.0	6.8	23.4	2.1	13.7	1.5	2.5	8.2	1.3	1.3	1.5	1.0	2.8	5.8	0.4	1.0	1.3	5.0	4.2	NXX1	14
	8	13.3	4.8	5.7	19.4	2.1	12.3	1.9	1.9	7.6	1.5	0.9	1.5	1.2	2.3	7.2	0.4	1.0	1.5	7.3	6.5	NXX1	15
	9	9.8	3.8	9.3	23.5	0.2	27.6	0.2	2.7	11.6	2.4	0.1	0.0	1.1	0.3	0.4	0.5	3.4	0.0	0.3	3.1	NXX1	58
	10	12.6	4.9	9.7	28.0	0.0	21.4	0.0	2.9	9.2	2.3	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.5	2.5	0.0	0.0	5.5	NXX1	17
	11	11.9	3.9	8.6	23.4	0.0	26.9	0.0	2.8	10.6	2.4	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.5	3.5	0.0	0.0	4.4	NXX1	19
	12	15.1	4.8	6.7	21.6	1.7	13.4	1.3	2.0	7.7	1.3	1.3	1.4	1.0	2.7	5.1	0.4	0.9	1.3	4.5	5.7	NXX1	20
	13	13.1	5.4	6.9	24.8	2.1	11.0	1.2	2.7	8.1	1.2	1.4	1.4	0.9	2.5	5.6	0.4	1.0	1.1	4.4	4.8	NXX1	21
	14	12.0	4.9	5.5	17.2	3.2	13.8	3.2	2.2	7.4	1.0	0.7	1.4	1.2	2.3	8.8	0.4	0.7	2.2	7.5	4.6	NXX1	22
	15	10.7	8.0	6.1	21.5	1.9	15.3	1.9	4.0	7.6	1.1	0.8	1.2	1.0	2.5	4.8	0.6	1.0	1.8	5.2	3.0	NXX1	59
	16	12.1	5.7	6.4	18.1	2.3	15.3	2.2	2.7	6.9	1.0	0.7	1.5	1.2	2.6	6.9	0.5	0.7	2.2	7.2	3.9	NXX1	25
	17	10.8	5.4	7.5	22.5	1.7	16.4	1.4	3.2	7.8	1.3	1.2	1.4	1.1	3.0	5.2	0.4	0.7	1.6	4.4	2.8	NXX1	26
	18	14.0	5.0	6.5	23.2	1.8	9.4	1.2	2.5	7.3	1.3	1.2	1.7	1.1	2.2	7.0	0.5	1.1	1.4	6.1	5.4	NXX1	27
	19	12.6	4.7	6.5	21.6	1.8	14.4	1.5	2.0	7.5	1.3	1.0	1.4	1.1	2.6	5.5	0.4	1.0	1.6	5.7	5.6	NXX1	28
	20	15.2	6.0	6.8	23.8	1.5	7.8	0.8	3.2	7.3	1.3	1.1	1.5	1.0	2.4	5.8	0.5	1.2	1.6	5.3	5.9	NXX1	29

Línea	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	ALA	SDA	20:0	20:1	20:2	DHGLA	ARA	20:3n3	ETA	EPA	22:0	22:1	DPA	DHA	Otros
OE_33_2	15.9	5.2	5.8	16.6	1.8	7.4	1.4	0.8	2.7	1.0	0.4	1.2	1.5	2.7	12.6	0.0	0.0	5.0	13.7	4.8
OE_33_24	13.2	4.2	5.3	15.7	2.9	9.2	2.0	1.1	4.1	1.0	0.8	2.1	1.7	3.2	13.0	0.2	0.8	3.8	12.7	3.7
OE_33_88	14.0	4.1	8.0	15.3	3.5	9.4	2.9	0.9	3.5	0.9	0.5	1.7	1.4	2.3	12.9	0.0	0.7	3.5	12.5	3.8
OE_33_11	15.4	5.2	6.2	13.2	4.4	7.5	3.0	1.2	4.2	0.7	0.2	1.6	1.0	1.7	13.7	0.3	0.5	3.9	11.7	4.3
OE_33_5	14.5	5.0	5.8	15.4	3.1	10.1	2.3	1.1	3.7	0.9	0.5	1.8	1.1	2.8	12.5	0.3	0.4	3.8	11.5	3.8
OE_33_89	13.3	4.2	6.0	17.6	3.4	10.4	2.7	1.1	4.0	1.1	0.5	1.9	1.4	2.2	12.5	0.0	0.6	3.0	10.7	3.5
OE_33_81	11.8	3.9	5.3	16.6	2.4	12.9	2.3	1.9	4.1	1.3	0.8	2.4	1.4	3.1	13.0	0.0	0.5	3.6	10.6	3.3
OE_33_27	12.6	4.5	5.9	17.1	2.5	12.0	2.2	1.2	4.3	0.0	0.8	2.3	1.3	3.1	12.1	0.2	0.4	3.5	10.3	3.7
OE_33_97	11.9	4.0	6.4	17.5	3.1	10.7	2.4	1.1	4.2	1.1	0.6	2.4	1.3	2.8	12.9	0.0	0.5	3.0	10.3	3.5
OE_33_13	13.3	4.9	5.7	18.9	2.3	11.2	1.9	1.2	4.1	1.2	0.8	2.1	1.2	3.2	11.5	0.3	0.4	4.0	10.2	3.8
OE_33_3	13.8	4.5	6.0	18.0	2.2	11.9	2.0	1.0	4.0	1.3	0.8	2.2	1.3	3.0	11.1	0.3	0.4	3.5	10.0	2.8
OE_33_90	11.4	4.0	5.4	16.9	2.5	13.2	2.6	1.2	4.5	1.3	0.7	2.2	1.3	3.2	12.8	0.0	0.4	3.5	10.0	3.2
OE_33_31	10.6	4.2	5.6	16.3	2.7	13.3	2.3	1.2	4.4	1.2	0.7	2.3	1.4	3.3	13.0	0.2	0.4	3.3	9.8	3.7
OE_33_4	15.7	6.4	6.9	15.7	1.9	10.5	1.9	1.1	3.9	1.5	1.0	2.8	1.4	3.9	11.4	0.0	0.4	5.1	9.8	2.7
OE_33_82	10.8	4.2	5.3	16.4	3.1	14.0	2.6	1.1	4.0	1.0	0.7	2.3	1.1	3.2	13.8	0.0	0.3	2.9	9.7	3.8
OE_33_15	12.1	4.8	5.8	16.3	2.4	13.1	2.1	1.3	4.9	1.0	0.7	2.0	1.2	3.0	12.0	0.3	0.5	3.3	9.7	3.6
OE_33_14	10.8	4.1	5.8	18.2	2.8	12.5	2.5	1.1	4.2	1.2	0.8	2.6	1.3	3.2	12.5	0.2	0.4	3.1	9.6	3.0
OE_33_19	10.2	4.5	6.3	13.4	4.0	12.8	3.3	1.4	5.5	0.8	0.2	1.5	1.3	1.9	14.3	0.3	0.6	2.7	9.8	5.1
OE_33_74	11.8	4.0	6.0	19.9	3.2	11.1	2.3	1.1	4.2	1.2	0.6	2.4	1.3	2.7	12.2	0.0	0.5	2.7	9.3	3.4
OE_33_44	11.7	4.5	6.0	17.1	2.3	12.4	2.1	1.3	4.5	1.4	0.7	2.2	1.5	3.2	12.0	0.3	0.5	3.1	9.3	4.0
OE_33_63	10.7	4.4	5.9	17.1	3.2	12.0	2.4	1.2	4.4	1.2	0.8	2.6	1.2	3.1	13.0	0.2	0.4	2.9	9.2	4.0
OE_33_23	12.2	4.3	6.2	19.0	2.5	12.6	1.9	1.1	4.4	0.0	0.9	2.5	1.3	3.2	11.2	0.2	0.4	3.0	9.2	3.9
OE_33_84	11.1	4.4	6.2	19.5	2.8	10.9	2.0	1.2	4.4	1.3	0.8	2.5	1.3	3.2	12.5	0.3	0.5	3.1	9.2	3.8
OE_33_77	10.9	4.2	6.5	16.5	4.3	11.6	3.3	1.1	4.6	0.9	0.4	2.4	1.1	2.9	13.3	0.2	0.5	2.7	9.2	4.4
OE_33_7	15.1	5.0	5.6	16.4	2.3	11.7	1.9	1.2	4.5	1.2	0.6	1.6	1.3	2.9	11.5	0.3	0.4	3.5	8.1	3.5
OE_33_55	10.3	4.8	5.9	16.6	2.8	12.7	2.4	1.5	5.4	1.1	0.6	2.3	1.3	2.9	12.7	0.3	0.6	3.0	9.0	4.0
OE_33_99	11.1	3.9	5.7	17.2	2.9	14.5	2.6	1.2	5.1	1.1	0.6	1.9	1.5	3.1	11.2	0.2	0.7	3.2	8.0	3.4
OE_33_83	10.9	4.6	6.2	18.2	2.8	11.9	2.1	1.3	4.4	1.2	0.7	2.6	1.2	2.9	12.5	0.3	0.5	2.7	8.0	4.0

Para examinar de manera adicional la viabilidad de la producción de EPA y DHA en semillas de Camelina transgénicas, evaluamos actividades adicionales para esta capacidad; a continuación se muestran 4 ejemplos.

**5 Ejemplo 4 - EPA-B4.3**

[0178] Al constructo de MC original (Fig 2, comprendiendo 1), un promotor específico de semillas (el promotor de la proteína de unión a sacarosa SBP1800), OtΔ6, el gen de Δ6-desaturasa de *Ostreococcus tauri* (Domergue et al. *Biochem. J.* 389 (PT 2), 483-490 (2005); AY746357) y CatpA, un terminador; 2) un promotor específico de semillas (promotor USP1 (Baumlein et al. 1991 *Mol Gen Genet.* 1991 Mar;225(3):459-67), PSE1, una Δ6 elongasa de ácido graso de *Physcomitrella patens* (Zank, et al., *Plant J.* 31 (3), 255-268 (2002); AB238914) y el terminador CaMV35S; 3) un promotor específico de semillas (Cnl, un promotor de conlinin1 (Truksa 2003; *Plant Physiol Biochem* 41:141-147), TcΔ5, una forma de Δ5-desaturasa de *Thraustochytrium* sp. (Qiu et al. *J Biol Chem.* 2001 Ago 24;276(34):31561-6) y OCS, una región terminadora de OCS, un gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens*, añadimos Hpw-3, un gen de ω3 desaturasa de *Hyaloperonospora parasitica* tras el promotor Cnl y delante del OCS, una región terminadora de OCS, un gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens*.

**Ejemplo 5 - EPA-B5.1**

[0179] Variamos los genes presentes en el constructo de BC original (Fig 2), de manera que el PsΔ12, un gen de Δ12-desaturasa de *Phytophthora sojae* y el Piw3, un gen de ω3 desaturasa de *Phytophthora infestans* flanqueado por Np, un promotor de BnNapin y las regiones terminadoras E9 se mantuvieron, pero las actividades se

sustituyeron por: 1) 0809d6, una D6-desaturasa de *Ostreococcus* RCC809, flanqueada por el promotor de colinin1 específico de semillas Cnl y OCS, una región terminadora de OCS, el gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens* 2) FcElo6, una Δ6 elongasa de ácidos grasos de *Fragilariopsis cylindrus* CCMP 1102, flanqueada por el promotor de colinin1 específico de semillas Cnl y OCS, una región terminadora de OCS, el gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens* y 3) EmiD5, una Δ5-desaturasa de *Emiliana huxleyi* (Sayanova et al., 2011, *Phytochemistry* 72: 594-600) flanqueada por el promotor de colinin1 específico de semillas Cnl y OCS, una región terminadora de OCS, el gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens*.

**Ejemplo 6 - EPA-B5.2**

[0180] Variamos los genes presentes en el constructo de BC original (Fig 2), de manera que el PsΔ12, un gen de Δ12-desaturasa de *Phytophthora sojae* y el Piw3, un gen de ω3 desaturasa de *Phytophthora infestans* flanqueado por Np, un promotor de BnNapin y las regiones terminadoras E9 se mantuvieron, pero las actividades se sustituyeron por: 1) 0809d6, una D6-desaturasa de *Ostreococcus* RCC809, flanqueada por el promotor de colinin1 específico de semillas Cnl y OCS, una región terminadora de OCS, el gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens* 2) CeElo6, una Δ6 elongasa de ácidos grasos de *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6421-6), flanqueada por el promotor de colinin1 específico de semillas Cnl y OCS, una región terminadora de OCS, el gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens* y 3) EmiD5, una Δ5-desaturasa de *Emiliana huxleyi* (Sayanova et al., 2011, *Phytochemistry* 72: 594-600) flanqueada por el promotor de colinin1 específico de semillas Cnl y OCS, una región terminadora de OCS, el gen de octopina-sintasa de *A. tumefaciens*.

**Ejemplo 4 - DHA-B7.2**

[0181] Al constructo de DHA-1 original (Fig 2), la EhD4 D4-desaturasa de *Emiliana huxleyi* (Sayanova et al, 2011) se le sustituyó por TpDesk, una D4-desaturasa de *Thalassiosira pseudonana* (Tonon et al, 2005 *FEBS J.* 2005 Jul;272(13):3401-12), bajo los mismos elementos reguladores (Cnl1, OCS).

[0182] Se analizaron medias semillas de líneas transgénicas T1 primarias por GC-FID, tal como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1 - Análisis de ácidos grasos) y se muestran ejemplos de los perfiles de ácidos grasos observados a continuación en la Tabla 6. Estos datos indican que la capacidad de la Camelina de producir EPA y DHA no está limitada a los conjuntos de genes descritos inicialmente.

