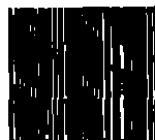


PETITORIO



01 100340 0

Superintendencia de Industria y Comercio
Folios: 65
Dirección: 01100340 00000000
Fecha (MD): 2001-11-22 15:24:59
Tipo: 002 PATENTES y 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Procedencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE.
2000-3

① SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: UNILEVER N.V., sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes de Holanda. Dirección: Weena 455, 3013 AL Rotterdam, Holanda. Teléfono: 3 264270 Fax: 2 126426 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com Domicilio: Rotterdam, Holanda	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número _____
--------------------	--	---

③ REPRESENTANTE APODERADO (74)	Nombre: JOSE ANTONIO LLOREDA Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, Colombia Teléfono: 3 264270 Fax: 2 126426 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 17.159.681 TP 10.784
--------------------------------	--	---

④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre: Mark Harker, Susan Amanda Hellyer, Niklas Holmberg y Dick Safford. Dirección: Todos residentes en Colworth House, Sharphook, Bedford MK44 1LQ, Gran Bretaña. Teléfono: 3 264270 Fax: 2 126426 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com Domicilio: Gran Bretaña.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número _____
---------------------	--	---

⑤ TITULO (54) "PROCESO PARA MODIFICAR PLANTAS"

⑥ Clasificación Internacional (51) C12N 18/82

⑦ Prioridad SI ☒ NO ☐ D. 486	(33) País de Origen EPO	(32) Fecha 24-11-00	(31) Número de Solicitud 00310403.1
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____

⑧ Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐

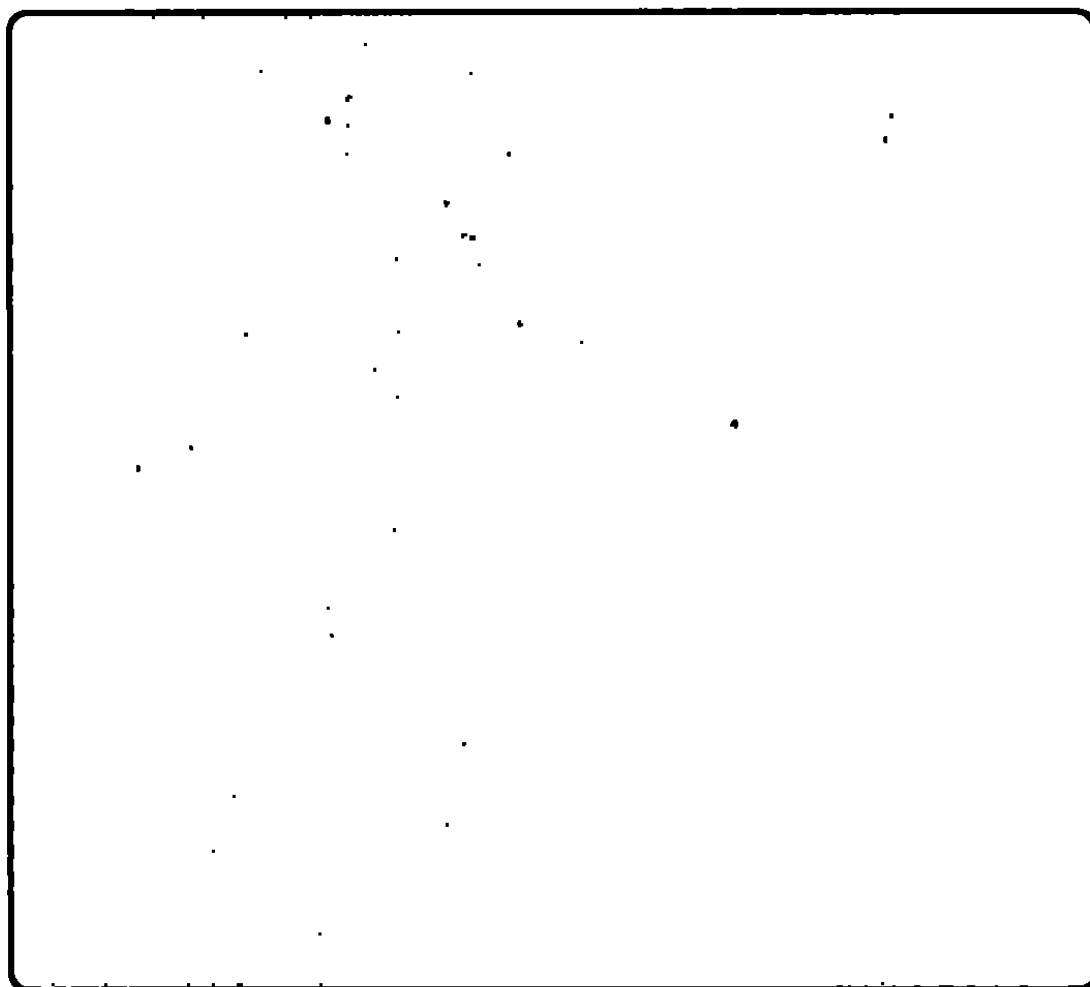
⑨ Comprobante de pago N°. 01-70,282 y 01-70,283 Fecha 08-11-01

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Representación legal si fuere el caso 12.817
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Descripción de la invención.
- ☒ Una o más reivindicaciones.
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: JOSÉ ANTONIO LLOREDA

FIRMA:

G.C. 17.159.661

T.P. 10.784



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

Radicacion : 01100340 00000000
Fecha (AMD): 2001-11-22 15:24:59
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 70,282
FECHA : NOVIEMBRE 8 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	5373893	08/11/2001	3,676,720.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50003-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
		TOTAL :	\$ 356,640.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 01100340 00000000 Folios: 65
Fecha (AMD): 2001-11-22 15:24:59
Tramite : 002 PATENTES/ 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 70,283
FECHA : NOVIEMBRE 8 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORED Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	5373893	08/11/2001	3,676,720.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE NO. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

ANEXO

Atentamente manifiesto a usted que la fuente normativa de la reciprocidad de la cual se deriva el derecho del solicitante para reivindicar prioridad en el presente caso, se encuentra:

- a) **En el Artículo 2 del Tratado de Amistad y Comercio suscrito el 14 de Marzo de 1908 entre Suiza y Colombia, que establece la "Cláusula de la Nación más favorecida".**

Suiza, que constituye uno de los países signatarios de la Convención Europea de Patentes vigente desde el 7 de octubre de 1977, convención en virtud de la cual se expiden las Patentes Europeas, es uno de los países respecto de los cuales se ha solicitado la correspondiente patente (Solicitud No. 00310403.1), tal como se desprende del texto de la solicitud en relación con la cual reclamo prioridad.

- b) **En el Artículo 2 del Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la "Organización Mundial de Comercio (OMC)" suscrito en Marruecos el 15 de abril de 1994. Este acuerdo fue aprobado por el Congreso de Colombia mediante Ley 170 de 1994 y por la Corte Constitucional Colombiana mediante Sentencia C-137-95 de 28 de marzo de 1995, y entró en vigencia en nuestro país el 30 de abril de 1995, 30 días después de su ratificación.**

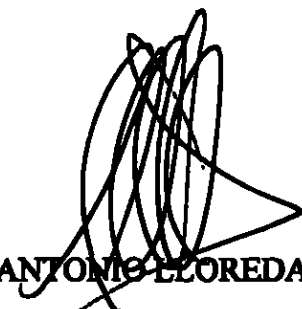
Dicho Artículo establece que en lo que respecta a las partes II, III y IV del Acuerdo (referidos a la existencia, alcance y ejercicio de los derechos de propiedad intelectual, entre otros) los Miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París —el Artículo que establece la prioridad de las patentes de invención es el Artículo 4.

- c) **En el Artículo 4 del mencionado Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el que se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC), el cual consagra el "Trato de la nación más favorecida" para los países Miembros del mismo.**

- d) **En el Artículo 4 del Convenio de París, del cual ya era parte Colombia en el momento en que se presentó la solicitud cuya prioridad ahora reivindico, con lo cual se cumple la reciprocidad exigida en el Artículo 9 de la Decisión 486 del Acuerdo de Cartagena para con solicitudes provenientes del País Miembro del Acuerdo de Cartagena.**

ANEXO

El documento que acredita la calidad REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALFONSO LLORED CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLORED** para **TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 12.817. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLORED

T.P. No. 10.784

Código 231

PROCESO PARA MODIFICAR PLANTAS

Resumen: Objeto y Finalidad de la Invención

El uso de un gen que expresa una reductasa HMG inhibida sin retroalimentación en combinación con un gen que expresa esteroil metiltransferasa1 para aumentar el nivel de esteroides en las plantas.

PROCESO PARA MODIFICAR PLANTAS

Campo de la Invención

La invención se relaciona con un proceso por la modificación de plantas, más específicamente un proceso para aumentar los niveles de isoprenoides en plantas.

Antecedentes de la Invención

Muchas aproximaciones han sido sugeridas para modificar la producción de isoprenoides en plantas.

Aunque solo unos pocos esteroides existen en animales, siendo el colesterol significativamente el más importante, en las plantas se encuentra un amplio rango de esteroides. Existen variaciones estructurales entre estos a partir de diferentes sustituciones en la cadena lateral y en el número y la posición de enlaces dobles en el esqueleto tetracíclico.

Los esteroides de plantas pueden ser agrupados según la presencia o ausencia de una o más funcionalidades. Por ejemplo estos pueden dividirse en tres grupos con base en los niveles de metilación en C4, como sigue a continuación: 4-desmetilesteroides o esteroides de producto final, 4 α - monometilesteroides y 4,4-di-metilesteroides. Los 4-desmetilesteroides que se presentan naturalmente incluyen sitoesterol, estigmaesterol, brasicaesterol, Δ 7-avenoesterol y campesterol.