**Tabla 6**

Línea	16	16.1b	16.1d	16.2	16.3	18.0	18.1a	18.1b	18.2	GLA	bALA	ALA	SDA	20.0	20.1	20.1a	20.1c	20.2	DHGLA	ARA	20.3n3	20.4n3	EPA	22.0	22.1	22.2	DPA	DHA	24.0	
DHA-B7.2_1	5	2	1	0	0	4	6	1	1	15	5	0	19	5	3	11	0	2	1	2	0	2	5	1	1	3	4	1	0	1
DHA-B7.2_2	5	2	4	1	2	7	3	0	0	15	3	0	13	4	5	12	0	3	1	2	0	1	3	3	0	4	5	2	2	1
DHA-B7.2_3	5	2	3	0	1	5	3	0	1	12	6	0	17	9	4	15	0	2	1	1	0	2	2	0	0	5	4	0	0	2
DHA-B7.2_4	5	2	1	0	0	6	5	0	1	15	2	0	19	2	4	10	0	2	2	1	1	2	3	6	0	3	3	9	6	0
Origen natural	5	4	2	0	1	4	5	0	0	14	1	0	27	0	4	17	0	0	5	0	0	2	0	0	0	7	3	0	0	2
EPA-B4.3_1	5	2	1	0	0	4	15	0	1	8	0	0	21	1	3	13	0	1	2	1	2	2	2	11	0	3	2	1	0	1
EPA-B4.3_2	4	0	0	0	0	3	14	0	0	14	0	0	35	0	2	19	0	0	2	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	1
EPA-B4.3_3	5	1	1	0	0	2	10	0	0	14	0	0	38	0	2	17	0	0	2	0	0	2	0	0	0	5	0	0	0	2
EPA-B5.1_1	6	1	0	0	0	4	9	0	0	20	2	0	30	5	3	14	0	0	1	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0
EPA-B5.1_2	7	1	0	0	0	5	8	1	0	25	3	0	22	5	4	12	0	0	1	0	0	1	0	2	1	2	0	0	0	0
EPA-B5.1_3	6	1	0	0	0	5	10	1	0	24	2	0	27	4	3	12	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
EPA-B5.1_4	6	1	0	0	0	4	12	1	0	27	3	0	18	5	3	14	0	0	1	0	0	1	1	2	0	2	0	0	0	0
EPA-B5.1_5	5	1	0	0	0	3	12	1	0	23	2	0	25	5	3	14	0	0	1	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0
EPA-B5.1_6	6	1	0	1	0	3	11	2	1	26	4	0	18	5	2	11	0	0	1	0	1	1	1	4	0	2	0	0	0	0
EPA-B5.1_7	7	1	0	1	0	4	7	1	0	24	0	0	29	1	4	15	0	0	2	0	0	2	0	0	1	3	0	0	0	0
EPA-B5.1_8	7	1	0	1	0	6	8	2	0	32	4	0	17	4	3	10	0	0	0	0	1	0	3	0	1	0	0	0	0	0
EPA-B5.2_1	7	2	0	0	0	5	7	1	0	27	2	0	16	6	0	4	11	0	1	1	1	1	1	7	0	2	0	0	0	1
EPA-B5.2_2	6	1	0	0	0	4	13	0	0	22	1	0	27	4	0	3	14	0	1	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1
EPA-B5.2_3	7	2	0	0	0	4	6	0	0	22	2	0	22	6	0	5	15	0	1	0	0	1	0	4	1	3	0	0	0	1
EPA-B5.2_4	7	2	0	0	0	5	8	0	0	24	1	0	27	4	0	3	11	0	1	0	0	1	1	3	0	1	0	0	0	1
EPA-B5.2_5	5	1	0	0	0	3	15	0	0	24	1	0	24	4	0	2	14	0	1	0	0	1	1	3	0	2	0	0	0	0
EPA-B5.2_6	6	1	0	0	0	3	12	0	0	24	0	0	29	3	0	2	13	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
EPA-B5.2_7	7	2	0	0	0	5	6	0	0	19	2	0	22	4	0	6	16	0	2	0	1	1	1	2	2	4	0	0	0	1
EPA-B5.2_8	7	2	0	0	0	4	7	0	0	23	1	0	28	4	0	4	12	0	1	0	0	1	1	2	1	3	0	0	0	1

[0183] Varias modificaciones y variaciones de los métodos descritos y el sistema de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia sin alejarse del alcance de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con modos de realización específicos, debería entenderse que la invención según las reivindicaciones no debería limitarse de manera injustificada a estos modos de realización específicos. De hecho, varias modificaciones de los modos de realización descritos para llevar a cabo la

invención, que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o ámbitos relacionados, pretenden incluirse dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**SECUENCIAS**

[0184]

5 **SEQ ID NO: 1** (OtD6 Δ6-desaturasa de *Ostreococcus tauri* con codones optimizados)

1 ATGTGTGTTGAGACCGAGAACAACGATGGAATCCCTACTGTGGAGATCGCTTTCGATGGA  
 61 GAGAGAGAAAGAGCTGAGGCTAACGTGAAGTTGCTGCTGAGAAGATGGAACCTGCTGCT  
 121 TTGGCTAAGACCTTCGCTAGAAGATACGTGGTTATCGAGGGAGTTGAGTACGATGTGACC  
 181 GATTTCAAACATCCTGGAGGAACCGTGATTTTCTACGCTCTCTAACACTGGAGCTGAT  
 241 GCTACTGAGGCTTTCAAGGAGTTCCACCACAGATCTAGAAAAGGCTAGGAAGGCTTTGGCT  
 301 GCTTTGCCTTCTAGACCTGCTAAGACCGCTAAAGTGGATGATGCTGAGATGCTCCAGGAT  
 361 TTCGCTAAGTGGAGAAAGGAGTTGGAGAGGGACGGATTCCTCAAGCCTTCTCCTGCTCAT  
 421 GTTGCTTACAGATTTCGCTGAGTTGGCTGCTATGTACGCTTTGGGAACCTACTTGTATGTAC  
 481 GCTAGATACGTTGTGTCTCTGTGTGGTTTACGCTTGTCTTTCGGAGCTAGATGTGGA  
 541 TGGGTTCAAACATGAGGGAGGACATTCCTTTGACCGGAAACATCTGGTGGGATAAGAGA  
 601 ATCCAAGCTTTCCTGCTGGATTTCGGATTGGCTGGATCTGGAGATATGTGGAACCTCCATG  
 661 CACAACAAGCACCATGCTACTCCTCAAAAAGTGAAGCAGATATGGATTGGATACCACT  
 721 CCTGCTGTTGCTTTCTTCAACACCGCTGTGGAGGATAATAGACCTAGGGGATTCTCTAAG  
 781 TACTGGCTCAGATTGCAAGCTTGGACCTTCATTCCTGTGACTTCTGGATTGGTGTGCTC  
 841 TTCTGGATGTTCTTCTCCATCCTTCTAAGGCTTTGAAGGGAGGAAAGTACGAGGAGCTT  
 901 GTGTGGATGTTGGCTGCTCATGTGATTAGAACCCTGGACCATTAAGGCTGTACTGGATTC  
 961 ACCGCTATGCAATCCTACGGACTCTTCTTGGCTACTTCTTGGGTTTCCGGATGCTACTTG  
 1021 TTCGCTCACTTCTACTTCTCACACCCATTTGGATGTTGTTCCCTGCTGATGAGCATTTG  
 1081 TCTTGGGTTAGGTACGCTGTGGATCACACCATTGATATCGATCCTTCTCAGGGATGGGTT  
 1141 AACTGGTTGATGGGATACTTGAAGTCCAAGTATTGATCATCACTTCTCCCTTCTATGCTC  
 1201 CAATTCAGACAACCTGAGGTGTCCAGAAGATTGCTTTCGCTAAGAAAGTGGAAACCTC  
 1261 AACTACAAGGTGATGACTTATGCTGGAGCTTGGAAAGGCTACTTTGGGAAACCTCGATAAT  
 1321 GTGGAAAGCACTACTACGTGCACGGACAACATTCCTGGAAAGACCGCTTGA

**SEQ ID NO: 2** (OtD6 Δ6-desaturasa de *Ostreococcus tauri*)

MCVETENNNGIPTVEIAFDGERERAANVKLKSAEKMEPAALAKTFARRYVVIIEGVEYDVT  
 DFKHPGGTVIFYALSNTGADATEAFKEFHRSRKRKALALPSRPAKTAKVDDAEMLQD  
 FAKWRKELERDGFPPSPAHVAYRFAELAAMYALGTYLMYARYVSSVLVYACFFGARCG  
 WVQHEGGHSSLTGNWWDKRIQAFETAGFGLAGSGDMWNSMHNKHHATPQKVRHMDLDTT  
 PAVAFFNTAVEDNRPGRFSKYWLRQAWTFIPVTSGLVLLFWMFFLHPSKALKGGKYEEL  
 VWMLAAHVIRTWTIKAVTGFTAMQSYGLFLATSWVSGCYLFAHFSTSHTHLDVVPADHL  
 SWVRYAVDHTIDIDPSQGWVNWLMGYLNCQVIHHLFPSPMPQFRQPEVSRRFVAFKKWNL  
 NYKVMTYAGAWKATLGNLDNVGKHYVHGQHSKTA\*

**SEQ ID NO: 3** (PSE1 Δ6-elongasa de *Physcomitrella patens* con codones optimizados)

1 ATGGAAGTTGTTGAGAGGTTCTACGGAGAGTTGGATGGAAGGTTTCCCAAGGAGTGAAC  
 61 GCTTTGTTGGGATCTTTCGGAGTTGAGTTGACTGATACCCCACTACTAAGGGATTGCCA  
 121 CTCGTTGATTCTCCAACCTCCAATTGTGTGGGAGTGTCTGTTTACTTGACCATCGTGATC  
 181 GGAGGATTGCTTTGGATCAAGGCTAGAGATCTCAAGCCAAGAGCTTCTGAGCCATTCTTG  
 241 TTGCAAGCTTTGGTGTGGTGCACAACCTGTTCTGCTTCGCTTTGTCTCTTTACATGTGC  
 301 GTGGGTATCGCTTACCAAGCTATCACCTGGAGATATTCCTTGTGGGAAACGCTTATAAC  
 361 CCAAAGCACAAGGAGATGGCTATCCTCGTTTACCTCTTCTACATGTCCAAGTACGTGGAG  
 421 TTCATGGATAACCGTATCATGATCCTCAAGAGATCCACCAGACAGATTTCTTTCCTCCAC  
 481 GTGTACCACCATCTTCTATCTCCCTTATCTGGTGGGCTATTGCTCATCATGCTCCAGGA  
 541 GGAGAGGCTTATTGGAGTGTCTCTCAACTCTGGAGTGCATGTGTTGATGTACGCTTAC  
 601 TACTTCTTGGCTGCTTGTGTTGAGATCTTCCCAAGCTCAAGAACAAGTACCTTCTTGG  
 661 GGAAGATACCTCACCAATTCCAGATGTTCCAGTTTCACTGCTCAACTTGGTGAAGCTTAC  
 721 TACGATATGAAAACCAACGCTCCATATCCACAATGGCTCATCAAGATCCTCTTCTACTAC  
 781 ATGATCTCCCTCTTGTTCCTCTTCGGAAACTTCTACGTGCAAAAGTACATCAAGCCATCC  
 841 GATGGAAGCAAAGGGAGCTAAGACCGAGTGA

10

**SEQ ID NO: 4** (PSE1 Δ6-elongasa de *Physcomitrella patens*)

MEVVERFYGELDGKVSQGVNALLGSFGVELTDTPTTKGLPLVDSPTPIVLGVSVYLTIVIGLLWIKAR  
 DLKPRASEPFLQALVLVHNLFCFALSVMCVGIAYQAITWRYSLWGNAYNPKHKEMAILVLYFYMSKY  
 VEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHSSISLIWVAIAHHPGGEAYWSAALNSGVHVMYAYYFLAACL  
 RSSPKLKNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNLVQAYYDMKTNAPYPQWLIKILFYIMISLLFLFGNFYVQKY  
 IKPSDGKQKGAKTE\*

**SEQ ID NO: 5** (TcΔS-desaturasa de *Thraustochytrium* sp. con codones optimizados)

1 ATGGGAAAAGGATCTGAGGGAAGATCTGCTGCTAGAGAGATGACTGCTGAGGCTAACCGA  
 61 GATAAGAGAAAAGACCATCCTCATTGAGGGAGTGTGTACGATGCTACCAACTTCAAACAC  
 121 CCAGGAGGTTCCATTATTAACCTCCTCACCAGGGGAGAAGCTGGAGTTGATGCTACCCAA  
 181 GCTTACAGAGAGTTCCATCAGAGATCCGGAAGGCTGATAAGTACCTCAAGTCCCTCCCA  
 241 AAGTTGGATGCTTCTAAGGTGGAGTCTAGGTTCTCTGCTAAGGAGCAGGCTAGAAGGGAC  
 301 GCTATGACCAGGGATTACGCTGCTTTCAGAGAGGAGTTGGTTGCTGAGGGATACTTCGAT  
 361 CCATCTATCCACACATGATCTACAGAGTGGTGGAGATTGTGGCTTTGTTGCTTTGTCT  
 421 TTCTGGTTGATGTCTAAGGCTTCTCCAACCTCTTTGGTTTTGGGAGTGGTGTGAACGGA  
 481 ATCGCTCAAGGAAGATGCGGATGGGTTATGCATGAGATGGGACACGGATCTTTCCTGGA  
 541 GTTATCTGGCTCGATGATAGGATGTGCGAGTCTTCTACGGAGTTGGATGTGGAATGTCT  
 601 GGACACTACTGGAAGAACCAGCATTTCTAAGCACCATGCTGCTCCAAAACAGATTGGAGCAC  
 661 GATGTGGATTGGAACACCTTGCCACTCGTTGCTTCAACGAGAGAGTTGTGAGGAAGGTT  
 721 AAGCCAGGATCTTTGTTGGCTTTGTGGCTCAGAGTTCAGGCTTATTTGTTGCTCCAGTG  
 781 TCTTGTCTTGTGATCGGATTTGGGATGGACCTTGTACTTGCACCCAAGATATATGCTCAGG  
 841 ACCAAGAGACATATGGAGTTTGTGTGGATCTTCGCTAGATATATCGGATGGTTCCTCTG  
 901 ATGGGAGCTTTGGGATATTTCTCCTGGAACCTTCTGTGGGAATGACTCTGCTCTTTGGGA  
 961 CTTGGATGCATCTACATCTTCTCCTCAATTCGCTGTGTCTCATACCCATTGCCAGTTACC  
 1021 AACCAGAGGATCAATTGCATTGGCTTGAGTACGCTGCTGATCATACCGTGAACATCTCT  
 1081 ACCAAGTCTTGGTTGGTTACCTGGTGGATGTCTAACCTCAACTTCCAAATCGAGCATCAT  
 1141 TTGTTCACACCGCTCCACAATTCAGGTTCAAGGAGATCTCTCCAAGAGTTGAGGCTCTC  
 1201 TTCAAGAGACATAACCTCCCTTACTACGATTTGCCATACACCTCTGCTGTTTCTACTACC  
 1261 TTCGCTAACCTTACTCTGTTGGACATTCTGTTGGAGCTGATACCAAGAAGCAGGATTGA

**SEQ ID NO: 6** (TcΔ5-desaturasa de *Thraustochytrium* sp.)

MGKGSEGRSAAREMTAEANGDKRKTILIEGVLYDATNFKHPGGSINFLTEGEAGVDATQAYREFHQRS  
 GKADKYLKSLPKLDASKVESRFSAKEQARRDAMTRDYAAFREELVAEGYFDPSIPHMIYRVVEIVALFA  
 LSFWLMSKASPTSLVLGVVMNGIAQGRGCVWMHEMHHGSFTGVIWLDLDRMCEFFYGVGCGMSGHYWKNO  
 HSKHHAAPNRLEHDVDLNTLPLVAFNERVVRKVKPGSLALWLRVQAYLFAVPSCLLI GLGWTLYLHPR  
 YMLRTRKHEMFVWIFARYIGWFSLMGALGYSPGTSVGMYLCSFGLGCIYIFLQFVSHTHLPVTNPEDQ  
 LHWLEYAADHTVNI STKSWLVTWMSNLNFQIEHHLFPTAPQFRFKEISPRVEALFKRHNLPYYDLPYT  
 SAVSTTFANLYSVGHSVGADTKKQD\*

**SEQ ID NO: 7** (OtELo5 Δ5-elongasa de *Ostreococcus tauri* con codones optimizados)

1 ATGTCTGCTTCTGGAGCTTTGTTGCCTGCTATTGCTTTTCGCTGCTTACGCTTACGCTACC  
 61 TACGCTTATGCTTTTCGAGTGGTCTCATGCTAACGGAATCGATAACGTGGATGCTAGAGAG  
 121 TGGATTGGAGCTTTGCTTTGAGACTCCCTGCAATTGCTACCACCATGTACCTCTTGTTC  
 181 TGCTTTGTGGGACCTAGATTGATGGCTAAGAGGGAGGCTTTTGATCCTAAGGGATTTCATG  
 241 CTCGCTTACAACGCTTACCAACCGCTTTCAACGTTGTGGTGCCTCGGAATGTTTCGCTAGA  
 301 GAGATCTCTGGATTGGGACAACCTGTTTGGGGATCTACTATGCCCTGGAGCGATAGGAAG  
 361 TCTTCAAGATTTTGTGGGAGTGTGGCTCCATTACAACAATAAGTACCTCGAGTTGTTG  
 421 GATACTGTGTTTCATGGTGGCTAGGAAAAGACCAAGCAGCTCTCTTTCTTGCATGTGTAC  
 481 CATCATGCTTTGTTGATTTGGGCTTGGTGGCTTGTTCATCTCATGGCTACCAACGAT  
 541 TGCATCGATGCTTATTTTCGGAGCTGCTTGCAACTCTTTCATCCACATCGTGATGTACTCC  
 601 TACTACCTCATGCTGCTTTGGGAATTAGATGCCCTTGGAGAGATATATCACCAGGCT  
 661 CAGATGTTGCAATTCGTGATCGTGTTCGCTCATGCTGTTTTCGTGCTCAGACAAAAGCAC  
 721 TGCCCTGTTACTTTGCTTTGGGCACAAATGTTTCGTGATGACAAATATGTTGGTCTCTTC  
 781 GGAAACTTCTACCTCAAGGCTTACTCTAACAAGTCTAGGGGAGATGGAGCTTCTTCTGTT  
 841 AAGCCTGCTGAGACTACTAGAGCACCTTCTGTGAGAAGAACCAGGTCCAGGAAGATCGAT  
 901 TGA

**SEQ ID NO: 8** (OtELo5 Δ5-elongasa de *Ostreococcus tauri*)

MSASGALLPAIAFAAYAYATYAYAFEWSHANGIDNVDAREWIGALSRLRPAIATMTMYLLECLVGPRLMA  
 KREAFDPKGFMLAYNAYQTAFNVVVLGMFAREISGLGQPVWGSTMPSDRKSFKILLGVWLHYNNKYLE  
 LLDTVFMVARKKTKQLSFLHVVHALLIWAWWLVLVCHLMATNDCIDAYFGAACNSFIHIVMYSYLLMSAL  
 GIRCPWKRYITQAQMLQFVIVFAHAVFVLRQKHCVPVTLPAQMFVMTNMLVLFGNFYLLKAYSNKSRGDG  
 ASSVKPAETTRAPSVRRTRSRKID\*

**SEQ ID NO: 9** (EMoD5 Δ5-desaturasa de *Emiliana huxleyi* con codones optimizados)

1 ATGTCATTGGCTGCTAAAGATGCAGCCTCGGCCACTCATCCGTCTTGGACCTAAGTAT  
 61 CACGGAGCTACAAATAAGTCAAGAACTGATGCAGCAGACCTTACAGTTAGTCTTATCGAC  
 121 ACTTCTAAGGAGATGATCATAAGGGGTCGTGTGTATGATGTCCTGATTTTATTAAGG  
 181 CACCCGGGAGGAAGCATTATTAACCTCCTTAGGTTCTGATGCAACAGACGCTTATAAC  
 241 AACTTCCATATTAGGCTCAAAAAGCGGATAAAAATGTTGAGAGCTTTGCCAAGTAGGCCA  
 301 GTAGCGGATGGATTGCTAGAGACGCTTTGTCTGCAGACTTCGAGGCCCTGAGAGCCCAA  
 361 CTCGAGGCCGAAGGTTACTTCGAACCGAATCTGTGGCATGTAGCTTATCGAGTTGCGGAA  
 421 GTCGTTGCTATGTACTGGGCGGGTATTAGACTTATCTGGGCGGGTATTGGTTTTTAGGA  
 481 GCCATTGTAGCAGGAATAGCTCAGGGGAGATGCGGTTGGCTTTCAGCATGAGGGTGGTCAT  
 541 TATTCGCTCACAGGTAATATTAACCTTGATCGACACATGCAAATGATTATCTATGGATTA  
 601 GGTTCGGAATGTCGCTGTTGTTATTGGAGAAACCAACATAACAAGCACCATGCGACCCG  
 661 CAAAAGTTGGGTGCAGATCCAGACCTTCAAACAATGCCTCTGGTTGCGTTCCATGGACTC  
 721 ATCGGTGCTAAGGCTAGGGGAGCAGGAAAGTCGTGGCTAGCATGGCAAGCTCCACTTTTC  
 781 TTTGGAGGCGTTATCACACCCTGGTATCTTTTGGTTGGCAGTTTCGTCACACATCCAAAG  
 841 CACGCATTGAGAGTAGGAAACCAACTCGAATTAGGCTATATGGCTTTACGATATGCTTTA  
 901 TGGTATGCAGCATTGCGTCATCTTGGGCTTGGTGGTGTCTTTCAGATTTGACGTTTTTAT  
 961 GTGGCAGTCCGAGGTACATATATCTTACGAACCTTTCGCGTGTCTCACACACATAAGGAT  
 1021 GTTGTCCACACGATAAGCATATTTCTTGGACCTTGTATTCTGCAAACCATAACCACTAAT  
 1081 CAATCTAACACACCTCTAGTCAATTGGTGGATGGCCTATCTGAATTTTCAAATTGAACAT  
 1141 CACCTTTCCCTAGCATGCCACAATATAACCATCTAAAATCTGCGGAAGAGTGAAACAA  
 1201 TTGTTGAAAACATGGCGTAGAGTACGATGTCAGAACTTACGCGAAGTCAATGCGTGTAT  
 1261 ACATACGTGAATCTCTTGGCTGTGGGAAATGCATCTCATTCCCTTCAATCAGAGAAACGAG  
 1321 GGATTAACGACTAGGGAGTCTGCGGCTGTTAGAGTTACAGGTCATTGA

**SEQ ID NO: 10 (EMoD5  $\Delta 5$ -desaturasa de *Emiliana huxleyi*)**

1 MSLAAKDAASAHSSVLDPKYHGATNKSRTDAADLTVSSIDTSKEMIIRGRVYDVSDFIKR  
 61 HPGGSIIKLSLGS DATDAYNNFHIRSKKADKMLRALPSRPVADGFARDALSADFEALRAQ  
 121 LEAEGYFEPNLWHVAYRVAEVVAMYWAGIRLIWAGYWFLGAIVAGIAQGRCCWLOHEGGH  
 181 YSLTGNIKLDRHMOMIYGLGCGMSGCYWRNQHKKHATPQKLGADPDLQTMPLVAFHGL  
 241 IGA KARGAGKSWLAWQAPLFFGGVITTLVSVGWQFVQHPKHALRVGNQLELGYMALRYAL  
 301 WYAAFHGLGLGGAFLRYAFYVAVGGTYIFTNFVSHTHKDVVPHDKHISWTLYSANHTTN  
 361 QSNTPLVNWMAYLNFQIEHHLFSPMPQYNHPKICGRVKQLFEKHGVEYDVRTYAKSMRD  
 421 TYVNLAVGNASHSLHQRNEGLTTRESAAVRVTGH\*

**SEQ ID NO: 11 (Ps $\Delta 12$ -desaturasa de *Phytophthora sojae* con codones optimizados)**

1 ATGGCTATTTGAACCCTGAGGCTGATTCTGTGCTAACCTCGCTACTGATTCTGAGGCT  
 61 AAGCAAAGACAATTGGCTGAGGCTGGATACACTCATGTTGAGGGTGCCTCTGCTCCTTTG  
 121 CCTTTGGAGTTGCCTCATTTCTCTCTCAGAGATCTCAGAGCTGCTATTTCTAAGCACTGC  
 181 TTCGAGAGATCTTTCGTGACCTCCACTACTACATGATCAAGAACGTTGACTTGCCTG  
 241 GCTTTGTTCTACGCTGCTACCTTTCATTGATAGAGCTGGAGCTGCTGCTTATGTTTGG  
 301 CCTGTGACTGGTTCTTCCAGGGATCTTACTTGACTGGAGTGTGGGTATCGCTCATGAG  
 361 TGTGGACATCAGGCTTATGCTCTTCTGAGGTGGTGAACAACTTGATTGGACTCGTGTG  
 421 CATTCTGCTTTGTTGGTGCCTTACCCTCTTGGAGAATCTCTCACAGAAAGCACCATTCC  
 481 AACACTGGATCTTGGGAGAACGATGAGGTTTTCGTTCCTGTGACCAGATCTGTGTTGGCT  
 541 TCTTCTTGGAAACGAGACCTTGGAGGATTCTCCTCTCTACCAACTCTACCGTATCGGTAC  
 601 ATGTTGGTTGTTGGATGGATGCCTGGATACCTCTTCTTCAACGCTACTGGACCTACTAAG  
 661 TACTGGGAAAGTCTAGTCTCACTTCAACCCTTACTCCGCTATCTATGCTGATAGGGAG  
 721 AGATGGATGATCGTCTCCGATATTTCTTGGTGGCTATGTTGGCTGTTTTGGCTGCT  
 781 TTGGTGCACACTTTCTCCTTCAACACCATGGTGAAGTCTACTGTTGGTGCCTTACTTCATT  
 841 GTGAACGCTTACTTGGTGTGATTACCTACCTCCAACACACCGATACCTACATCCCTCAT  
 901 TTCAGAGAGGGAGAGTGAATGGTTGAGAGGAGCTTTGTGCACTGTGGATAGATCATTT  
 961 GGTCCATTCTCGATTCTGTGGTGCATAGAATCGTGGATACCCATGTTTGGCACCACATC  
 1021 TTCTCAAGATGCCTTTCTATCATTGCGAGGAGGCTACCAACGCTATTAAGCCTCTCCTC  
 1081 GGAAAGTTCTACTTGAAGGATACCCTCCTGTTCTGCTCTGAGATCTTACACC  
 1141 CATTGCAAGTTCGTTGAGGATGATGGAAAGGTGGTGTCTACAAGAACAGCTCTAG

**SEQ ID NO: 12 (Ps $\Delta 12$ -desaturasa de *Phytophthora sojae*)**

MAILNPEADSAANLATDSEAKORQLAEAGYTHVEGAPAPLPLELPHFSRLDLRAAIPKHCFFERSFVST  
 YMIKNVLTCAALFYAATFIDRAGAAAYVLWPVYWFQGSYLTGVVIAHECGHQAYCSSEVVNNLIGL  
 VLHSALLVPYHSWRI SHRKHSNTGSCENDEVFVPTVRSVLASSWNETLEDSPLYQLYRIVYMLVVGWM  
 PGLFFNATGPTKYWKSRSHFNPSAIYADRERWMI VLSDFLVAMLAVLALVHTFNFNTMVKFYV  
 PYFIVNAYLVLITYLQHTDTYIPHFREGAWNWLRLGALCTVDRSFGPFLDSVVHRIVDTHVCHHIFSKMP  
 FYHCEEATNAIKPLLKGYLKDTPVPVVALWRSYTHCKFVEDDGGKVVFFYKKNL\*