En la mayoría de las plantas superiores, los esteroides con un grupo libre 3 β -hidroxil (esteroides libres) son los productos finales principales. Sin embargo, los esteroides también ocurren como conjugados, por ejemplo, donde el grupo 3- hidroxil está esterificado por una cadena de ácidos grasos, ácidos fenólicos o partes de azúcar para producir ésteres esteroides. Para propósitos de esta descripción el término esteroide se refiere tanto a esteroides libres como a esteroides conjugados. Sin embargo, las referencias de esta especificación a niveles, cantidades o porcentajes de esteroide se refieren al peso total de los grupos esteroide en donde se excluye el peso de los grupos conjugados tales como grupos de ácidos grasos, ácido fenólico o azúcar.

Hasta la fecha la mayoría de los estudios que intentan manipular los esteroides en plantas han involucrado otros esteroides distintos a 4-desmetilesteroides con el propósito de aumentar la resistencia a las plagas o a los fungicidas.

La WO 98/45457 describe la modulación de composiciones de fitoesteroide para lograr resistencia a insectos, nemátodos, hongos y/o estrés ambiental, y/o para mejorar el valor nutricional de las plantas usando una molécula DNA de doble hélice que comprende un promotor, una secuencia DNA que codifica una primer enzima que enlaza un primer esteroide y produce un segundo esteroide y una región 3' no-trasladada que causa poliadenilación en el terminal 3'del RNA. Preferiblemente la enzima se selecciona entre el grupo que consiste de S-adenosil-L-metionina- $\Delta^{24(25)}$ -esteroide metil transferasa, una C-4 demetilasa, un cicloeucaleol a obtusifoliol-isomerasa, una 14- α -demetilasa, un Δ^6 a Δ^7 - isomerasa, una Δ^7 -C-5-desaturasa y una 24,25-reductasa.

A

La US 5,306,862 describe un método para aumentar la acumulación de esterol en una planta al aumentar el número de copia de un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad HMG-CoA reductasa para aumentar la resistencia de las plantas a las plagas.

Igualmente la US 5,349,126 revela un proceso para aumentar la acumulación de esqualeno y esterol en plantas transgénicas al aumentar la cantidad de un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad HMG-CoA reductasa para aumentar la resistencia a las plagas de plantas transgénicas.

La WO 97/48793 revela un polipéptido C-14 esterol reductasa para la manipulación genética de una ruta biosintética del esterol en plantas.

La WO 96/09393 revela una secuencia DNA que codifica esqualeno sintetasa.

La WO 97/34003 revela un proceso para elevar los niveles de esqualeno en plantas por introducción en el genoma de una planta de un DNA para suprimir la expresión de esqualeno epoxidasa.

La WO 93/16187 revela nuevas plantas que contienen en su genoma uno o más genes involucrados en las etapas tempranas de la biosíntesis del fitoesterol, preferiblemente los genes que codifican mevalonato quinasa.

La US 5,589,619 revela acumulación de esqualeno en plantas por introducción de un gen HMG-CoA reductasa para aumentar la producción de esterol y la resistencia a las plagas. El Ejemplo 10 revela niveles aumentados de esqualeno en las semillas de estas plantas.

La WO 00/08190 revela una secuencia DNA que codifica una esterol metiltransferasa aislada de *Zea mays*.

En las plantas, la síntesis de mevalonato por medio de la 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMGR) es uno de los pasos en biosíntesis de isoprenoides.

Gondet et al en Plant Physiology (1994) 105:509-518 ha aislado un mutante de tabaco que muestra composiciones de esterol considerablemente alteradas en tejido de hojas con incrementos significativos en la proporción de ciclopropilesteroles y actividades HMGR incrementadas aproximadamente 3 veces.

Re et al en The Plant Journal (1995) 7(5) , 771-784 ha mostrado que la sobre-expresión de *Arabidopsis thaliana* HMG CoA reductasa (HMG 1) no es suficiente para alterar la síntesis gruesa y la acumulación de productos finales de la ruta isoprenoide la planta.

Los solicitantes creen que la razón para esto es que la actividad de HMGR en plantas está sujeta a inhibición de retroalimentación por esteroides. Algunos genes HMGR, sin embargo, son inhibidos sin retroalimentación. Ejemplos de tales genes son los genes HMGR no vegetales que carecen del dominio enlazante de membrana, tal como los genes HMGR truncados de hamster o los genes truncados de *Saccharomyces cerevisiae*, y los genes HMGR (o versiones truncadas



de los mismos) de plantas que producen elevados niveles de isoprenoides tal como la *Hevea brasiliensis*.

Un gen HMGR truncado de hamster, que carecía del dominio enlazante de membrana, fue expresado en plantas de tabaco bajo el control del promotor CaMV 35S (Chappell et al., Plant Physiology (1995) 109: 1337-1343). Esto resultó en un incremento de 3 a 6 veces en la actividad HMGR total en tejido de hojas.

Schaller et al en Plant Physiology (1995) 109:761-770 revela la introducción del gen *hmg1* de *Hevea brasiliensis* en tabaco conduciendo a una producción de esterol mejorada, especialmente de cicloartenol, en tejido de hojas.

Polakowski et al en Applied Microbial Biotechnology (1998) 59:66-71 describe el uso de un gen *Saccharomyces cerevisiae hmg 1* en levadura, conduciendo a la acumulación de esqualeno.

En las plantas, la producción de 24-metileno cicloartenol a partir de cicloartenol por medio esterol metiltransferasa1 (SMT1) es uno de los pasos en biosíntesis de isoprenoides.

Bouvier-Nav et al en Eur. J. Biochem. 256, 88-96 (1988) describe dos familias de esterol metil transferasas (SMTs), la primera (SMT1) que aplica a cicloartenol y la segunda (SMT2) a 24-metileno lofenol.

Schaller et al en Plant Physiology (1998) 118: 461-469 describe la sobre-expresión de SMT2 a partir de Arabidopsis en tabaco resultando en un cambio en la razón de 24-metil colesterol a sitoesterol en la hoja de tabaco.

7

Diener et al en *The Plant Cell* (2000) 12: 853-870 describe la caracterización funcional de un gen *Arabidopsis* SMT1 y muestra que los mutantes que carecen del gen presentan pobre crecimiento y fertilidad.

Schaeffer et al en *Lipids* (2000) 35: 263-269 describe los efectos de expresar genes *Nicotiana tabacum* SMT1 y SMT2 en tabaco transgénico. La sobre-expresión de SMT1 resulta en variaciones en el nivel de cicloartenol y en cambios concomitantes en la proporción de 24-étíl esteroides. La sobre-expresión de SMT 2 altera la razón de 24-metil colesterol a sitoesterol produciendo un crecimiento reducido.

Sorpresivamente ahora se ha encontrado que la expresión de genes que codifiquen enzimas específicas HMG-reductasa en combinación con aquellos que codifican esteroil metiltransferasa1 pueden ser usados ventajosamente para aumentar más el valor nutricional de las plantas especialmente en las semillas de las mismas.

Sorpresivamente se ha encontrado que el uso de HMGR regulada sin retroalimentación en combinación con sobre-expresión de esteroil metiltransferasa1 conduce un mejoramiento adicional del esteroil nutricionalmente benéfico por ejemplo en las semillas de dichas plantas comparado con plantas donde solamente uno de los genes de arriba ha sido expresado.

La presente invención pretende modificar los niveles de esteroides en plantas, especialmente las semillas de plantas en donde esta modificación pueda involucrar un incremento del nivel (benéfico) de esteroides o una disminución del nivel (menos deseado) de colesterol.

8/

La presente invención pretende aumentar los niveles de esteroides en plantas, en donde los esteroides son preferiblemente los 4-desmetilesteroides nutricionalmente atractivos tales como sitosteroides, estigmasteroides, brassicaesterol, $\Delta 7$ -avenoesterol o campesteroides y en donde los esteroides se expresan en las semillas.

Alcance de la invención

En consecuencia, la invención se relaciona con el uso de un gen que expresa un SMT1 en combinación con un gen HMGR inhibida sin retroalimentación para aumentar el nivel de esteroides en tejido de plantas y/o disminuir el nivel de colesterol en tejido de plantas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una planta modificada que tiene incorporado en su genoma uno o más genes al aumentar la expresión de SMT1 y para aumentar la expresión de HMGR inhibida sin retroalimentación.



Descripción Detallada de la Invención

En las plantas superiores, los isoprenoides son una gran familia de compuestos con diversos papeles. Estos incluyen los esteroides, las hormonas giberelinas de planta y ácido abscísico, los componentes de los pigmentos fotosintéticos, las fitoalexinas y una variedad de otros terpenoides especializados.

Los esteroides, especialmente 4-desmetilesteroides son de interés debido a que estos contribuyen a la calidad nutricional, al sabor y al color de frutas y aceites vegetales. De particular interés son los compuestos isoprenoides de beneficio nutricional tal como los esteroides solubles en grasa. Estos pueden ser eficaces para reducir la enfermedad coronaria del corazón, por ejemplo, se ha demostrado que algunos fitoesteroides disminuyen los niveles de sero-colesterol cuando se incrementan en la dieta y la vitamina E reduce las placas ateroscleróticas al disminuir la oxidación de LDL.

La expresión de tales compuestos en semillas de plantas en particular en semillas oleaginosas es comercialmente ventajosa como generalmente es muy conveniente la recolección de tales ingredientes de las semillas y, en algunas instancias, puede ser posible extraer el aceite en combinación con los esteroides de la semilla, conduciendo a un aceite que contiene elevados niveles de esteroles sin o con la necesidad reducida de la adición separada de esteroides.