**SEQ ID NO: 13 (pi(w3)-desaturasa de *Phytophthora infestans* con codones optimizados)**

1 ATGGCTACAAAGGAGGCTTACGTTTTCCCAACTCTCACCGAGATCAAGAGATCTCTCCCA  
 61 AAGGATTGCTTCGAGGCTTCTGTGCCTTTGTCTCTCTACTACTGTGAGATGCTTGGTT  
 121 ATTGCTGTGGCTTTGACCTTCGGATTGAACTACCTAGAGCTTTGCCAGAGGTTGAGTCT  
 181 TTCTGGGCTTTGGATGCTGCTTTGTGCACTGGATATATCCCTCCTCCAGGGAATTGTGTTT  
 241 TGGGATTCTTCACTGTTGGACACGATGCTGGACACGGAGCTTTCTCTAGATACCACCTC  
 301 TTGAACTTCGTTGTGGAACTTCATGCACTCTCTCATCTTGACCCCATCGAGTCTTGG  
 361 AAGTTGACCCACAGACACCACCACAAGAACACCGGAAACATCGATAGAGATGAGGTGTTT  
 421 TACCACAGAGAAAGGCTGATGATCACCATTGTCCAGGAATTGATCTTGGCTTTGGGA  
 481 GCTGCTTGGCTTGTATTATTGGTGGAGGGATTCCACCAAGAAAGGTGAACCACCTCAAC  
 541 CCATTCGAGCCACTTTTTGTGAGACAAGTGTCCGCTGTGGTTATCTCTTTGCTCGCTCAC  
 601 TTCTTCGTTGCTGGACTCTATCTACTTGTCTCTCCAGTTGGGACTTAAGACCATGGCT  
 661 ATCTACTACTACGGACCAGTTTTCTGTTTGGATCTATGTTGGTATTACCACCTTCTTG  
 721 CACCACAACGATGAGGAGACTCCATGGTATGCTGATTCTGAGTGGACTTACGTGAAGGGA  
 781 AACTTGTCTCTGTGGATAGATCTTACGGTGTCTCATCGATAACCTCTCCACAAACATC  
 841 GGAATCACCAGATCCACCACCTCTTCCCAATTATCCCACTACAAGCTCAAGAAGGCT  
 901 ACTGCTGCTTTCCACCAAGCTTTCCAGAGCTTGTGAGAAAGTCCGATGAGCCAATCATC  
 961 AAGGCTTTCTTACAGAGTGGGAAGGTTGTATGCTAACTACGGAGTGGTTGATCAAGAGGCT  
 1021 AAGCTCTTCACTTTGAAGGAGGCTAAGGCTGCTACTGAAGCTGCTGCTAAGACCAAGTCT  
 1081 ACCTGA

**SEQ ID NO: 14** (pi(w3)-desaturasa de *Phytophthora infestans*)

1 MATKEAYVFPTLTEIKRSLPKDCEASVPLSLYYTVRCLVIAVALTFGLNYARALPEVES  
 61 FWALDAALCTGYILLQGI VFWGFFTVGHDAGHGAFSRYHLLNFVVTGMHSLIITPFESW  
 121 KLTHRHHKNTGNIDRDEVFYPQRKADDP LSRNLILALGAAWLAYLVEGFPPRKVNHFN  
 181 PFEPLFVRQVSAVVISLLAHFFVAGLSIYLSLQLGLKTMAYYYGPFVFGSMLVITTFLL  
 241 HHNDEETPWYADSEWTVYKGNLSSVDRSYGALIDNLSHNI GTHQIHHLFPI I PHYKLKKA  
 301 TAAFHQAFPELVRSDEPI I KAFFRVGRLYANYGVVDQEA KLFLLKEAKAATEAAAKTKS  
 361 T\*

**SEQ ID NO: 15** (EhD4  $\Delta 4$ -desaturasa de *Emiliana huxleyi* con codones optimizados)

1 ATGGGGGGTGCAGGCGCTTCGGAAGCAGAGAGGCCAAAGTGGACAACTATCCACGGAAGA  
 61 CACGTTGATGTGTCAAAGTTTAGACACCCTGGAGGTAATATCATTTGAATTGTTCTATGGC  
 121 ATGGATAGTACATCCGCTTTTCGAGCAATTTACCGGACATCATAAGGGGGCATGGAAGATG  
 181 CTCAAGGCTCTTCTTACCAAGGAGGTTGACCCAGCTGACGTCACAGCAACCTCAAGAA  
 241 CATGTCGCGGAGATGACCAGACTTATGACATCCTGGAGAGAAAGGGGTTTATTCAAGCCT  
 301 CGTCCGGTTGCATCTGGCATATATGGACTTGCAGTAGTTGCTGCTATAGTTGCATGCATT  
 361 GCATGTGCTCCGCACGCACCGGTTCTGTCCGGGATGGTTTAGGGTCTTGTGGGCCCAA  
 421 TGCGGTTTCTTGCAGCATATGGGGGACATAGGGAGTGGGGGTCAGGTATTTCTTTCTTG  
 481 CTCCAACACTTCTTTGAGGGTTTACTAAAGGGAGGATCAGCTAGCTGGTGGAGGAACAGA  
 541 CATAATAAGCATCATGCCAAAACCAATGTTCTTGGAGAGGATGGTGCACCTCGAACTACT  
 601 CCATTTCTTTCGTTGGGACCCGACTCTCGCTAAAAAGGTGCCGGATTGGTCTCTGAAGACA  
 661 CAAGCTTTCACCTTCTCCAGCACTAGGAGCCTATGTTTTCGTTTTTCGCTTTTACAATT  
 721 AGAAAATACGCTGTGGTGA AAAA ACTCTGGCAGCAACTTGTCTAATGATTGCTCATTAC  
 781 GCAATGTTCTACTATGCCTGCAGTTGGCTGGAGCCAGTTTGGGTTCTGGACTTGCATTT  
 841 TACTGCACAGGTTACGCATGGCAGGGAATCTACCTCGGATTTCTTTCGTTTTGAGCCAC  
 901 TTTGCAGTCGAGAGAGTACCAAGCACAGCGACATGGCTCGAAAGCTCAATGATAGGTTCA  
 961 TGGCAGGGAATCTACCTCGGATTCTTCTTCGTTTTGAGCCACTTTGCAGTCGAGAGAGTA  
 1021 CCAAGCACAGCGACATGGCTCGAAAGCTCAATGATAGGTACGGTAGACTGGGGAGGTTCA  
 1081 TCTGCTTTTTGTGGTTATGTTTCTGGTTTCTTGAATATCCAAATTTGAACATCACATGGCC  
 1141 CCTCAAATGCCATGGA AAAA CTGAGACAGATCAGGGCAGATTGTAAGGCTAGTGCTGAG  
 1201 AAACCTCGGCTTCCATATAGAGAGTTGTCAATTCGAGGTTGCTGCAACTCATGATGGTA  
 1261 GGTCTCTGGAGGACTGGAAGAGACGAATTACAGCTCCGAAGTATCGAAGAAAGTACTCA  
 1321 AGAACCAGGCTTACATGGCGGCTGCTTACAGCTGTTGTTGAAAATCTGAAGGCAGATTAA

**SEQ ID NO: 16** (EhD4  $\Delta 4$ -desaturasa de *Emiliana huxleyi*)

1 MGGAGASEAERPkwTTIHGRHVDVSKFRHPGNI IELFYGMDSTSAFEQFHGHKGAWKM  
 61 LKALPTKEVDPADVPQQQEHVAEMTRLMTSWRERGLFKPRPVASGI YGLAVVAIVACI  
 121 ACAPHAPVLSGIGLGSWAQCGFLQHMGGHREWGVRYSFLLQHFFEGLLKGGASASWWRNR  
 181 HNKHHAKTNVLGEDGDLRTPFFAWDPTLAKKVPDWSLKTQAF TFLPALGAYVVFVFAFTI  
 241 RKYAVVKKLWHELALMIAHYAMFYALQLAGASLGSLAFYCTGYAWQGIYLGFFFLSH  
 301 SAVERVPSTATWLESSMIGSWQGIYLGFFFLSHFAVERVPSTATWLESSMIGTVDWGGS  
 361 SAFRCYVSGFLNIQIEHMAPQMPMENLRQIRADCKASA EKLGLPYRELSFAGAVKLMV  
 421 GLWRTRDELQLRSDRRKYSRTQAYMAAASAVVENLKAD\*

**SEQ ID NO: 17** ( $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium* sp., ATCC21685 con codones optimizados)

1 ATGACTGTTGGATACGATGAGGAGATCCCATTGAGCAAGTTAGGGCTCATAACAAGCCA  
 61 GATGATGCTTGGTGTGCTATTTCATGGACACGTGTACGATGTTACCAAGTTCGCTTCTGTT  
 121 CATCCAGGAGGAGATATATCTTGCCTGCTGCTGGAAGGAAGCTACTGTGCTCTACGAG  
 181 ACCTACCATGTTAGAGGAGTGTCTGATGCTGTGCTCAGAAAAGTACAGAATCGGAAAGTTG  
 241 CCAGATGGACAAGGAGGAGCTAACGAGAAGGAGAAGAGAACCTTGTCTGGATTGTCCTCT  
 301 GCTTCTTACTACACCTGGAACCTCCGATTTCTACAGAGTGTGAGGGAGAGAGTTGTGGCT  
 361 AGATTGAAGGAGAGAGGAAAGGCTAGAAGAGGAGGATACGAGTTGTGGATCAAGGCTTTC  
 421 TTGCTCCTTGTGGATTCTGGTCTCTCTTTACTGGATGTGCACCCCTCGATCCATCTTTC  
 481 GGAGCTATCTTGGCTGCTATGTCTTTGGGAGTGTTCGCTGCTTTTGTGGAACCTGCATC  
 541 CAACATGATGGAACCATGGAGCTTTCGCTCAATCTAGATGGGTAAACAAGGTGGCAGGA  
 601 TGGACTTTGGATATGATCGGAGCTTCTGGAATGACTTGGGAGTTCACACATGTGTGGGA  
 661 CATCACCCATACACTAATTGATCGAGGAGGAGAACGGATTGCAAAAGGTGTCCGGAAAAG  
 721 AAGATGGATACCAAGTTGGCTGATCAAGAGTCTGATCCAGATGTGTTCTCCACCTACCCA  
 781 ATGATGAGATTGCATCCATGGCATCAGAAGAGATGGTATCACAGGTTCCAGCATATCTAC  
 841 GGACCATTCACTCTCGGATTCATGACCATCAACAAGGTGGTGAATCAAGATGTTGGAGTG  
 901 GTGTTGAGAAAAGGCTCTTCCAAATCGATGCTGAGTGCAGATATGCTTCCCAATGTAC  
 961 GTTGTAGGTTCTGGATCATGAAGGCTTTGACCGTGTGTACATGGTGTCTCTCCATGT  
 1021 TATATGCAAGGACCATGGCATGGATTGAAGCTCTTCGCTATCGCTCATTTCACTTGC  
 1081 GAGGTTTTGGCTACCATGTTTCATCGTGAACCATATATCGAGGGAGTGTCTTACGCTTCT  
 1141 AAGGATGCTGTTAAGGGAATATGGCTCCACCAAGACTATGCATGGAGTGACCCCAATG  
 1201 AACAACTAGAAAAGGAGGTTGAGGCTGAGGCTTCTAAGTCTGGAGCTGTGGTAAAGTCT  
 1261 TGGCCATTGGATGATGTTGGCTGCTGTTCAATGCCAAACCTCTGTGAATGCTGTGGGA  
 1321 TCTTGGTTCTGGAACCATTTCTCTGGAGGACTCAACCATCAAATCGAGCATCATCTCTTC  
 1381 CCAGGATTGTCTCACGAGACCTACTACCACATCCAAGATGTGGTTCATCTACCTGTGCT  
 1441 GAGTACGGAGTTCATACCAACATGAGCCATCTTTGTGGACTGCTTACTGGAAGATGCTC  
 1501 GAACATTTGAGACAATTGGGAAACGAGGAGACTCACGAGTCTTGGCAAAGAGCTGCTTGA

**SEQ ID NO: 18 ( $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrium* sp., ATCC21685)**

1 MTVGYDEEIPFEQVRAHNKPDDAWCAIHGHVYDVTKFASVHPGGDI ILLAAGKEATVLYE  
 61 TYHVRGVS DAVLRKYRIGKLPDQGGANEKEKRTLSGLSSASYTWNSDFYRVMRERVVA  
 121 RLKERGKARRGGYELWIKAFLLLVGFWSLSLYMCTLDPSFGAILAAMS LGVFAAFVGT  
 181 QHDGNHGAFAQSRWVNKVAGWTLDMIGASGMTWEFQHLGHHPYTNLIEEENGLQKVS  
 241 KMDTKLADQESDPDVFSYPMMLRHPWHQKRWYHRFQHIYGPFI FGFMTINKVVTQDVG  
 301 VLRKRLFQIDAECRYASPMYVARFWIMKALTVLYMVALPCYMQGPWHLKLFIAIHF  
 361 EVLATMFI VNHII EGVSYASKDAVKGTMAPPKTMHGVT PMNNTRKEVEAEASKSGAVVKS  
 421 VPLDDWAAVQCQTSVNWSVGSWFNHFSGGLNHQIEHHLFPGLSHETYYHIQD VVQSTCA  
 481 EYGVVPYQHEPSLWTAYWKMLEHLRQLGNEETHESWQRAA\*

**SEQ ID NO: 19 (O809D6  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus* RCC809 con codones optimizados)**

ATGGGAAAGGGAGCAAGGAACCCAGGAGCAAGGGCATGGAAGTCAACATTTGGAGCCTCACGCAGTGGCA  
 AAGTCATTCGATAGGAGATGGGTTAAGGTGGATGGAGTTGAATACGATGTGACTGATTTCAAGCATCCT  
 GGAGGTAGTGTATATACTACATGCTTTCTAACACAGGTGCTGATGCAACCGAAGCTTTTAAGGAGTTC  
 CATTACAGGAGTAAGAAAGCTAGGAAAGCACTTGCCTGCATTCGCTCAAAGAGAACCAGAGGATGCTTCA  
 CCAGTTGAAGATGCAACATGCTCAAGGATTCGCTAAGTGGAGAAAGGATCTCGAAAGGGAGGGATTT  
 TTCAAACCTTCTCCAGCTCATGTGGCATAATAGATTTGCTGAGCTTGTGCAATGTTCGCTCTCGGTACA  
 GCATTAATGTACGCTAGATGGCAGCAACTTCTGTTTTCGTGACAGCTTGTCTTTGGAGCAAGATGC  
 GGTGGGTTCAACATGAGGGAGTCACTCTCATTGACTGGATCAATCTGGTGGGATAAGAGAATACAG  
 GCTTTTACAGCAGGATTCGGTCTCGCTAGTCTGGTGTATATGTGGAATTTAATGCATAACAAGCATCAC  
 GCAACCCCTCAAAAAGTTAGGCACGATATGGATTTGGATACTACACCAGCTGTTGCATTTTCAATACT  
 GCTGTGGAAGAGAACAGACCTAGGAAGTTTCTAAACTTTGGTTGAGAGTTCAGGCTTGACCTTCGTT  
 CCTGTGACTTCAGGACTCGTGTCTTTGGCTTGGATGTATCTCTTACATCCAAGACACATTGCAAGAAGG  
 AAGAATTACGAAGAGGCTGCATGGATCGTTGCTGCACATGTGATAAGGACATCAGTTATTAAGCTGTG  
 ACAGGATATAGTTGGATAACCTGTTACGGTCTCTTTTAAAGTACCATGTGGGTTTCTGGATGCTATCTT  
 TTTGCTCATTTCTCAACCAGTCACTACTCACCTTGATGTTGTGCCTTCAGATAAGCATTGAGTTGGGTT  
 AGATATGCTGTGGATCACACTATGATATCGATCCATCTAAATCAGTTGTGAATGGCTTATGGGTTAC  
 TTGAACTGTCAAGTTATCCATCACTTGTTCCTGATATGCCACAATTCAGACAGCCAGAAGTTCTTAGA  
 AGGTTTGTGTCATTCGCTAAGAAATGGAATCTCAACTACAAGGTTATGTCTTATTACGGAGCTTGGAAA  
 GCAACATTCGGTAACCTTAACGAAGTTGGAAAGCACTACTATATTCAGGGTTCTCAAATCACAAAAAG  
 ACCGTGTAA

**SEQ ID NO: 20 (O809D6  $\Delta 6$ -desaturasa de *Ostreococcus* RCC809)**

1 MGKGARNPGARAWKSTLEPHAVAKSFDRRWVKVDGVEYDVTFDKHPGGSVIYYMLSNTGA  
 61 DATEAFKEFHYSKARKALALPQREPEDASPVEDANMLKDFAKWRKDLEREGFFKPS  
 121 AHVAYRFAELAAMFALGTALMYARWHATSVFVTACFFGARCGWVQHEGGHSSLTGSIWWD  
 181 KRIQAFTAGFGLASSGDMWNLMHNKHHATPQKVRHMDLDTTPAVAFFNTAVEENRPRKF  
 241 SKLWLRVQAWTFVFPVTSGLVLLAWMYLLHPRHIARRKNYEEAAWIVAHVIRTSVIKAVT  
 301 GYSWITCYGLFLSTMWVSGCYLFAHFSTSHTHLDVVPSPDKHLSWVRYAVDHTIDIDPSKS  
 361 VVNWLMGYLNCQVIHHLFPDMPQFRQPEVSRRFVVSFAKKWNLNYKVMSYYGAWKATFGNL  
 421 NEVGKHYIQQSQITKKTV-

**SEQ ID NO: 21 (FcELO6 Δ6-Elongasa de *Fragilariopsis cylindrus* CCMP 1102 con codones optimizados)**

ATGGATGAATACAAGGCAACTTTAGAGAGTGTGGGAGATGCTATAATAACAATGGGCAGATCCTGAGAGT  
 CAATTTACTGGTTTTACAAAGGGATGGTTTCTTACAGATTTACCTCAGCTTTCAGTATAGCACTTGT  
 TACGTGTGTTTCGTTATTATCGTAGTCAAGTTATGAAGGTGCTTCTGCTATTGATCCTTACCCAATA  
 AAGTTTTTCTACAATGTTTCTCAGATCATGTTGTGTGCATACATGACTATAGAAGCTTGCTTTTGGCA  
 TATAGAAACGGATACAAATCATGCCTTGTGTTGGTTATAATAGGGATGATCCAGCTATAGGAAACCTC  
 TTATGGCTCTTTTACGTTTCAAAAGTGTGGGATTTCTGGGATACCATCTTCATGTTCTTGGTAAGAAA  
 TGGAGACAACTCAGTTTCTTACATGTGTATCATCACACTACAATCTTCTCTCTACTGGTTAAATGCT  
 AACGTTTTCTATGATGGAGATATATACCTTACAATCGCATTGAATGGTTTCATACATACTGTGATGTAC  
 ACATACTACTTTATCTGTATGCACACCAAGGATAAGAAAAGTCTTGCCTATATGGTGGAG  
 TCTTCACTCACACTTTGCAATTTTTCAGTTCATCACCATGATGTACAGGGACTCTATTAATAAATT  
 TTCGGTTGCGAGAGTTTGTCTATAAGGGTTACCGCTACTTACGTTGTGTACATACTTTCTTTGTTTTTC  
 CTCTTCGCTCAATTTTTCGTGGCATCTTACATGCAGCCAAAGAAATCAAAAAGTCTTGA

**SEQ ID NO: 22 (FcELO6 Δ6-Elongasa de *Fragilariopsis cylindrus* CCMP 1102)**

1 MDEYKATLESVGDALIQWADPESQFTGFTKGWFLTDFTSAFSAIALVYVLFVIGSQVMKV  
 61 LPAIDPYPIKFFYNVSOIMLCAYMTIEACLLAYRNGYTIMPCVGYNRDDPAIGNLLWLFY  
 121 VSKVWDFWDTIFIVLGGKWRQLSFLHVVHHTTIFLFYWLNAVYFDGDIYLTIALNGFIH  
 181 TVMYTYFFICMHTKDKKTGKSLPIWVKSSLLQLLQFQFITMMSQGLYLIIFGCELSLIRV  
 241 TATYVVYILSLFFLFAQFFVASVMQPKKSKTA-

**SEQ ID NO: 23 (CeELO6 Δ6-elongasa de *Caenorhabditis elegans* con codones optimizados)**

ATGGCTCAGCACCCACTCGTTTACAGAGTTACTTGATGTTAAATTCGATACAAAAGAGGTTTCGTGGCAATA  
 GCAACTCATGGTCTTAAAAATTTCCCTGATGCTGAAGGAAGAAAGTTTTTCGCAGATCATTTGATGTT  
 ACTATTCAAGCTAGTATACTCTACATGGTTGTGGTTTTTGGTACTAAATGGTTCATGAGAAACAGGCAA  
 CCTTTCCAGTTAACAAATCCCACTTAACATATGGAACCTCATTTTGGCTGCATTCTCAATCGCTGGAGCA  
 GTGAAGATGACCCCTGAGTTTTTTCGGAACATATGCTAACAAGGGTATTGTGGCATCATACTGTAAGGTT  
 TTCGATTTACCAAAGGAGAAAACGGTTACTGGGTTTTGGCTTTTCATGGCTAGTAAGCTTTTTGAGTTG  
 GTGGATACTATCTTCTTGTGTTTGGAAAAAGGCCACTCATGTTCTCCATTGGTACCATCACATCCTC  
 ACAATGATATACGCTTGGTACTCTACCCCTTACCCAGGATTCAACAGATACGGTATTACTTGAAC  
 TTTGTGGTTACGCATTATGTAATCTTATTACTTCTCAGATCAATGAAGATCAGGGTTCCAGGATTT  
 ATTGCTCAAGCAATCACAAGTTTACAAATAGTGCAGTTCATTATCTCTTGTGCTGTTCTTGCACATTTG  
 GGTTATCTCATGCACTTTACCAATGCTAAGTGCAGTTTTGAACCTTCTGTGTTCAAATGGCTGTTTTT  
 ATGGATACTACATACCTCGCACTCTTCGTGAATTTCTTCTTTCAGTCATATGTTCTCAGGGGTGGTAAG  
 GATAAGTACAAAGCTGTTCCAAAGAAAAGAATAACTGA

**SEQ ID NO: 24 (CeELO6 Δ6-elongasa de *Caenorhabditis elegans*)**

1 MAQHPLVQRLLDVKFDTKRFVAIATHGPKNFPDAEGRKFFADHFDVTIQASILYVVVFG  
 61 TKWFMNRNRPFFQLTIPLNIWNFIILAAFSIAGAVKMTPEFFGTIANKGIVASYCKVDFDK  
 121 GENGYWVWLFMASKLFLVDVTIFLVLKRPLMFLHWHYHHTMIYAWYSHPLTPGFNRYG  
 181 IYLNFBVHAFMYSYYFLRSMKIRVPGFIAQAITSLQIVQFIISCAVLAHLGTYLMHFTNAN  
 241 CDFEPSVFKLAVFMDTTYLALFVNFLLQSYVLRGGKDKYKAVPKKNN-

**SEQ ID NO: 25 (TpDesK Δ4-desaturasa de *Thalassiosira pseudonana* con codones optimizados)**

ATGGGTAATGGTAATCTTCCAGCATCTACAGCACAACCTCAAGTCAACAAGTAAACCTCAACAGCAACAC  
 GAGCACAGAACAATCAGTAAATCTGAATTGGCACAACATAACACTCCTAAGTCTGCTTGGTGTGCAGTT  
 CATTCAACTCCTGCTACAGATCCAAGTCACTCTAATAACAAACAGCATGCACACCTTGTTTTGGATATT  
 ACAGATTTTCGCTTCTAGACATCCAGGAGGAGATTTGATTTCTTTTGGCTTCAGGAAAAGATGCAAGTGTG  
 CTCTTCGAGACCTACCACCCCTAGGGGAGTTCCAACCTCATTAAATTCAAAAGCTTCAGATCGGTGTTATG  
 GAAGAGGAGCTTTTAGAGATAGTTTCTACTCTTGGACAGATTCTGATTTCTACACCGTTCTTAAGAGA  
 AGGGTTGTGAAAAGATTAGAGGAAAAGGGGACTTGATAGAAGGGGTTCAAAGAGATTTGGATCAAGGCT  
 TTATTTCTCTTAGTTGGATTCTGGTACTGTCTTTACAGATGTACACTACATCAGATATAGATCAATAC  
 GGAATAGCTATTGCATATAGTATCGGAATGGGTACTTTTGGCTGCATTCATCGGTACATGCATACAACAT  
 GATGGAACACCGGTGCTTTCGCACAGAACAAGCTTTTGAACAAGTTGGCTGGATGGACACTCGATATG  
 ATCGGTGCTTCTGCATTCACCTGGGAATTGCAGCATATGCTCGGTCAACCTTACACTAATGTTCTT  
 GATGGAGTGGAGGAAGAGAGAAAAGAAAAGGGGAGAGGATGTGGCTTTGGAAGAGAAGGATCAAGAGTCA  
 GATCCAGATGTTTTCTTTCATCCCTCTCATGAGAAATGCATCCACATCACACCCTAGTTGGTACCAT  
 AAATATCAGCACCTTTATGCTCCTCCACTCTTTGCATTAATGACCTTGGTAAAGGTGTTCAACAGGAT  
 TTCGAAGTTGCAACATCTGGAAGATTGTACCATATTGATGCTAACGTTAGATATGGTTCAAGTTTGGAAAT  
 GTGATGAGATTCTGGGCTATGAAAGTTATCAAAATGGGATAACATGATGGGTTTGCCTATTTACTTTTCA  
 GGAGTTCTCAGGGGAGTGGGCTTTTTCGTTATCGGACACCTTGCATGTGGTGAACCTCTAGCTACTATG  
 TTCATAGTTAACCATGTGATTGAGGGAGTGTGATGTTTGTACAAAAGATCTTGTGGAGGTGCATCTCAC  
 GGAGATGAAAAGAAAATTGTGAAAGCCTACAACCGTTTGGGTGATACCCCAATGGAGAAAAGTAACTAGAGAA  
 GAGGCTCTCAAGTCAAACAGTAAACAACAAGAAAAGGGGAGAAAAGAACTCAGTTCTAGTGTGCCA  
 TTTAATGATTTGGGCTGCAGTGAATGCCAGACTTCTGTTAACTGGTCTCCTGGTTCATGGTTTTGGAAAT  
 CATTTCAGTGGAGGTTTGTCTCACCAAAATCGAGCATCACCTCTTCCCAAGTATATGTCATACTAACCTAC  
 TGCCACATTCAGATGTTGTGGAATCTACATGTGCTGAGTACGGTGTGCCATATCAGTCTGAATCAAAC  
 TTGTTGCTTGCATACGGAAGATGATCTCACATTTGAAGTTCCTCGGTAAGGCTAAGTGCAGTGA