Los esteroides preferidos son 4-desmetilesteroides, más preferidos sitoesterol, estigmaesterol, brasicasterol, avenoesterol y campesterol. También preferiblemente, por lo menos parte de los esteroides, por ejemplo por lo menos 70 % en peso basado en el total de esteroides en la semilla son ésteres de esteroides con ácidos grasos C10-24. En una

10

realización muy preferida los esteroides comprenden ésteres C10-24 de 4-desmetilesteroides.

Como se discute arriba, varias propuestas han sido sugeridas para alterar los niveles de isoprenoides en plantas.

Ahora se ha encontrado que para el mejoramiento de los niveles de isoprenoides en plantas particularmente en las semillas de las mismas, una ruta aún más preferida es usar un gen HMGR inhibido sin retroalimentación en combinación con esteroil metiltransferasa¹. El uso de tal combinación de genes es especialmente ventajosa para mejorar los niveles de 4- desmetilesteroides, más que la expresión de cualquier gen singularmente. Aún más preferido, el uso de tales genes mejora el nivel de estigmasterol, sitoesterol y campesterol en semillas. También el uso de tales genes es especialmente ventajoso para mejorar los niveles de isoprenoides en semillas oleaginosas que contienen más del 10 % en peso basado en peso seco de triglicéridos.

En una primera realización de la invención la reductasa HMG inhibida sin retroalimentación es una enzima que está expresada por un gen HMGR truncado no-vegetal, dicha truncación conduce preferiblemente a una enzima que carece del dominio enlazante de membrana, pero en donde se mantiene preferiblemente la funcionalidad HMGR del gen. Ejemplos de tales genes son los genes HMGR truncados de hamster o de levadura.

Una segunda realización preferida de una reductasa HMG inhibida sin retroalimentación es una enzima expresada por genes HMGR de plantas que producen elevados niveles de isoprenoides tal como *Hevea brasiliensis*. Especialmente preferidas están las versiones truncadas de HMGR producidas por genes de plantas que producen elevados niveles de isoprenoides tal como *Hevea brasiliensis*, versiones

H

truncadas más preferidas son usadas en donde dicha HMGR carece del dominio enlazante de membrana.

La enzima HMGR intacta comprende tres regiones: una región catalítica, que contiene el sitio activo de la enzima, una región enlazante de membrana, que ancla la enzima al retículo endoplásmico y una región de enlace que une la región catalítica y la región enlazante de membrana de la enzima. El dominio enlazante de membrana ocupa la región N-terminal de la enzima, mientras que la región catalítica ocupa la región C- terminal. Se cree que la inhibición con retroalimentación en la mayoría de las plantas generalmente requiere de la presencia de la región enlazante de membrana de la enzima. Por lo tanto, una realización preferida de la invención se relaciona con el uso de un gen HMGR que expresa una enzima con un dominio inactivado o sin enlazante de membrana, en donde dicho gen es preferiblemente usado para aumentar el nivel de 4-desmetilesteroles en tejido de plantas tal como las semillas de plantas.

Un ejemplo de HMG reductasa con un dominio enlazante de membrana inactivado o sin él es la HMG reductasa expresada por el gen HMGR truncado de hamster como se describe por Chappell (ver arriba). La truncación se cree que remueve el dominio enlazante de membrana de la HMG reductasa donde después ocurre una reducción significativa de inhibición por retroalimentación. Otros genes truncados o mutados en donde el dominio enlazante de membrana es removido o inactivado pueden ser usados igualmente. Un ejemplo de esto es el gen truncado HMGR como se usó por Polakowski (ver arriba) .

Ejemplos preferidos de HMG reductasas son aquellos expresados por genes HMGR obtenidos de plantas que tienen naturalmente la tendencia a desarrollar niveles altos de isoprenoides tal como por ejemplo los triterpenos y el caucho. Ejemplos de tales plantas son

Asteraceae, especialmente *Euphorbiaceae*. Por lo tanto otra realización preferida de la invención se relaciona con el uso de un gen HMGR se aisló de *Asteraceae* para aumentar el nivel de esteroides, particularmente 4-desmetilesteroides en el tejido de plantas, particularmente las semillas de plantas. Preferiblemente el gen HMGR se aisló de *Hevea brasiliensis*. Especialmente versiones truncadas preferidas de tales genes de planta pueden ser usadas. Un promotor específico puede ser insertado en el genoma de la planta para asegurar que el gen HMGR sea regulado ascendentemente, preferiblemente dentro del tejido de semilla de la planta.

Idealmente el gen SMT1 puede estar presente naturalmente en la planta. De acuerdo con la invención las circunstancias se alteran luego de modo que tenga lugar la expresión aumentada de SMT1, preferiblemente en la región de semilla de la planta. Posible maneras de hacer esto pueden ser regular ascendentemente facilitando moléculas p.e. tales como factores de transcripción. Alternativamente, un promotor específico puede ser insertado en el genoma de la planta para asegurar que el gen SMT1 sea regulado ascendentemente. Alternativamente, el número de copia del gen "homólogo" SMT1 puede incrementarse para aumentar la expresión del mismo.

Alternativamente, el gen SMT1 puede ser un gen heterólogo, por ejemplo derivado de otras plantas o fuentes microbianas. Por ejemplo, el gen SMT1 puede ser derivado de *Arabidopsis*, tabaco o levadura.

El colesterol es un componente menos deseado en los productos alimenticios debido a que los consumidores tienen el deseo de reducir su consumo de colesterol. Se cree que niveles reducidos de sero colesterol conducen a un riesgo reducido de enfermedad

13

cardiovascular. Por lo tanto, en una realización la invención se relaciona con la reducción del nivel de colesterol en el tejido de plantas, especialmente las semillas de plantas.

Como se discute arriba, varias propuestas han sido sugeridas para alterar los niveles de isoprenoides y/o de colesterol en plantas. Ahora se ha encontrado que para el mejoramiento de los niveles de isoprenoides en semillas una ruta preferida es usar un gen SMT1. El uso de tales genes es especialmente ventajoso para mejorar los niveles de 4-desmetilesteroles, aún más preferido el nivel de estigmaesterol, sitoesterol, brasicaesterol, isofucoesterol y campesterol en semillas. También, el uso de tales genes es especialmente ventajoso para mejorar los niveles de isoprenoides en semillas oleaginosas que contienen más del 10 % en peso basado en peso seco de los triacilglicerol.

La invención también proporciona un método de transformación de una planta por medio de:

A1) transformación de una célula de una planta con un constructo de DNA recombinante que comprende un segmento de DNA que codifica un polipéptido con actividad HMGR inhibida sin retroalimentación y un polipéptido que codifica una actividad esterol metiltransferasa1 y promotores para dirigir la expresión de dichos polipéptidos en dicha célula de la planta para formar una célula transformada de planta; o

A2) re-transformación de una célula de planta que expresa una actividad HMGR inhibida sin retroalimentación con un gen que codifica una actividad esterol metiltransferasa1; o

14

A3) re-transformación de una célula de planta que expresa una actividad esteroil metiltransferasa1 con un gen que codifica una actividad HMGR inhibida sin retroalimentación; y

B) regeneración de las células transformadas de planta de arriba en plantas transgénicas; y

C) selección de plantas transgénicas que tienen niveles mejorados de 4-desmetilesteroles comparados con cepas de tipo silvestre de la misma planta.

Los segmentos de DNA que codifican HMGR inhibida sin retroalimentación o esteroil metiltransferasa1, para uso de acuerdo con la presente invención, pueden ser obtenidos idealmente de animales, fuentes microbianas o plantas. Alternativamente, genes equivalentes podrían ser aislados de bancos de genes, por ejemplo por técnicas de hibridización con sondas de DNA.

La invención será ilustrada aún más en los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: Co-expresión de *Hevea brasiliensis hmg1* y *Nicotiana tabacum* SMT1 en plantas

Cepa de *E. coli* DH5 (Gibco BRL) se usó como la cepa huésped en todos los procedimientos de clonación y sub-clonación. El vector binario pSJ34 (PCT/EP/00/09374) se creó por relleno en el sitio *Bam*HI del pGPTV-Kan [Becker et al Planta Mol Biol (1992) 20:1195-97], entre el marcador seleccionable y el terminal p(A) g7 3', con enzima Klenow. La construcción de los plásmidos pNH6 y pNH8 ha sido descrita en nuestras solicitudes de patente no publicadas PCT/EP00/09374 y EP 00303193.7 respectivamente. Se cultivaron bacterias en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 5 g/l) agregado con la adecuada presión de selección (ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 50 µg/ml) sobre un agitador rotatorio (210 rpm) a 37 °C.

Las endonucleasas de restricción, ligasa DNA T4, fosfatasa alcalina de camarón y marcadores moleculares (X, XIV y XVII) se adquirieron en Roche. Las enzimas se usaron de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores. Todos los químicos y reactivos que se usaron fueron de grado analítico y disponibles en Fisher Scientific UK, Sigma o BDH. Los siguientes primers oligonucleótidos se usaron: F72, 5'-GCC ATA ATA CTC GAA CTC AG-3'; 35S, 5'-TCC ACT GAC GTA AGG GAT GAC-3'; CERV1S, 5'-GTC TGT CTA AAG TAA AGT AGA TGC G-3'; NOSAS, 5'-CCG GCA ACA GGA TTC AAT CTT-3'.