**SEQ ID NO: 26 (TpDesK Δ4-desaturasa de *Thalassiosira pseudonana*)**

1 MGNGNLPASTAQLKSTSKPQQQHEHRTISKSELAQHNTPKSAWCAVHSTPATDPHSHNNK  
 61 QHAHLVLDITDFASRHPGGDLILLASGKDASVLFETYHPRGVPTSLIQKLQIGVMEEEAF  
 121 RDSFYSWTDSDFYTVLKRVRVERLEERGLDRRGSKEIWIKALFLLVGFVWYCLYKMYTTSD  
 181 IDQYGIAIAYSIGMGTFAAFIGTFCIQHDGNHGAFQNKLLNKLAWTLDMIGASAFWTWEL  
 241 QHMLGHHPYTNVLDGVEEERKERGEDVALEEKDQESDPDVFSSFFPLMRMHPHHTTSWYHK  
 301 YQHLIYAPPLFALMTLAKVFQQDFEVATSGRLYHIDANVRYGSVWNVMRFWAMKVIITMGYM

**SEQ ID NO: 27 (Hpw-3, una w3-desaturasa de *Hyaloperonospora parasitica* con codones optimizados)**

1 ATGGCTACTAAACAATCAGTTGCTTTTCTACTTTGACTGATCTTAAAAGATCTCTTCCT  
 61 TCTGAGTGTTTGAATCTTCTTTGCTCTTTCTCTTTACTATACACTTAGATCTTTGGTT  
 121 TTTGCTGGTTCTCTTGGTGTCTTCTTCTTCTTCTTACTGCTCTTGCTCAACCTTTGGTTCAAAC  
 181 TTTTACCCTCTTAGAGTTGCTCTTATTGCTGGATACACTGTTTTTCAAGGAGTTATTTTC  
 241 TGGGGATTTTTCACTATTGGTCATGATGCTGGTCATGGTGTCTTTTTCTAGATATCCTGTT  
 301 CTTAACTTCACTGTTGGAACACTTATGCATTTCTTATTTTACTCCTTTTGAATCTTGG  
 361 AAGTTGACTCATAGACATCATCATAAAAACACTGGAAATATCGATAGAGATGAGATCTTC  
 421 TACCCTCAAAGAGAATCTGATGATCATCCTGTTTCTAGACATCTTACTTTCACTCTTGA  
 481 GCTGCTTGGTTGCTTACCTTGTGAGGGTTTTCCACCTAGAAAATTGAATCATTACAAAT  
 541 CTTTTCGAGCCATTGTTTCGAGAGAAGAGTTTTCTGCTGTTGTATCTATCTTGGCTCAG  
 601 TTTTTCGTTGCAGGATTTGCTATTTACTTGTGTTTCCAGGTTGGAGTTCAGGCTGTTGCT  
 661 CTTTACTATTACGGTCTATCTTCGTTTTTGGTACTATGCTTGTATTTACTACTTTTCTT  
 721 CATCATAACGATGAAGAGACTCCTTGGTACGGTGATGAGGATTTGGTCTTACGTTAAGGGT  
 781 AACTTGTCTTCTGTTGATAGATCTTACGGTCTCTTATCGATAACTTGTCTCATAACATC  
 841 GGTACTCATCAAGTTCATCATCTTTTCCCAATCATCCCTATTACAAATTAAGCCTGCT  
 901 ACAGCTGCTTTCAGAAGAGCTTTCCACATCTTGTAGAAAAGTCTGATGAAAGAATTTG  
 961 CAGGCTTTTTACAGAATTGGTAGATTGTATGCTAAATATGGTGTGCTGATTCTTCTGCT  
 1021 AAATTGTTTACATTGAAGGAAGCTCAACTTACTTCTAAAGCTGCTTCTGATGCTAAAGCT  
 1081 GCTTGA

**SEQ ID NO: 28 (Hpw-3, una w3-desaturasa de *Hyaloperonospora parasitica*)**

1 MATKQSVAFPTLTLDLKRSLPSECFESSLPLSLYYTLRSLVFAAGSLAVLSLYALQPLVQN  
 61 FYPLRVALIAGYTVFQGVIFWGFFTIGHDAGHGAFSRYVPLNFTVGTLMHSLILLTPFESW  
 121 KLTHRHHKNTGNIDRDEIFYPQRESDDHPVSRHLFTLGAAWFAYLVEGFPPRKLNHYN  
 181 PFEPLFERRVSAVVISILAQFFVAGLSIYLCFQVGVQAVALYYGPIFVFGTMLVITTF  
 241 HHNDEETPWYGDDEWSYVKGNLSSVDRSYGLIDNLSHNIQTHQVHHLFPIIPHYKLP  
 301 TAAFRRAFPHLVRKSDERILQAFYRIGRLYAKYGVADSSAKLFTLKEAQLTSKAASDAKA  
 361 A-

## REIVINDICACIONES

1. Planta o célula de camelina recombinante que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa y una  $\Delta 5$ -desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias reguladoras; donde la planta o célula de camelina recombinante comprende secuencias polinucleotídicas para las tres enzimas; donde la  $\Delta 6$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:20, y donde la planta o célula de camelina recombinante es capaz de producir ácido eicosapentaenoico (EPA). 5
2. Planta o célula de camelina recombinante según la reivindicación 1 que comprende además uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 12$ -desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias regulatorias. 10
3. Planta de camelina recombinante según la reivindicación 1 o 2 donde la planta es una semilla; y/o donde las enzimas desaturasa y elongasa se derivan de manera independiente de algas, bacterias, mohos o levadura.
4. Planta o célula de camelina recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la  $\Delta 6$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO:24, y la  $\Delta 5$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO: 10. 15
5. Planta o célula de camelina recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la  $\Delta 6$ -desaturasa se deriva de *Ostreococcus tauri*, la  $\Delta 6$ -elongasa se deriva de *Physcomitrella patens* y la  $\Delta 5$ -desaturasa se deriva de *Thraustochytrium sp.*
6. Método para producir EPA que comprende cultivar una planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones donde se expresan dichas enzimas desaturasa y elongasa y se produce EPA en dicha planta o célula. 20
7. Método para producir aceites vegetales de semillas que comprende cultivar una planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones donde se expresan dichas enzimas desaturasa y elongasa y se produce un aceite vegetal de semillas en dicha planta o célula. 25
8. Aceite vegetal de semillas producido por el método según la reivindicación 7, donde el EPA constituye al menos un 15 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y el  $\gamma$ -linolénico (GLA) constituye menos del 10 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite; 30
  - preferiblemente donde el EPA constituye al menos un 20 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;
  - preferiblemente donde el EPA constituye de un 20 % a un 31 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
9. Aceite vegetal de semillas según la reivindicación 8 donde el GLA constituye menos de un 7 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite; 35
  - preferiblemente donde el GLA constituye de un 1 % a un 6 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
10. Aceite vegetal de semillas según la reivindicación 8 o la reivindicación 9 donde la proporción de porcentajes molares de EPA a  $\gamma$ -linolénico (GLA) es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 22:1, preferiblemente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1. 40
11. Planta o célula de camelina recombinante que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 6$ -desaturasa, una  $\Delta 6$ -elongasa, una  $\Delta 5$ -desaturasa, una  $\Delta 5$ -elongasa y una  $\Delta 4$ -desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias reguladoras; donde la planta o célula de camelina recombinante comprende secuencias polinucleotídicas para las cinco enzimas; donde la  $\Delta 6$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:20, y donde la planta o célula de camelina recombinante es capaz de producir EPA y/o ácido docosahexaenoico (DHA). 45
12. Planta o célula de camelina recombinante según la reivindicación 11 que comprende además uno o más polinucleótidos que codifican una  $\Delta 12$ -desaturasa y/o una  $\omega 3$  desaturasa unidas de forma operativa con una o más secuencias regulatorias.
13. Planta de camelina recombinante según la reivindicación 11 o 12 donde la planta es una semilla; y/o donde las enzimas desaturasa y elongasa se derivan de manera independiente de algas, bacterias, mohos o levadura. 50
14. Planta o célula de camelina recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde la  $\Delta 6$ -elongasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO:24, la  $\Delta 5$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:10, la  $\Delta 5$ -elongasa 55

comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 50 % de identidad con la SEQ ID NO: 8 y la  $\Delta 4$ -desaturasa comprende una secuencia de aminoácidos que presentan al menos una identidad del 50 % con la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO:26.

- 5 **15.** Planta o célula de camelina recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 donde la  $\Delta 6$ -desaturasa se deriva de *Ostreococcus tauri*, la  $\Delta 6$ -elongasa se deriva de *Physcomitrella patens* y la  $\Delta 5$ -desaturasa se deriva de *Thraustochytrium sp.*, la  $\Delta 5$ -elongasa se deriva de *Ostreococcus tauri* y la  $\Delta 4$ -desaturasa se deriva de *Emiliana huxleyi* o *Thraustochytrium sp.*
- 10 **16.** Método para producir DHA que comprende cultivar una planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en condiciones donde se expresan dichas enzimas desaturasa y elongasa y se produce DHA en dicha planta o célula.
- 17.** Método para producir EPA que comprende cultivar una planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en condiciones donde se expresan dichas enzimas desaturasa y elongasa y se produce EPA en dicha planta o célula.
- 15 **18.** Método para producir un aceite de camelina que comprende cultivar una planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en condiciones donde se expresan dichas enzimas desaturasa y elongasa y se produce aceite en dicha planta o célula.
- 20 **19.** Aceite vegetal de semillas producido por el método según la reivindicación 18, donde el DHA constituye al menos un 5 %, al menos un 7 %, al menos un 10 %, o al menos un 13 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite, y el  $\gamma$ -linolénico (GLA) constituye menos del 5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;
- preferiblemente donde el DHA constituye al menos un 13 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;
- 25 preferiblemente donde el DHA constituye de un 5 % a un 15 %, de un 10 % a un 15 % o de un 10 % a un 13,7 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 20.** Aceite vegetal de semillas según la reivindicación 19 donde el GLA constituye menos de un 3,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite;
- preferiblemente donde el GLA constituye de un 0,5 % a un 5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 30 preferiblemente donde el GLA constituye de un 1,5 % a un 3,5 % (% mol) del contenido total de ácidos grasos de dicho aceite.
- 21.** Aceite vegetal de semillas según la reivindicación 19 o 20 donde la proporción de los porcentajes en peso de EPA a DHA es de aproximadamente 0,8:1 a aproximadamente 1,4:1.
- 35 **22.** Aceite vegetal de semillas según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20 donde la proporción de los porcentajes molares del total de (EPA + DHA) a GLA es de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 3:1, o de aproximadamente 17:1 a aproximadamente 7:1.
- 23.** Utilización de camelina en la fabricación de un ácido poliinsaturado de cadena larga omega-3; donde el ácido poliinsaturado de cadena larga es EPA o donde el ácido graso de cadena larga es DHA.

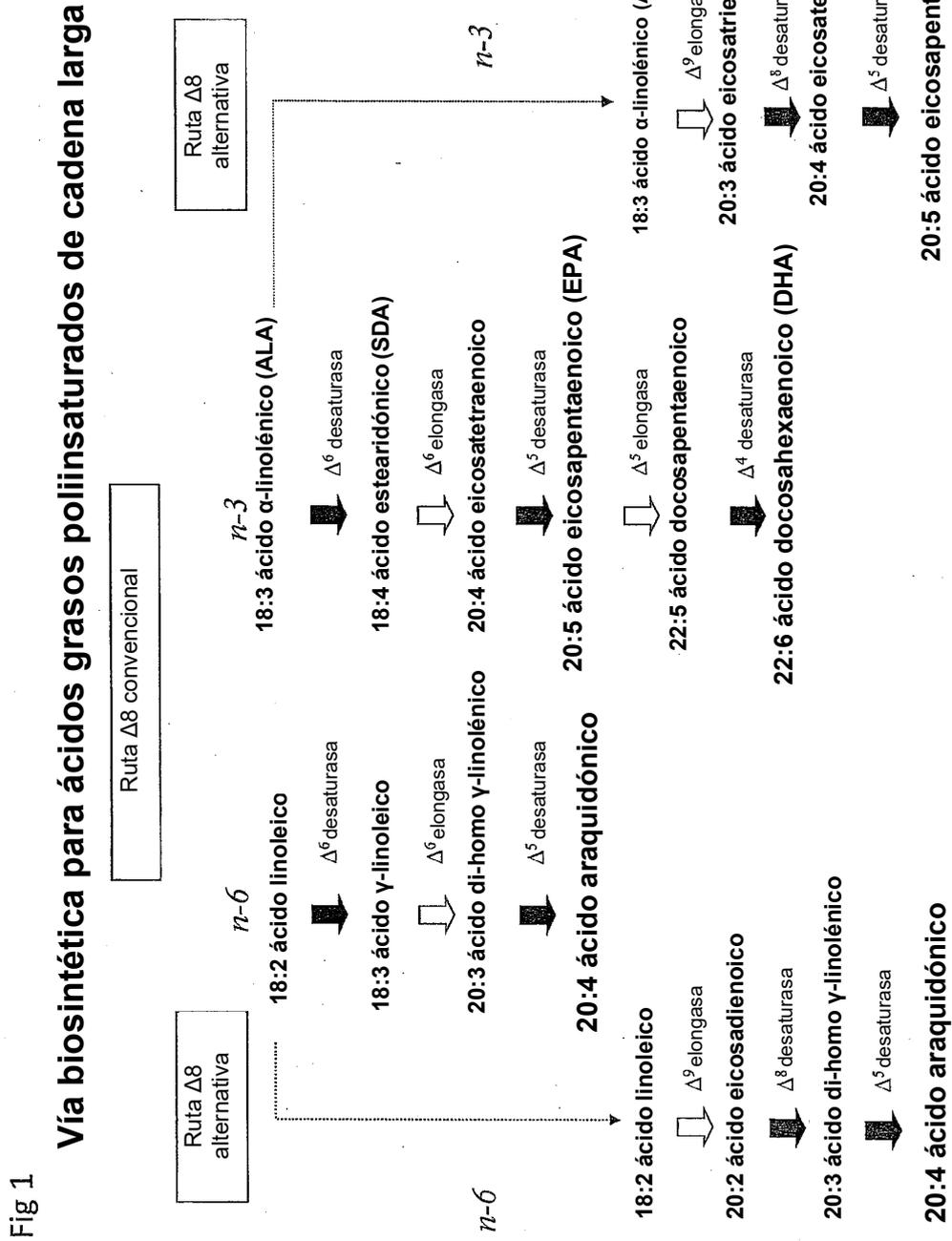
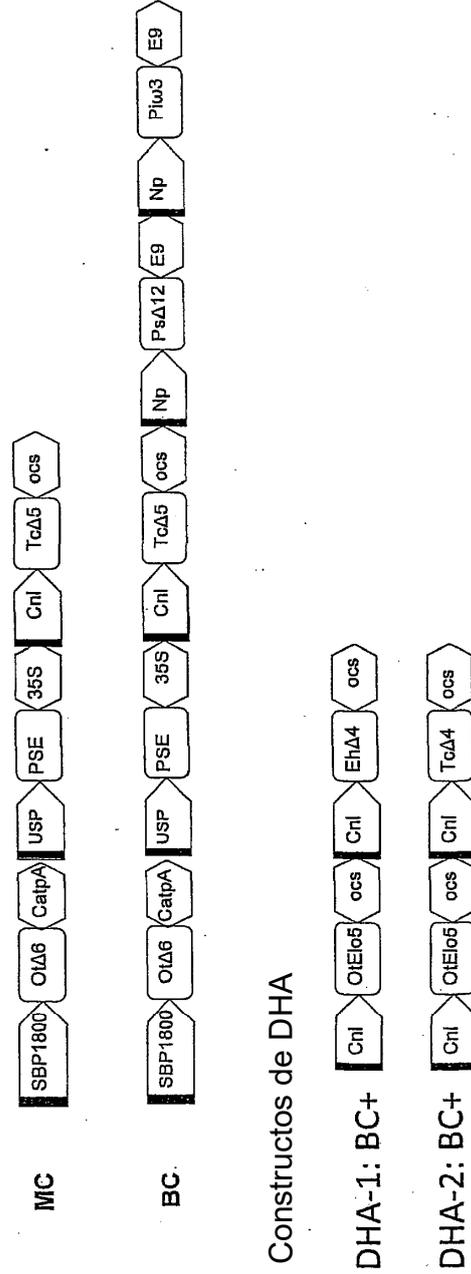


Fig2 Constructos de EPA



Mapas simplificados de los constructos del vector utilizados para la transformación de la Camelina

Cnl, promotor de colinin1 para el gen que codifica conlinina, la proteína de almacenamiento 2S de linaza; USP, región promotora de la proteína de semilla desconocida de *V.faba*; SBP1800; NP, napina; Otd6, una Δ6 desaturasa de *O. taurii*; Tcd5, una Δ5 desaturasa de *Thraustochytrium sp.*; Pi w3, una ω-desaturasa de *P. infestans*; PsΔ12, una Δ12 desaturasa de *P. sojae*; Ehd4, una Δ4-desaturasa de *Emilia huxleyi*; PSE1, una Δ6-elongasa de *P. patens*, Ote1o5, una Δ5-elongasa de *Ostreococcus tauri*; OCS, 35S, E9 y CatpA, representan terminadores.

Estudio de la perdida neutra de TAG de Camelina de origen natural y líneas de  
EPA 162 y 26

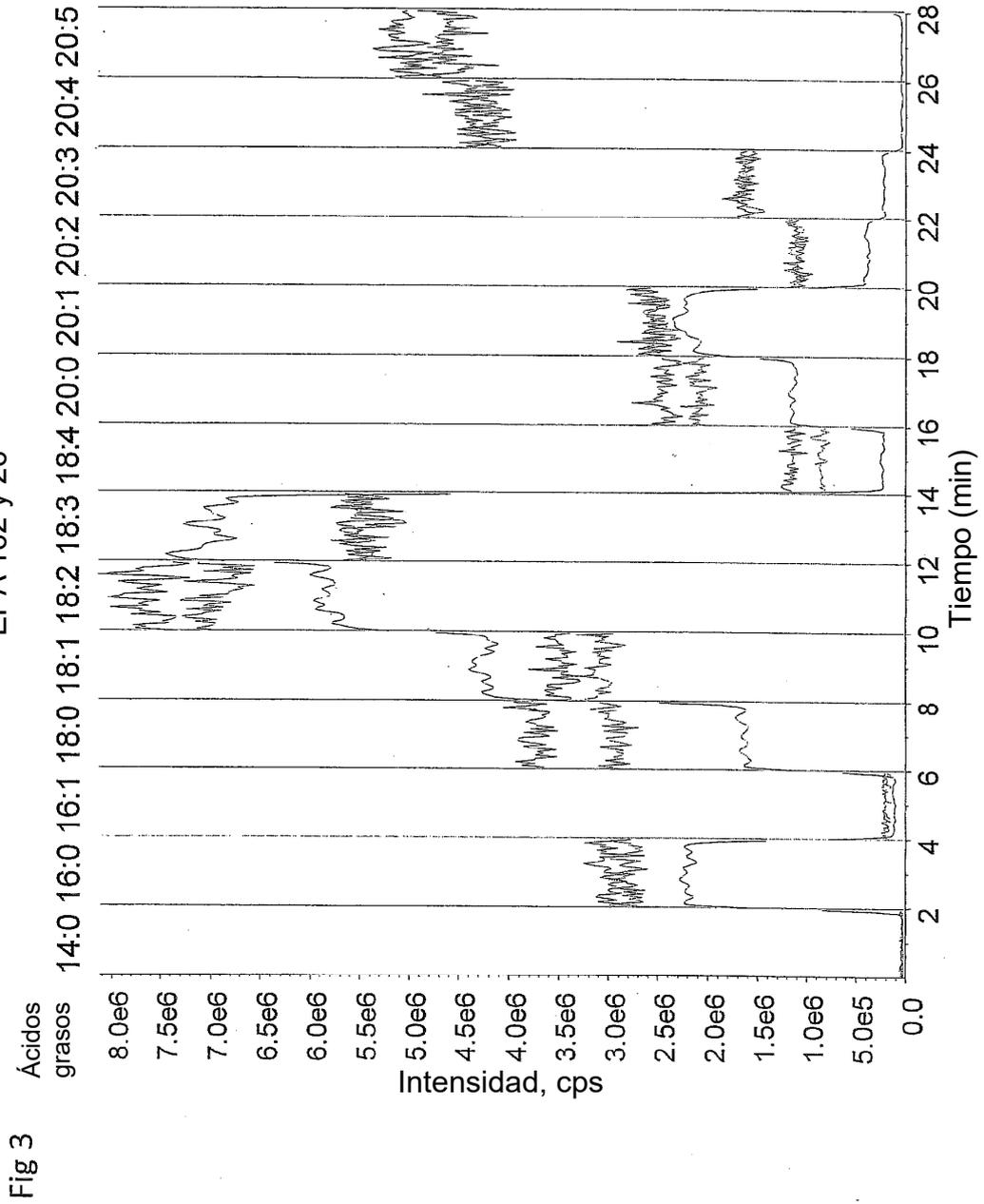
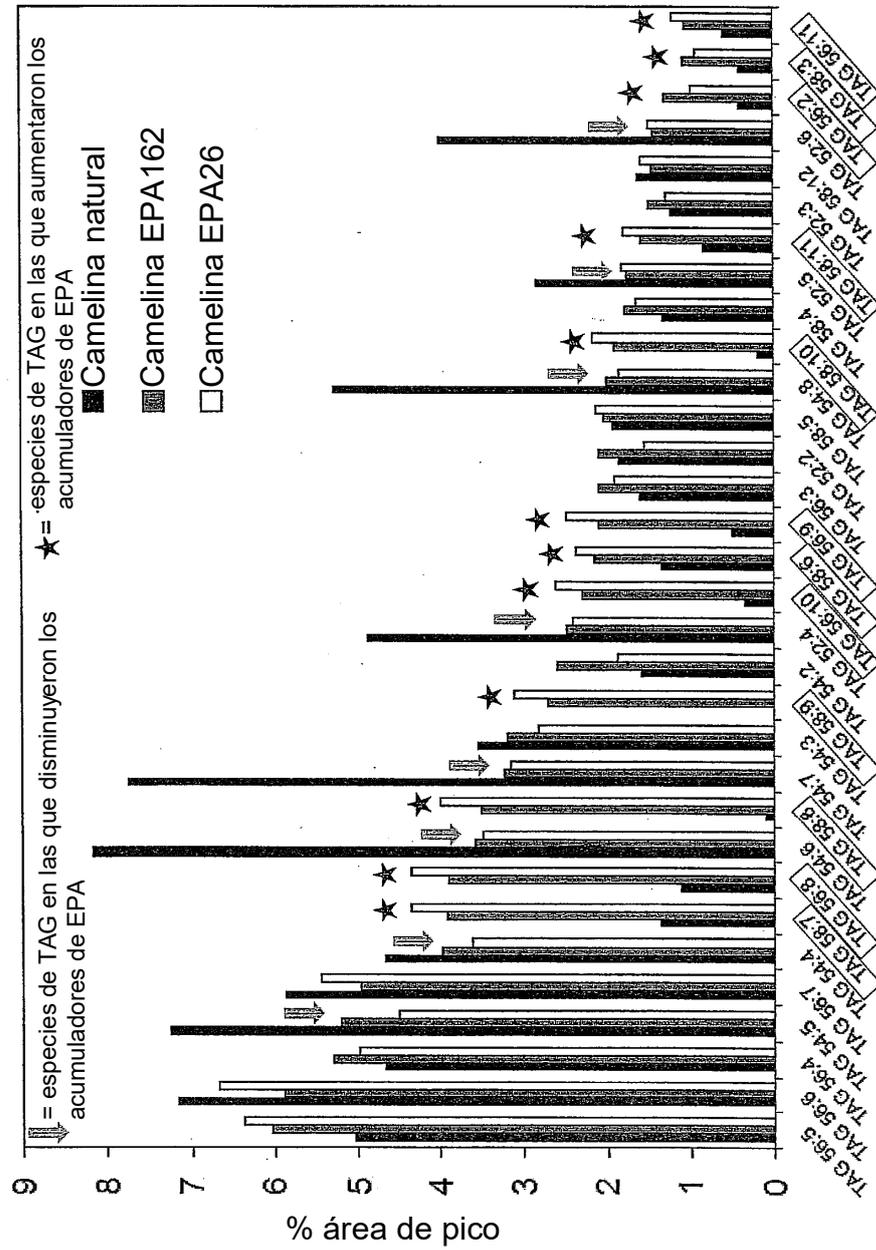


Fig 4  
Especies de triacilglicerol (>1%) identificadas por ESI-MS



Espectros de MS de muestra que exhiben un barrido de iones  
precursores positivos para 184 (PC)