El mini kit de preparación Qiagen se usó para obtener DNA plásmido para procedimientos de secuenciación y sub-clonación. El kit de extracción en gel Qiagen se usó para purificar DNA a partir de geles de agarosa. El plásmido pNH6 se digirió con *Xma*I y *Eco*RI y el plásmido pNH8 con *Xma*I y *Sal*I liberando el CERV-*Ntsmt1*-NOS y los cassettes dobles CaMV35S-*Hevea hmg1*-TRBCS, respectivamente. Las reacciones de digestión se separaron en un gel de agarosa y los

18

cassettes de expresión se excisaron y se purificaron. El vector binario pSJ34 se digirió con *EcoRI* y *SaI*, se purificó y se trató subsecuentemente con fosfato alcalino de camarón para remsober los grupos fosfato terminales. Usando una ligación de tres vías, ambos cassettes de expresión se insertaron en pSJ34 lo que resultó en pNH9 (Figura 1). Primero PCR, usando primers gen específicos, y segundo se usó la digestión de la enzima de restricción para seleccionar clones positivos. Los clones positivos se secuenciaron confirmando la integridad de las uniones entre transgen y terminador.

Transformación de tabaco con vectores binarios

Células electrocompetentes de *Agrobacterio tumefaciens* (cepa LBA4404) se descongelaron sobre hielo y se agregó 5ng de vector plásmido. Las células más el plásmido se colocaron luego en una cubeta de electroporación pre-enfriada y electroporada en un Pulsador de genes Bio Rad a una capacitancia de 25 μ F y a 600 ohmios. Inmediatamente después de la electroporación se agregó 950 μ l de caldo 2X TY, las células se mezclaron suavemente y se colocaron en un vial esteril. Las células se agitaron a 28°C por 2 horas y se colocaron alícuotas de 25 μ l en cajas de medio sólido Lennox que contenían rifampicina 50 μ g/ml y kanamicina 50 μ g/ml y se incubaron a 28°C por 3 días. Se usaron colonias sencillas para inocular 10 μ l de agua (para confirmación PCR) y 500 μ l de medio Lennox que contenía rifampicina 50 μ g/ml y kanamicina 50 μ g/ml.

Se usaron cultivos positivos PCR para inocular 10 ml de un caldo de medio Lennox que contenía rifampicina 50 μ g/ml y kanamicina 50 μ g/ml. Lo cultivado durante la noche se rotó a 3000g y se resuspendió en un volumen igual de medio MS (sucrosa 3%). Se cortaron segmentos de hojas jóvenes de tabaco de plantas crecidas en cultivo de tejido. Los segmentos se colocaron directamente en la solución de agrobacterias y

17

se dejó por 10 minutos. Los segmentos se removieron luego y se colocaron con la superficie superior hacia abajo sobre placas alimentadoras (10 por placa) y se dejaron por 2 días con poca luz a 22°C. Los segmentos de hoja se colocaron, con la superficie superior hacia arriba, sobre medio de tabaco proyectado con hormonas que contenía cefotaxima 500µg/ml y kanamicina 50µg/ml y se colocaron en un cuarto de crecimiento a 24°C con un régimen de 16hrs de luz /8 hrs de oscuridad. Tres semanas más tarde, los segmentos callosos se transfirieron a tubos Magenta que contenían medio de tabaco proyectado. Una vez se formaron los retoños, se excisaron y se colocaron sobre medio de tabaco proyectado que contenía cefotaxima 500µg /ml y kanamicina 50µg /ml sin hormonas, para enraizar. Las plantas enraizadas se sembraron luego en una mezcla de perlita 50% / compost 50% y se colocaron en un propagador. Después de 1 semana las plantas se removieron del propagador y se sembraron subsecuentemente en materas de 5 pulgadas (12.7 cm). Una vez se inició la floración se colocaron bolsas de papel sobre las flores para prevenir la polinización cruzada. Cuando terminó la floración y se formaron las vainas se removieron las bolsas y se cosecharon las vainas maduras. Las hojas maduras y las semillas de las vainas secas se cosecharon y se almacenaron para análisis posterior.

Análisis de Esteroles

Para el análisis de esteroides, el tejido de la planta obtenido como se indicó arriba se congeló en seco, luego se molió en un polvo fino. 250 µl de dihidrocolesterol 0.2 % p/v se disolvieron en cloroformo se pipetaron en un vial de septum de rosca superior. Después de remover el solvente, se agregó al vial una cantidad del tejido de la planta (50 mg), y se extrajo el lípido total con 5 ml de una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 v/v. El vial se tapó y se colocó en un bloque caliente y se mantuvo a 80-85°C. Después de 30 minutos los contenidos se filtraron y el vial se lavó con una segunda alícuota 5ml de

18

la mezcla cloroformo: metanol. Los contenidos del vial se filtraron una vez más y los filtrados se combinaron. La porción solvente del filtrado se insufló usando una corriente de gas nitrógeno para aislar el residuo lipídico.

La fracción lipídica se sometió luego a transmetilación por calentamiento a 80–85°C en 1 ml de tolueno y 2 ml de metóxido de sodio 0.5N en metanol. Después de 30 minutos, se agregó 2 ml de una solución de trifluoruro de boro al 14% en metanol y se calentó por 10 minutos adicionales a 80–85°C. Después de enfriarse, se agregaron 2-3 ml de eter dietilo seguido por 5 ml de agua desionizada. La fracción de eter se removió y se realizó una extracción adicional de eter. Las fracciones de eter se combinaron, se volvieron a lavar con 5 ml de agua aproximadamente y se secaron durante la noche sobre sulfato de sodio anhidro. La fase de eter se filtró y el solvente se removió usando una corriente de gas nitrógeno.

Los esteroides se disolvieron en 300–400 μ L de tolueno y sililaron por adición de 200 μ l de N,O- bis(trimetilsilil) acetamida :trimetildorosilano 95:5 seguido por incubación a 50°C por 10 minutos. El análisis CG se llevó a cabo usando una columna de 25 m x 0.32 mm d.i. (espesor de película 0.25 μ m) 5% BPX5 (ex SGE) en un cromatógrafo de gases Perquin-Elmer 8420. El programa de temperatura es 180–240°C a 10°C/min, seguido por 240–355°C a 15°C/min. y, finalmente, 5 min. a 355°C. La temperatura FID es 380°C y la presión de helio 10 psi (689.48 Pa). Un volumen de 1.0 μ l se inyectó en la columna. Se asumió un factor de respuesta CG de 1.0 por cada uno de los esteroides con respecto al calibrador interno de dihidrocolesterol.

La Tabla 1 muestra el análisis de esteroides de muestras de hojas obtenidas de tabaco transformado con el vector NH9 que co-expresa una *Hevea* HMGR de longitud total y tabaco SMT1. Hojas de 12 plantas transgénicas independientes (NH9) se analizaron junto con

hojas de 6 plantas no transformadas independientes (SR1) que habían sido generadas por medio cultivo de tejidos, y hojas de 5 plantas transformadas independientes con vector de control que carecía del gen de interés (pVEC). El contenido total de esteroides de las hojas control SR1 varió entre 0.165 - 0.268% peso seco y aquellos de los controles pVEC entre 0.175% - 0.269% peso seco. Las hojas transgénicas NH9 contenían contenidos de esteroides totales que variaban entre 0.176- 0.318% peso seco, representando un incremento de hasta 36.4% sobre el contenido promedio de esteroides en SR1 y 45.6% sobre la media de 4-desmetilesteroides 'benéficos' (4-desmetilesteroides menos colesterol). También se anotaron los niveles de colesterol dramáticamente reducidos en las muestras NH9, con 6 de las 12 muestras que tenían cero (o por debajo de los niveles de detección) en los niveles de colesterol.

La Tabla 2 muestra el análisis de esteroides de muestras de semillas maduras de tabaco transformado con el vector NH9 que co-expresa una *Hevea* HMGR de longitud total y tabaco SMT1. Semillas de 27 plantas transgénicas independientes (NH9) se analizaron junto con semillas de 12 plantas SR1 y 6 plantas de control pVEC. Las semillas de las plantas de control SR1 contenían contenidos de esteroides totales que variaban entre 0.339- 0.425% peso seco y aquellos de las plantas control pVEC entre 0.301- 0.413% peso seco. Las semillas de las plantas transgénicas NH9 contenían contenidos de esteroides totales que variaban entre 0.307 -0.545% representando un incremento de hasta 43.0% sobre el valor promedio de esteroides totales en las SR1 y hasta 51.6% sobre el valor promedio en las SR1 4-desmetilesterol benéfico. Se encontraron significativas disminuciones en el nivel de cicloartenol, el sustrato para el esteroide metil transferasa1, en las muestras NH9 altas en esteroides. Niveles de colesterol en las muestras NH9 con esteroides altos también se redujeron significativamente. Como nota particular están los niveles más altos de sitosterol en las líneas NH9 altas en esteroides comparados con los niveles de los controles.

Ejemplo 2: Co-expresión de una forma truncada de *Hevea brasiliensis hmg1* y *Nicotiana tabacum* SMT1 en plantas

Una forma truncada de *Hevea* HMGR, que carecía del dominio enlazante de membrana en el terminal N, se clonó usando el *Hevea brasiliensis hmg1* como template. El *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Müll. Arg. *thmg1* se clonó usando los primers con base en la secuencia publicada [Chye et al (1991) Plant Mol Biol 19: 473-84]. El primer delantero 5'-CCTACCTCGGAAGCCATGGTTGCAC-3' incorpora un nuevo codón de inicio (resaltado) y un sitio de restricción *Nco* I (subrayado) para aplicaciones de clonación. El primer reverso 5'-CATTTTACATTGCTAGCACCAGATTC-3' contiene un sitio de restricción *Nhe* I (subrayado) para propósitos de sub-clonación corriente abajo. El plásmido pNH8 se usó como el template de DNA en el PCR (30 ciclos) usando polimerasa *Pfu* bajo condiciones estándar y produjo un fragmento del tamaño esperado ~1.3 kb. El gen *thmg1* resultante codifica para los amino ácidos 153-575 de la secuencia de longitud total *hmg1* (575) (Fig. 11b de PCT/EP/00/09374). El producto PCR *thmg1* se clonó en el vector pGEM-T (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se secuenció para confirmar la fidelidad. El *H. brasiliensis tHMG1* se insertó en pNH4 (ver PCT/EP/00/009374 entre los sitios *Nco* I y *Nhe* I sitios del polienlazante, que yacen entre el promotor doble CaMV 35S y el terminador nos, dando pMH3 (ver PCT/EP/00/09374. Este gen quimérico se aisló por digestión con *Xma* CI y *Sal* I, se purificó y se clonó en los sitios correspondientes del polienlazante en pNH9, después de la remoción del gen quimérico de longitud total *hmg1* que ocupaba previamente estos sitios, y la purificación subsecuente del vector binario.

El vector binario pNH9 también contiene el gen *smt1* clonado de *Nicotiana tabacum*, que está bajo control transcripcional del promotor viral CERV. Este constructo binario se llamó pMH7 (Fig. 2). Como se

describe en el Ejemplo 1, los vectores binarios se transformaron en *Agrobacterio tumefaciens* y estos fueron usados subsecuentemente para transformar tabaco.

La Tabla 3 muestra el análisis de esteroides de muestras de hojas obtenidas de tabaco transformado con el vector MH7 que co-expresa la *Hevea* HMGR troncada y el esteroide metiltransferasa1 de tabaco (SMT1). Hojas de 32 plantas transgénicas independientes (MH7) se analizaron junto con 4 controles no transformados SR1 y 4 controles de vector (SJ34). El contenido total de esteroides de las hojas control SR1 varió entre 0.141 -0.221% peso seco y aquel de las plantas control del vector SJ34 entre 0.183 - 0.330%. El contenido total de esteroides de las plantas transgénicas MH7 varió entre 0.142 - 1.339% peso seco representando incrementos de hasta 7.2 veces el valor promedio del control SR1. El contenido de 4- desmetilesterol benéfico de las semillas MH8 se incrementó hasta por 3.9 veces el valor promedio del control SR1.

La Tabla 4 muestra el análisis de esteroides de muestras de semillas maduras obtenidas de tabaco transformado con el vector MH7 que co-expresa la *Hevea* HMGR troncada y el esteroide metiltransferasa1 de tabaco. Semillas de 29 plantas transgénicas independientes (MH7) se analizaron junto con 9 plantas control no transformadas SR1 y 6 plantas control del vector (SJ34). Semillas de las plantas control SR1 muestran contenidos de esteroides totales que variaban entre 0.393 - 0.445% peso seco y aquellos de las plantas control del vector SJ34 entre 0.334 -0.413% peso seco. Semillas de las plantas MH7 mostraron contenidos de esteroides totales que variaban entre 0.379- 0.987% peso seco, representando incrementos de hasta 2.4 veces el valor promedio del control SR1. El contenido de 4-desmetilesterol benéfico de las semillas MH8 se incrementó hasta por 1.9 veces el valor promedio del control SR1. Los niveles absolutos de los 4- desmetilesteroides isofucoesterol, sitoesterol y campesterol se mejoraron substancialmente en el aceite control con respecto a los valores de

control. Los porcentajes de los niveles de colesterol se redujeron hasta por 73% comparado con los valores promedio del control SR1. El incremento en 4-desmetilesteroles 'benéficos' obtenido por co-expresión de la *Hevea* HMGR truncada y SMT1 es mayor que el incremento correspondiente obtenido por expresión de la *Hevea* truncada HMGR sola (ver nuestras solicitudes de patente no-publicadas PCT/EP00/09374 y EP 00303193.7) .

Se realizó análisis posterior de dos muestras de semillas con esteroides altos (MH753 y MH7 32) para determinar la proporción de esteroides libres y esterificados. La fracción lipídica total se aisló como se describe en el Ejemplo 2, pero no se sometió al proceso de transesterificación. El residuo lipídico, que contiene dihidrocolesterol como estándar interno, se disolvió en 40-60 eter de petróleo (250 μ L) y se aplicó a una placa de cromatografía (TLC) de 20 cm x 20 cm x 0.5 mm sobre vidrio con una capa delgada de sílica gel. El vial que contenía el residuo lipídico se lavó con una alícuota adicional de 250 μ L de eter de petróleo, que también se aplicó a la placa. Una alícuota de 10 μ L de una solución que consistía de una mezcla de β - sitosterol (10 mg) y oleato de colesterol (10 mg) disuelto en acetona (1 mL) se señaló para actuar como marcador. La placa se reveló usando eter de petróleo-eter dietilo-ácido acético 60-80 (80:20:2, v/v/v) .Las fracciones de esteroides se visualizaron por aspersion con una solución etanólica al 0.01% p/v de rodamina 6G y observación de la placa bajo luz UV.

Los valores R_f aproximados son 0.25 para esteroides libres y 0.9 para ésteres estériles. La banda de esteroides libres se raspó de la placa y se transfirió a un vial. La fracción de esteroides libres se aisló por lavado de la banda con tres volúmenes de 5 eter dietilo. Las lavaduras de eter se combinaron y se filtraron.

La fracción de esteroides libres, se aisló soplando el solvente con gas nitrógeno, se siliató y se analizó por cromatografía de gas (GC) como

se describe en el Ejemplo 1. Las cantidades de esteroides esterificados se determinaron por sustracción de las cantidades de esteroides libres del total de esteroles, siendo el último determinado por transmetilación (ver Ejemplo 1) .

La Tabla 5 muestra los análisis de las fracciones de esteroides libres y de ésteres esteroides de muestras de semillas transgénicas MH7 32 y 53, junto con la de una muestra control SR1. El esteroles adicional presente en las muestras transgénicas comparado con el control está principalmente en forma de ésteres esteroides. El contenido total de esteroides del control SR1 es 0.388% peso seco, del cual 52.4% está en forma de ésteres. Los contenidos totales de esteroides de MH7 32 y 53 son 0.965% y 0.987% peso seco respectivamente, de los cuales 77.2% y 75.0% respectivamente son esterificados.

24

Ejemplo 3: Co-expresión de una forma truncada de *S. cerevisiae* HMGR1 y *N. tabacum* SMT1 en plantas

Saccharomyces cerevisiae NCYC 957, X2180, SUC2 se cultivó en medio líquido (glucosa al 12% (p/v), Bactopectona al 2% (p/v), extracto de levadura al 1% (p/v), pH 4.0) en un agitador rotatorio (125 rpm) , a 30 °C. Las células se cosecharon centrifugando 5.0 ml de cultivo a 4,500 rpm por 10 minutos. Al pellet de células, se agregó 4 ml de tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 200 mM, EDTA 100 mM, SDS 1%) y se calentó a 60°C por 15 minutos. Se agregaron luego 40 µl de Rnasa (1 mg/ml) y 40 mg de Proteinasa K a la mezcla antes del calentamiento a 50°C por 15 minutos. El DNA se extrajo dos veces con fenol/cloroformo y una vez con cloroformo. La capa acuosa se agregó a 0.7 volúmenes de isopropanol y acetato de sodio 3 M, pH 5.2, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se removió y se agregó 500 µl de etanol al 70% al pellet de DNA y se re-centrifugó. El etanol se removió y el DNA se secó con aire por 60 minutos. El pellet de DNA se suspendió en 100 µl de tampón TE y se midió la absorbancia a 260nm y se cuantificó el DNA. El DNA se diluyó a 0.5µg /µl y se congeló.

Con base en la secuencia nucleótida del cósmido 8248 del proyecto de secuenciación del cromosoma XIII de la *S. cerevisiae*, se diseñaron los primers para clonar el gen *tHMG1* por reacción en cadena de la polimerasa. El primer posterior 5'-GCTTGGATAAGG CCATGGGTCCTTTAG-3' incorpora un nuevo codón de inicio (resaltado) y un sitio de restricción *Nco* I (subrayado) para propósitos de clonación. El primer reverso 5'-GAATACCAATGAGCTCT GACTAAG-3' contiene un sitio de restricción *Sac* I (subrayado) para aplicaciones de sub-clonación. Antes de PCR el DNA genómico de *S.*

cerevisiae, NCYC 957, X2180, SUC2, mal, gal2, CUA se digirió con *Eco* RI y el DNA se fraccionó en un gel de agarosa al 0.7%. Los fragmentos de DNA ~2.0 kb en tamaño se escizaron del gel y se purificaron usando el kit de extracción en gel Qiagen QIAquick, de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Este DNA se usó como el template en el PCR subsecuente. El PCR (35 ciclos) se realizó usando polimerasa Taq y Pfu (3:1) bajo condiciones estándar y se produjo un fragmento de DNA del tamaño esperado -1.4 kb. El gen *tHMGR1* resultante codifica para los amino ácidos 598-1054 de la secuencia *HMGR1* de longitud total (1054) (ver Fig. 12b de PCT/EP/00/09374). El producto *tHMGR1* PCR se clonó en el vector pGEM-T (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se secuenció para confirmar fidelidad.

El *S. cerevisiae tHMGR1* se insertó en pNH4 entre los sitios *Nco* I y *Sac* I del polienlazante pMH4. Este gen quimérico se aisló por digestión con *Xma* CI y *Sal* I, se purificó y se clonó en los sitios correspondientes del polienlazante en pNH9 como se describe previamente por el gen quimérico *H. brasiliensis thmg1*, para crear el plásmido binario pMH8 (Fig. 3). Ambos pMH3 y pMH4 (ver PCT/EP/00/09374) se secuenciaron para chequear que los genes *HMGR1* habían sido insertados correctamente y que hubiera errores en las secuencias promotor-iniciación y terminador. Como se describe en el Ejemplo 1, los vectores binarios se transformaron en *Agrobacterio tumefaciens* y estos fueron usados subsecuentemente para transformar tabaco.