Fig 5

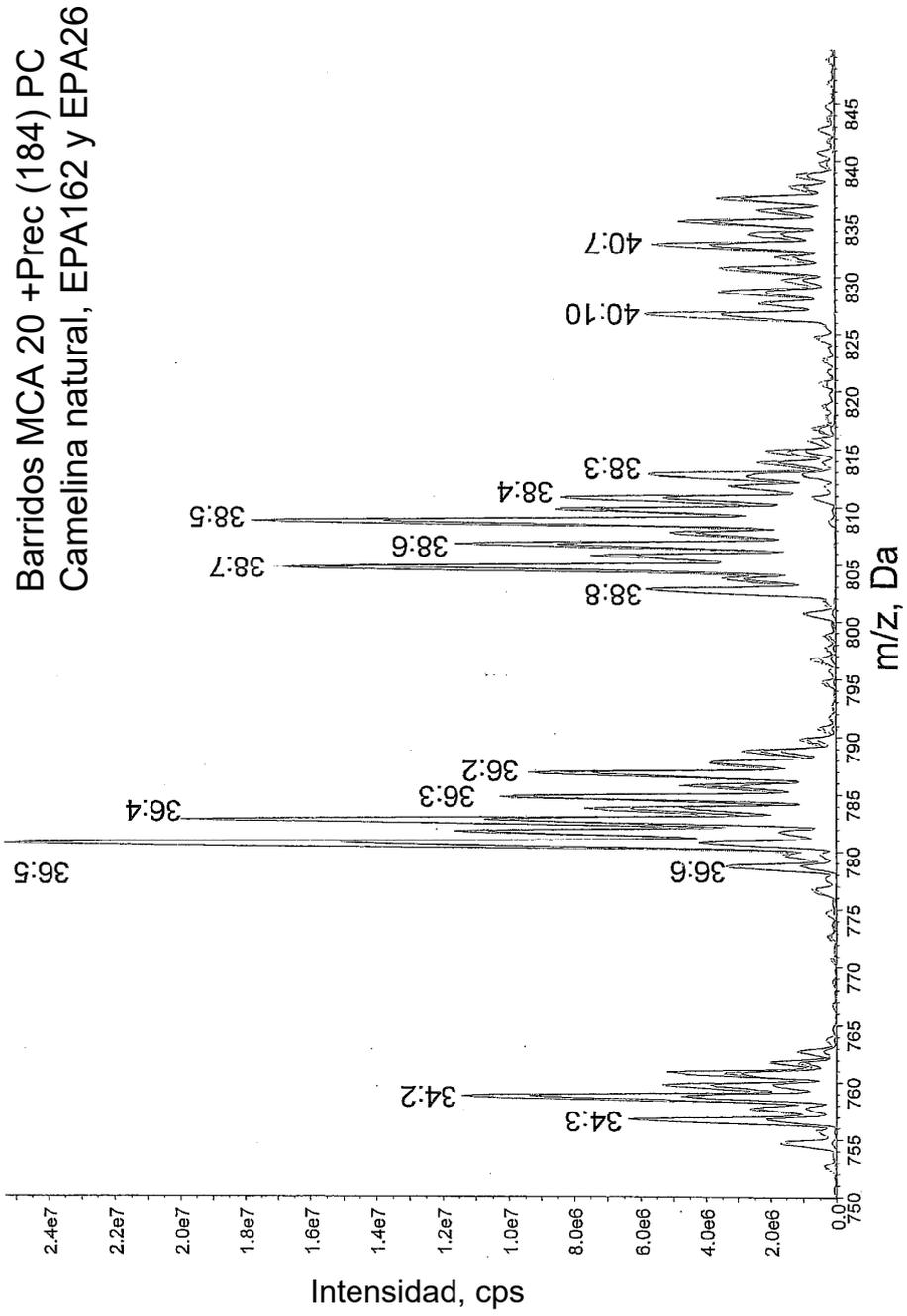
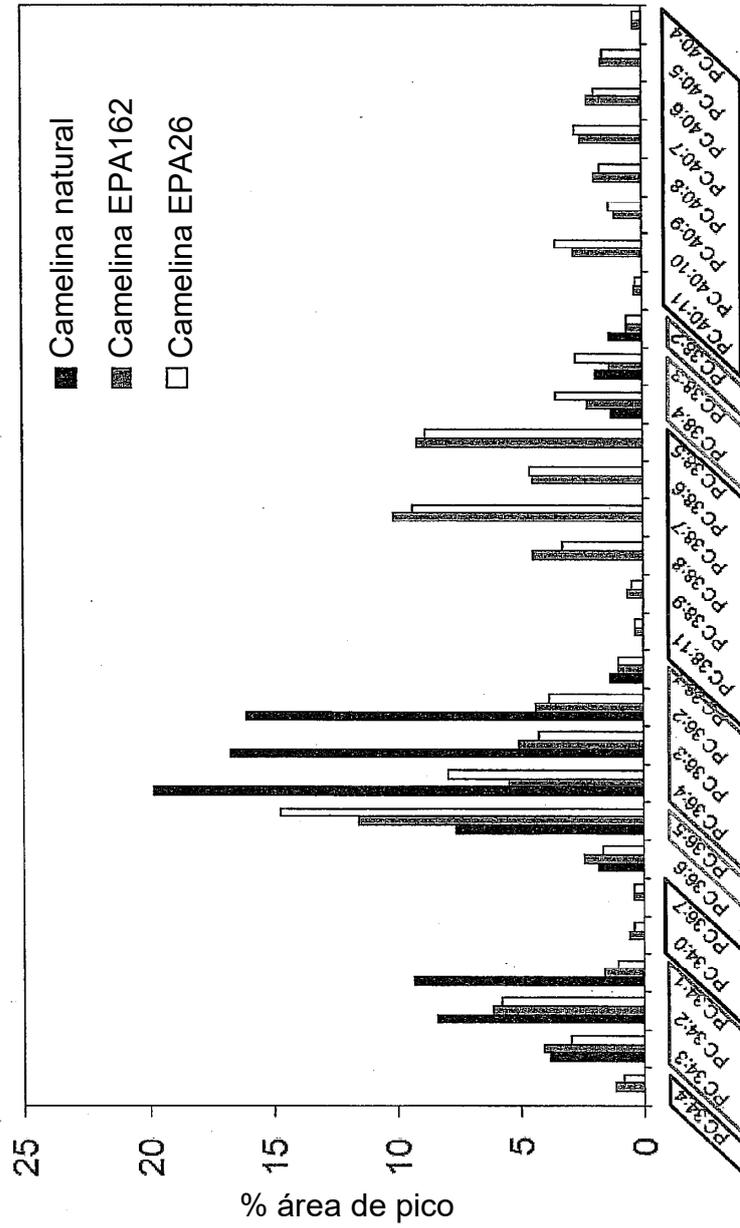
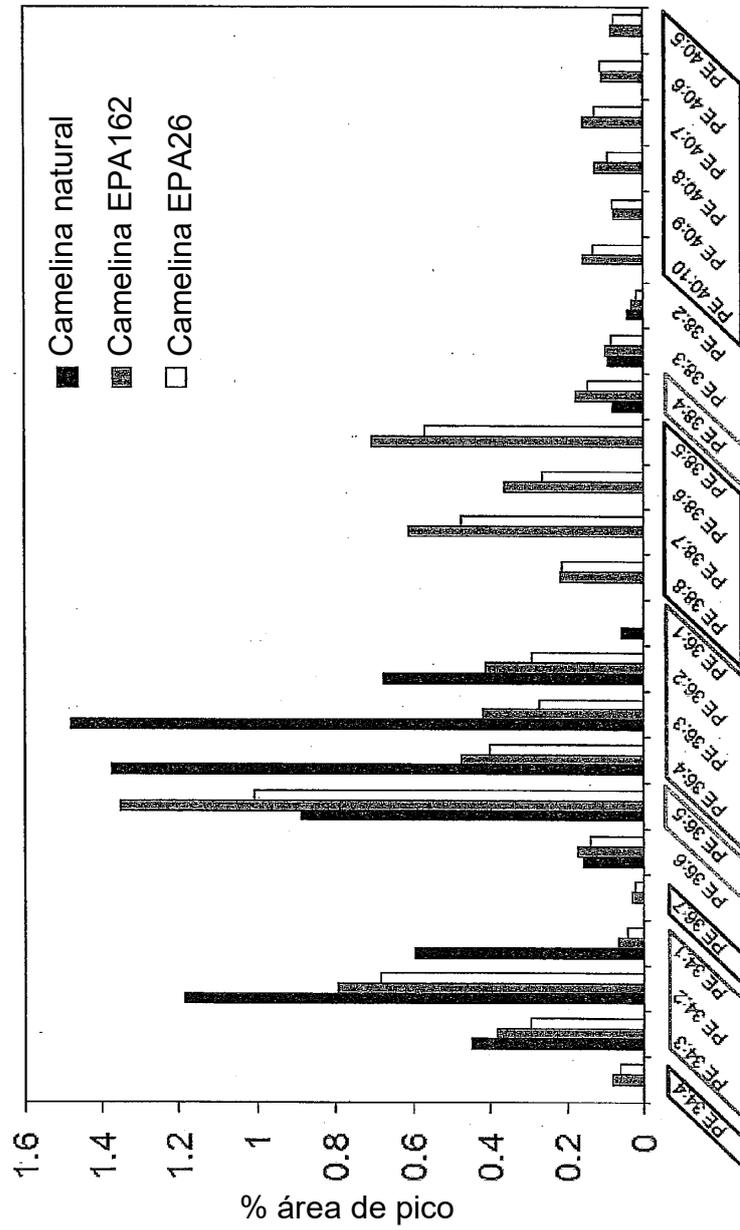


Fig 6 – Distribución de cadenas de acilo dentro de los fosfolípidos de Camelina de origen natural y que acumula EPA: fosfatidilcolina (PC)



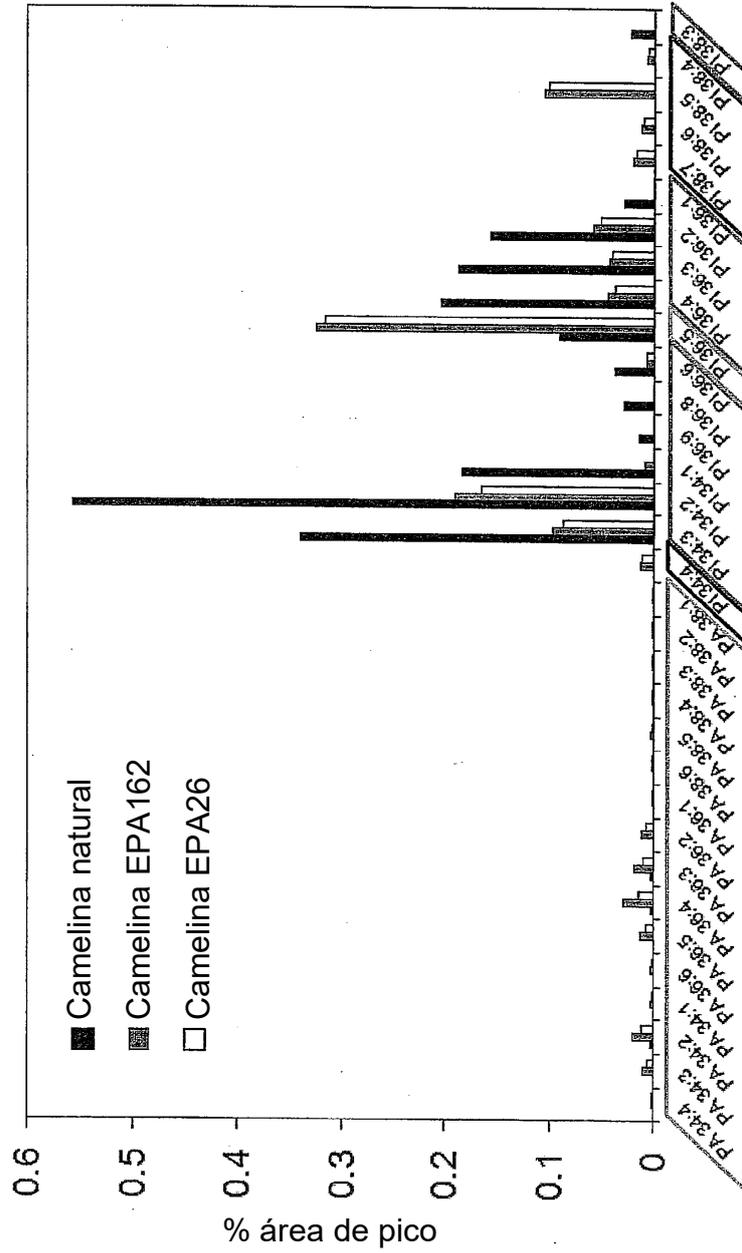
Las especies nuevas de PC presentes en líneas transgénicas se indican con recuadros rojos [clasificación basada en la longitud de cadena total para las posiciones sn-1 y sn-2, y el número de enlaces dobles].  
 Las especies de PC reducidas considerablemente en transgénicos están en un recuadro azul; recuadro naranja = aumento por encima de los niveles de lade origen natural

Fig 7 – Distribución de cadenas de acilo dentro de los fosfolípidos de Camelina de origen natural y que acumula EPA: fosfatidiletanolamina (PE)



Las especies nuevas de PE presentes en líneas transgénicas se indican con recuadros rojos [clasificación basada en la longitud de cadena total para las posiciones sn-1 y sn-2, y el número de enlaces dobles].  
 Las especies de PE reducidas considerablemente en transgénicos están en un recuadro azul; recuadro naranja = aumento por encima de la de origen natural

Fig 8 – Distribución de cadenas de acilo dentro de los fosfolípidos de Camelina de origen natural y que acumula EPA: ácido fosfatídico (PA) y fosfoinositol (PI)



Las especies nuevas de PA o PI presentes en líneas transgénicas se indican con recuadros rojos [clasificación basada en la longitud de cadena total para las posiciones sn-1 y sn-2, y el número de enlaces dobles].  
 Las especies de PA/PI reducidas considerablemente en transgénicos están en un recuadro azul; recuadro naranja = aumento por encima de la de origen natural



Fig 10 – Análisis de acil CoA (LC-MS MS QTRAP) de semillas de Camelina y Arabidopsis en un desarrollo medio

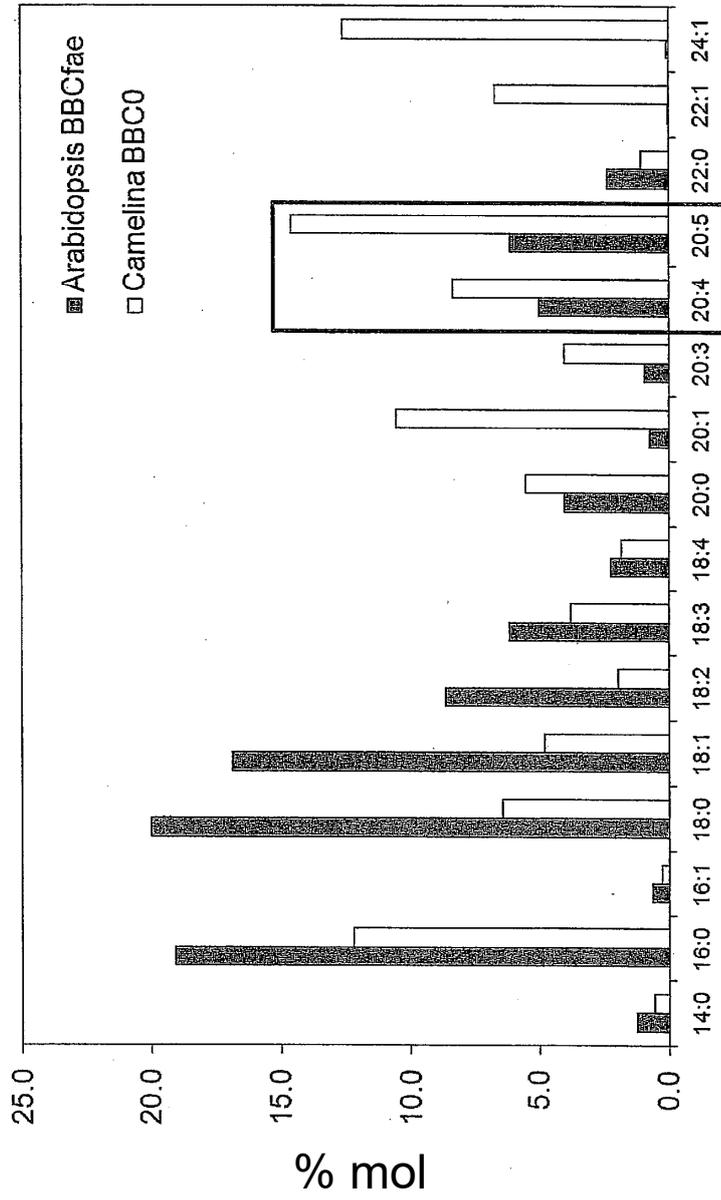


Fig 11: XIC de MRM de Acil CoA (26 pares) de semillas de *Camelina* que expresan el constructo MC (BBC0)