La Tabla 6 muestra el análisis de esteroides de muestras de semillas maduras obtenidas de plantas de tabaco transformadas con el vector MH8 que expresa los genes de *S.cerevisiae* HMGR truncada y de tabaco SMT1. Semillas de 23 plantas transgénicas independientes (MH8) se analizaron junto con semillas de 4 plantas control SR1 y 4 plantas control del vector SJ34. El contenido total de esteroides de

semillas de las plantas control SR1 varió entre 0.363% - 0.428% (promedio = 0.388%) y el de las plantas control del vector entre 0.213 - 0.428%. El contenido total de esteroides de las semillas transgénicas MH8 varió entre 0.251% - 0.526% representando incrementos de hasta 35% sobre el promedio SR1. El contenido de 4-desmetilesterol de las semillas MH8 se incrementó hasta por 41% comparado con el promedio SR1.

Ejemplo 4: Re-transformación de la planta de tabaco transgénica ACP -Ntamt-1 #27 con una forma truncada N del gen de *Hevea* HMGR dirigido por un promotor constitutivo.

Plantas de *Nicotiana tabacum* (NH19 series) transformadas con el gen *N. tabacum* Ntamt-1 (SMT1) se generaron como se describe en la EP 00303193.7. Semillas de la planta NH19 #27 EP 00303193.7 se germinaron en agar MS que contenía 25mg/L higromicina. De los retoños resultantes, se cortaron segmentos de hojas y se transformaron con un constructo de *Hevea brasiliensis* HMGR truncada 2x35S (MH 5, PCT / EP /00 /09374) como se describe aquí arriba.

La Tabla 7 muestra el análisis de esteroides de semillas maduras obtenidas de plantas de tabaco NH19 #27 transformadas con el constructo MH5 y que expresa los genes de tabaco SMT1 y de *H. brasiliensis* truncada HMGR. Semillas de 24 plantas transgénicas independientes se analizaron junto con semillas de 5 plantas control SR1, 4 plantas crecieron de la semilla NH19 #27 y 10 plantas control del vector (SJ34 en NH19#27) .El contenido total de esteroides de las plantas SR1 varió entre 0.375- 0.441% peso seco con un promedio de 0.413%, el de las Plantas NH19#27 entre 0.413- 0.555% peso seco con un promedio de 0.496% y el de los controles del vector entre 0.409% - 0.560% peso seco con un promedio de 0.501%. El contenido total de esteroides de las plantas MH5 / NH19#27 varió entre 0.480 - 0.928% peso seco representando incrementos de hasta 2.2 veces en esteroides totales sobre la media control SR1. El contenido de 4-desmetilesterol de las semillas MH5 / NH19#27 se incrementó hasta por 1.9 veces sobre el promedio SR1. El incremento en 4-desmetilesteroides 'benéficos' es mayor que el incremento correspondiente en 4-desmetilesteroides obtenido por expresión en tabaco de la HMGR truncada sola (ver PCT / EP /00 / 09374 y EP 00303193).

Ejemplo 5: Re-transformación de planta de tabaco transgénica ACP -Ntsmt 1 27 con un gen de Hevea HMGR truncada N dirigido por un promotor de semilla específico ACP 0.29kb (MH 15)

Plantas de *Nicotiana tabacum* (NH19 series) transformadas con el gen de *N. tabacum* Ntsmt-1 (SMT1) se generaron como se describe en EP 00303193.7. Semillas de planta NH19 #27 EP 00303193.7 se germinaron en agar MS que contenía 25mg/L higromicina. De los retoños resultantes, se cortaron segmentos de hojas y se transformaron con el gen *Hevea brasiliensis* hmg1 dirigido por un promotor de proteínas portador de acilo (ACP) semilla-específico 0.29kb *Brassica napus* (MH 15 como en PCT / EP /00 /09374) como se describe aquí arriba.

La Tabla 8 muestra el análisis de esteroides de semillas maduras de plantas NH19#27 re-transformadas con MH15 que contenía el gen de *H. brasiliensis* truncada *hmg1* dirigido por el promotor ACP. Semillas de 30 plantas transgénicas independientes se analizaron junto con 4 plantas control SR1, 5 plantas NH19#27 y 4 plantas control del vector (SJ34 en NH19#27). El contenido total de esteroides de las plantas SR1 varió entre 0.340% - 0.432% peso seco con un promedio de 0.393%, el de las plantas NH19#27 entre 0.505% -0.595% peso seco con un promedio de 0.565% y el de los controles del vector entre 0.509% - 0.573% peso seco con un promedio de 0.545%. El contenido total de esteroides de las plantas MH15 / NH19#27 varió entre 0.430% -0.865% peso seco representando incrementos de hasta 2.2 veces en esteroides totales sobre el promedio del control SR. El contenido de 4-desmetilesterol 'benéfico' de las plantas MH15 / NH19#27 se incrementó hasta por 2.3 veces sobre el control SR1. La expresión de ambos genes HMGR truncada y SMT1 por medio de promotores de

semilla específica ACP ha conducido a un incremento mayor en 4-desmetilesteroles 'benéficos' que los esteroides totales.

Ejemplo 6 : Re-transformación de planta de tabaco transgénica ACP -Ntamt 1 27 con un gen *Hevea brasiliensis* truncada N hmg1 dirigido por un promotor ACP de semilla específica 1.4kb (NH61)

Plantas de *Nicotiana tabacum* (serie NH19) transformadas con el gen *N. tabacum* Ntamt-1 (SMT1) se generaron como se describe en EP 00303193.7. Semillas de planta NH19 #27 EP 00303193.7 se germinaron en agar MS que contenía 25mg/L higromicina. De los retoños resultantes, se cortaron segmentos de hojas y se transformaron con un constructo (NH61) que contenía la *Hevea brasiliensis* truncada N HMGR enlazada a un promotor de proteína portador de acilo (ACP) *Brassica napus* de semilla específica 1.4 kb. El promotor de proteína portador de acilo (ACP) *Brassica napus* de semilla específica 1.4 kb, que incluía la región no trasladada 5', se amplificó por PCR (primers: cIACP1 5'-agg tcg acc cgg gag gat cc-3', cIACP2 5'-cag aga gct agc ttg cat gga gac-3') del vector pTZ5BS [de Silva et al, (1992) *Planta Mol Biol* 18: 1163-1172], introduciendo los sitios de restricción enzimática *Xma*I y *Nhe*I (subrayado). Una versión truncada del gen *Hevea brasiliensis* hmgr1 (thmgr1) se generó por PCR usando el vector pHEV36 [Schaller et al., (1995) *Plant Physiol* 109: 761-770] como el template y los primers HbtH1 (5'-acg cGT CGA CTC CCT TAG TCT CGG AGG AAG ACG-3') y HbtH2 (5'-tcg agc tcc aat tgg cta gc-3'). Este fragmento de gen carece del terminal 5', que codifica el dominio de extensión de la membrana, y da lugar a un producto genético que comprende los amino ácidos 153-575 de la proteína nativa. Los sitios de restricción enzimática *Sal*I y *Nhe*I se introdujeron en cualquiera de los extremos del fragmento para facilitar la clonación. El promotor amplificado ACP 1.4 kbp y los fragmentos tHMGR1se digirieron, se ligaron y se insertaron en una región polienlazante

20

modificada de pUC19, que poseía el vector pNH60. El caseta de expresión, ACP-*thmgr1*-NOS, se liberó y se clonó en el *XmaI/EcoRI* digerido pSJ34 dando el vector binario pNH61 (Figura 4) . El vector binario pSJ34 se había creado previamente por llenado del sitio *Bam*HI de pGPTV-Kan, entre el marcador seleccionable y el extremo 3' de p(A)g7, con enzima Klenow [Becker et al., (1992) Plant Mol Biol 20: 1195-97] .

La Tabla 9 muestra el análisis de esteroides de semillas maduras obtenidas de NH19#27 re-transformada con NH61 y que expresa el tabaco SMT1 y la *Hevea brasiliensis* truncada HMGR. Semillas de 20 plantas transgénicas independientes se analizaron junto con semillas de 5 plantas SR1 y 4 plantas que crecieron de la semilla NH19#27. El contenido total de esteroides de las semillas SR1 varió entre 0.389% - 0.459% peso seco con un promedio de 0.421% y el de las plantas NH19#27 TI entre 0.489% -0507% peso seco con un promedio de 0.499%. El contenido total de esteroides de las semillas de las plantas NH19#27 / NH61 varió entre 0.497% -1.264% peso seco representando incrementos de hasta 3.0 veces sobre el promedio del control SR1. La co-expresión de los genes de *Hevea* truncada HMGR y tabaco SMT1 por medio de promotores ACP mejoró los esteroides totales a un nivel mayor que el logrado en cualquier otra combinación probada de los dos genes. El contenido de 4-desmetilesterol de las plantas NH19#27 / NH61 se incrementó hasta por 2.5 veces sobre el promedio SR1. Los 4-desmetilesteroides 'benéficos' como una proporción de esteroides totales en estas semillas transgénicas son claramente muy altos. Los niveles de sitoesterol, campesterol y isofucoesterol son particularmente elevados, mientras que los niveles de colesterol se disminuyen.

21

Ejemplo 7: Co-transformación de *N.tabacum* con una forma truncada de *Hevea brasiliensis* HMGR y *N.tabacum* SMT1 ambos dirigidos por un promotor ACP de semilla-específica 1.4kb

El fragmento de gen *Ntsmt1-1*, que codificaba esteroil metiltransferasa tipo 1 de *Nicotiana tabacum*, se amplificó por PCR (primers: dSMT1p1 51-aa cca ATG TCg AcA CAA GGG GCT TTT g- 3', dSMT1p2 5-tcc aat gct agc TTA CTG AGA GTC TGA AAT GG- 3') para introducir los sitios *Sall* y *NheI* (subrayado). El fragmento amplificado *Ntsmt1-1* se digirió y se insertó junto con el fragmento del promotor ACP *Brassica napus* 1.4 kb (ver Ejemplo 6) en una región polienlazante modificada de pUC19, que también contiene la región terminador NOS, que posee el vector pNH70. Un enlazante de DNA que tiene un sitio *EcoRV* y termina compatible con *EcoRI* y *NdeI* se obtuvo por los oligonucleótidos recodidos EcoV1 (5'-aat tgt atg ata tcg agc tcg aat tcg cgg ccg cca-3') y EcoV2 (5'-tat ggc ggc cgc gaa ttc gag ctc gat atc ata c-3'). Este enlazante se insertó en el *EcoRI/NdeI* digerido de pNH60 que posee pNH71. El fragmento *SmaI* / *EcoRI* (promotor ACP 1.4 -*Ntsmt1-1*-NOS) se liberó de pNH70 y se insertó en el *EcoRV* / *EcoRI* digerido de pNH71 para dar pNH72. El vector pNH72 se digirió con *XmaI* y *EcoRI* para liberar el casete de expresión doble (1.4 ACP-tHMGR1/*Ntsmt1-1*-NOS), que se insertó subsecuentemente en el vector binario pSJ34 para dar pNH73 (Figura 5).

Como se describe en el Ejemplo 1, el pNH73 se transformó en *Agrobacterio tumefaciens* que, a su vez, se usó para transformar *N. tabacum*.

Ejemplo 8: Co-transformación de *Brassica napus* (aceite de semilla de colza) con una forma truncada de *Hevea brasiliensis* HMGR y *Nicotiana tabacum* SMT 1 (MH7)

Células electrocompetentes de *Agrobacterio tumefaciens* (cepa LBA4404) se descongelaron sobre hielo y se agregó 5ng del plásmido pMH7 (ver Ejemplo 2). Las células más el plásmido luego se colocaron en una cubeta de electroporación pre-enfriada y se electroporaron en un Pulsador de genes Bio Rad a una capacitancia de 25µF y a 600 ohmios. Inmediatamente después de la electroporación se agregó 950µl de caldo de 2X TY, las células se mezclaron suavemente y se colocaron en un vial esteril. Las células se agitaron a 28°C por 2 horas y alícuotas de 25µl se colocaron en placas en medio Lennox sólido que contenía rifampicina 50µg /ml y kanamicina 50µg /ml y se incubó a 28°C por 3 días. Se usaron colonias simples para inocular 10µl de agua (por confirmación PCR) y 500µl de medio Lennox que contenía rifampicina 50µg /ml y kanamicina 50µg /ml.

Las semillas fueron esterilizadas en la superficie en hipoclorito de sodio al 1% por 20 mins. Las semillas se lavaron en agua destilada esteril 3 veces y se colocaron en placas a una densidad de 10 semillas por placa en MSMO con sucrosa al 3%, pH 5.8. Las semillas germinaron a 24°C con un fotoperíodo de 16 h luz /8 h oscuridad. Después de 3-4 días, los cotiledones, que incluían 2mm de peciolo, se excizaron. Se tuvo cuidado al remso sobre el meristemo apical para mantener el cotiledon fuera del medio. Los cotiledones excisados se colocaron en el medio MS, sucrosa al 3% y agar al 0.7% con 6- benzilaminopurina 20 µM (BAP). Los peciolo con los cotiledones unidos se sumergieron en este medio a una profundidad de aproximadamente 2mm en 10 por placa.

Para la transformación, los cotiledones individual excisados se tomaron de las placas y la superficie cortada del peciolo se sumergió en la

suspensión de agrobacterium por unos pocos segundos. Luego se devolvieron a las placas MS y se co-cultivaron con el agrobacterium por 72 h. Después de la co-cultivación, los cotiledones se transfirieron al medio de regeneración (medio MS con 20 μ M de BAP, sucrosa al 3%, agar al 0.7%, pH 5.8 con augmentina 400mg/l y sulfato de kanamicina 1.5 mg/l) .Los pecioloos se sumergieron, como entes, a una profundidad de 2mm a una densidad de 10 explantas por placa, y nuevamente el cotiledon se dejó fuera del medio. Después de 2 o 3 semanas, los retoños habían aparecido, algunos de estos estaban blancuzcos a la cuarta semana, los retoños verdes restantes se sub-cultivaron sobre medio de elongación por proyección (medio de regeneración menos BAP). Después de 1 o 2 semanas, cuando la dominancia apical se había establecido, los retoños se transfirieron al medio de enraizamiento [medio MS, sucrosa al 3%, ácido indol butírico 2 mg/l (IBA), agar al 0.7% y augmentina 400mg/l (no kanamicina)]. Tan pronto como se obtuvo una pequeña masa de raíces, las plántulas se transfirieron a una mezcla para siembra suplementada con gránulos fertilizantes. Las plantas crecieron en una cámara húmeda (humedad promedio del 75%) por 2- 3 semanas a 24°C, fotoperíodo 16h luz / 8h oscuridad. Después de 3 semanas las plantas se transfirieron al invernadero y se dejaron florecer y producir semillas. Las vainas maduras se cosecharon y las semillas se sometieron al análisis de esteroides como se describe en el Ejemplo 1.

La Tabla 10 muestra el análisis de esteroides de semillas maduras de plantas transformadas MH7. Semillas de 4 plantas independientes se analizaron junto con la semilla de una planta control del vector. El contenido de esteroides del control del vector fue 0.243% peso seco, mientras que el de las MH7 transgénicas varió entre 0.277% - 0.374% peso seco representando un incremento de hasta 1.5 veces en esteroides totales y 1.6 veces de incremento en los 4-desmetilesteroides 'benéficos'.

REIVINDICACIONES

1. Un método para transformar una planta por medio de

A1) transformación de una célula de una planta con un constructo de DNA recombinante que comprende un segmento de DNA que codifica un polipéptido con actividad HMGR inhibida sin retroalimentación y un polipéptido que codifica una actividad esteroil metiltransferasa1 y promotores para dirigir la expresión de dichos polipéptidos en dicha célula de la planta para formar una célula transformada de planta; o

A2) re-transformación de una célula de planta que expresa una actividad HMGR inhibida sin retroalimentación con un gen que codifica una actividad esteroil metiltransferasa1; o

A3) re-transformación de una célula de planta que expresa una actividad esteroil metiltransferasa1 con un gen que codifica una actividad HMGR inhibida sin retroalimentación; y

D) regeneración de las células transformadas de planta de arriba en plantas transgénicas; y

E) selección de plantas transgénicas que tienen niveles mejorados de 4-desmetilesteroles comparados con cepas de tipo silvestre de la misma planta.

2. Planta obtenible por un medio de acuerdo con la Reivindicación 1.

3. Tejido de planta obtenido de una planta de acuerdo con la Reivindicación 2.

4. Tejido de planta de acuerdo con la Reivindicación 3, seleccionado del grupo de hojas, frutas y semillas.
5. Planta que tiene incorporado en su genoma un gen heterólogo que codifica una actividad HMGR inhibida sin retroalimentación en combinación con un gen que codifica SMT1.
6. Planta de acuerdo con la Reivindicación 5 en donde el gen que codifica una actividad HMGR inhibida sin retroalimentación es un gen que codifica una actividad HMGR de polipéptido truncado.

Tabla 1
Análisis de Esteroides de Hoja de Tabaco Transformada con Hevea HMGR + N. Tabaccum SMT1 (NH9)

Esteroides Totales como % de peso muestra

Código muestra	estroneano	cicloart	24mca	24mlcf	24elcf	d7-avena	isoefc	sito	estig	camp	col	total
NH9 36	0.0000	0.0061	0.0000	0.0000	0.0066	0.0000	0.0135	0.0700	0.1077	0.1098	0.0041	0.318
NH9 37	0.0000	0.0225	0.0000	0.0127	0.0000	0.0000	0.0343	0.0262	0.0811	0.0834	0.0294	0.290
NH9 40	0.0000	0.0072	0.0000	0.0055	0.0000	0.0000	0.0197	0.0227	0.0902	0.0955	0.0202	0.261
NH9 22	0.0000	0.0000	0.0000	0.0103	0.0000	0.0000	0.0100	0.0466	0.0857	0.0991	0.0000	0.252
NH9 11	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0093	0.0473	0.0863	0.0863	0.0000	0.249
NH9 7	0.0000	0.0067	0.0000	0.0113	0.0000	0.0000	0.0229	0.0226	0.0732	0.0842	0.0269	0.248
NH9 30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0028	0.0000	0.0000	0.0077	0.0410	0.0891	0.1022	0.0033	0.246
NH9 28	0.0000	0.0000	0.0000	0.0038	0.0000	0.0000	0.0106	0.0388	0.0891	0.0962	0.0029	0.241
NH9 21	0.0000	0.0000	0.0000	0.0024	0.0000	0.0000	0.0101	0.0416	0.0797	0.0871	0.0000	0.221
NH9 31	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0043	0.0380	0.0767	0.0816	0.0000	0.201
NH9 18	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0035	0.0259	0.0694	0.0836	0.0000	0.182
NH9 25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0025	0.0181	0.0759	0.0793	0.0000	0.176
SR1 6	0.0000	0.0088	0.0000	0.0038	0.0000	0.0000	0.0212	0.0303	0.0880	0.0958	0.0204	0.268
SR1 7	0.0000	0.0062	0.0000	0.0018	0.0000	0.0000	0.0159	0.0287	0.0831	0.0859	0.0202	0.250
SR1 9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0057	0.0000	0.0000	0.0244	0.0377	0.0783	0.0828	0.0206	0.249
SR1 8	0.0000	0.0031	0.0000	0.0032	0.0000	0.0000	0.0181	0.0259	0.0797	0.0890	0.0189	0.238
SR1 10	0.0000	0.0070	0.0000	0.0045	0.0000	0.0000	0.0154	0.0173	0.0802	0.0807	0.0200	0.225
SR1 3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0129	0.0453	0.0472	0.0487	0.0108	0.165
Promedio	0.0000	0.0042	0.0000	0.0031	0.0000	0.0000	0.0180	0.0305	0.0761	0.0822	0.0185	0.233
pVEC 1	0.0000	0.0059	0.0000	0.0086	0.0000	0.0000	0.0291	0.0409	0.0760	0.0875	0.0209	0.269
pVEC 18	0.0000	0.0094	0.0027	0.0054	0.0000	0.0000	0.0306	0.0254	0.0786	0.0702	0.0174	0.238
pVEC 5	0.0000	0.0019	0.0000	0.0040	0.0000	0.0000	0.0197	0.0349	0.0710	0.0764	0.0166	0.224
pVEC 17	0.0000	0.0055	0.0000	0.0029	0.0000	0.0000	0.0175	0.0285	0.0710	0.0822	0.0186	0.224
pVEC 10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0024	0.0000	0.0000	0.0108	0.0226	0.0653	0.0843	0.0094	0.175
Promedio	0.0000	0.0045	0.0005	0.0046	0.0000	0.0000	0.0215	0.0301	0.0720	0.0761	0.0166	0.226

Tabla 2
Análisis de Esteroides de Semilla de Tabaco Transformada con Hevea HMGR + N. Tabaccum SMT1 (NH9)

Esteroides Totales como % de peso muestra

Código muestra	esquetero	cicloart	24mca	24mlcf	24elcf	d7-avena	isdfluc	sito	estg	camp	col	total
NH9 34	0.0000	0.0106	0.0078	0.0142	0.0625	0.0046	0.0938	0.2288	0.0377	0.0892	0.0158	0.545
NH9 40	0.0000	0.0086	0.0069	0.0126	0.0568	0.0037	0.1095	0.2062	0.0344	0.0714	0.0166	0.528
NH9 21	0.0000	0.0115	0.0081	0.0118	0.0505	0.0027	0.0913	0.2074	0.0451	0.0704	0.0218	0.521
NH9 18	0.0000	0.0164	0.0068	0.0085	0.0543	0.0030	0.0798	0.1855	0.0382	0.0598	0.0546	0.507
NH9 38	0.0000	0.0089	0.0061	0.0088	0.0437	0.0025	0.0868	0.2022	0.0394	0.0615	0.0164	0.478
NH9 11	0.0000	0.0163	0.0066	0.0119	0.0521	0.0034	0.0870	0.1840	0.0342	0.0585	0.0217	0.476
NH9 22	0.0000	0.0113	0.0063	0.0101	0.0474	0.0031	0.0804	0.1940	0.0396	0.0599	0.0157	0.488
NH9 31	0.0000	0.0158	0.0091	0.0112	0.0516	0.0038	0.0849	0.1731	0.0331	0.0559	0.0256	0.484
NH9 10	0.0000	0.0163	0.0069	0.0084	0.0484	0.0031	0.0816	0.1819	0.0320	0.0549	0.0167	0.452
NH9 33	0.0000	0.0137	0.0074	0.0093	0.0465	0.0031	0.0790	0.1703	0.0397	0.0531	0.0247	0.447
NH9 13	0.0000	0.0146	0.0075	0.0089	0.0417	0.0028	0.0722	0.1768	0.0418	0.0593	0.0167	0.444
NH9 32	0.0000	0.0114	0.0074	0.0081	0.0400	0.0023	0.0782	0.1681	0.0401	0.0537	0.0244	0.434
NH9 27	0.0000	0.0149	0.0083	0.0071	0.0408	0.0025	0.0702	0.1694	0.0361	0.0525	0.0179	0.418
NH9 26	0.0000	0.0133	0.0085	0.0000	0.0382	0.0026	0.0630	0.1781	0.0422	0.0571	0.0152	0.416
NH9 29	0.0000	0.0087	0.0036	0.0059	0.0307	0.0018	0.0686	0.1835	0.0403	0.0589	0.0136	0.416
NH9 25	0.0000	0.0181	0.0079	0.0087	0.0352	0.0031	0.0676	0.1546	0.0383	0.0534	0.0268	0.410
NH9 35	0.0000	0.0178	0.0058	0.0046	0.0372	0.0027	0.0719	0.1504	0.0361	0.0497	0.0269	0.403
NH9 39	0.0000	0.0247	0.0082	0.0048	0.0323	0.0019	0.0718	0.1460	0.0343	0.0481	0.0264	0.398
NH9 6	0.0000	0.0280	0.0102	0.0044	0.0276	0.0013	0.0611	0.1423	0.0411	0.0505	0.0276	0.394
NH9 30	0.0000	0.0110	0.0054	0.0085	0.0366	0.0024	0.0711	0.1485	0.0376	0.0539	0.0163	0.391
NH9 12	0.0000	0.0107	0.0055	0.0053	0.0325	0.0025	0.0583	0.1658	0.0428	0.0529	0.0143	0.388
NH9 37	0.0000	0.0356	0.0095	0.0000	0.0252	0.0019	0.0587	0.1410	0.0366	0.0448	0.0239	0.377
NH9 14	0.0000	0.0289	0.0079	0.0045	0.0315	0.0019	0.0608	0.1335	0.0314	0.0421	0.0205	0.363
NH9 24	0.0000	0.0297	0.0089	0.0040	0.0207	0.0018	0.0572	0.1302	0.0351	0.0445	0.0297	0.362
NH9 18	0.0000	0.0118	0.0054	0.0000	0.0382	0.0026	0.0578	0.1470	0.0370	0.0465	0.0149	0.361
NH9 23	0.0000	0.0077	0.0033	0.0039	0.0152	0.0024	0.0363	0.1371	0.0581	0.0559	0.0127	0.333
NH9 18	0.0000	0.0076	0.0000	0.0000	0.0169	0.0000	0.0491	0.1238	0.0432	0.0488	0.0173	0.307

1

SR1 18	0.0000	0.0330	0.0086	0.0058	0.0368	0.0020	0.0766	0.1533	0.0325	0.0497	0.0268	0.425
SR1 6	0.0000	0.0337	0.0077	0.0057	0.0347	0.0014	0.0884	0.1416	0.0347	0.0497	0.0314	0.408
SR1 3	0.0000	0.0308	0.0093	0.0070	0.0349	0.0029	0.0725	0.1427	0.0317	0.0486	0.0290	0.407
SR1 17	0.0000	0.0346	0.0088	0.0043	0.0336	0.0025	0.0678	0.1471	0.0305	0.0459	0.0244	0.400
SR1 1	0.0000	0.0310	0.0079	0.0053	0.0337	0.0023	0.0654	0.1357	0.0329	0.0449	0.0271	0.386
SR1 9	0.0000	0.0292	0.0071	0.0046	0.0332	0.0021	0.0681	0.1381	0.0312	0.0459	0.0235	0.384
SR1 7	0.0000	0.0305	0.0083	0.0048	0.0307	0.0025	0.0647	0.1334	0.0365	0.0468	0.0243	0.384
SR1 2	0.0000	0.0212	0.0082	0.0040	0.0286	0.0024	0.0627	0.1391	0.0400	0.0489	0.0267	0.380
SR1 8	0.0000	0.0334	0.0093	0.0053	0.0350	0.0019	0.0827	0.1281	0.0284	0.0427	0.0274	0.372
SR1 4	0.0000	0.0176	0.0062	0.0000	0.0218	0.0012	0.0599	0.1357	0.0367	0.0431	0.0220	0.344
SR1 5	0.0000	0.0125	0.0048	0.0000	0.0177	0.0014	0.0547	0.1413	0.0413	0.0442	0.0228	0.341
SR1 20	0.0000	0.0246	0.0064	0.0000	0.0232	0.0012	0.0495	0.1346	0.0407	0.0427	0.0160	0.339
Promedio	0.0000	0.0277	0.0078	0.0039	0.0301	0.0020	0.0644	0.1392	0.0348	0.0459	0.0251	0.381
pVEC 17	0.0000	0.0318	0.0081	0.0062	0.0382	0.0027	0.0735	0.1416	0.0331	0.0465	0.0305	0.413
pVEC 10	0.0000	0.0284	0.0111	0.0062	0.0377	0.0026	0.0663	0.1453	0.0334	0.0474	0.0290	0.407
pVEC 15	0.0000	0.0257	0.0081	0.0052	0.0314	0.0017	0.0717	0.1443	0.0339	0.0489	0.0341	0.405
pVEC 9	0.0000	0.0235	0.0081	0.0071	0.0347	0.0026	0.0751	0.1409	0.0340	0.0462	0.0305	0.403
pVEC 11	0.0000	0.0242	0.0088	0.0064	0.0312	0.0026	0.0841	0.1537	0.0361	0.0429	0.0227	0.394
pVEC 5	0.0000	0.0131	0.0050	0.0000	0.0147	0.0025	0.0373	0.1221	0.0465	0.0425	0.0173	0.301
Promedio	0.0000	0.0245	0.0085	0.0052	0.0313	0.0025	0.0646	0.1413	0.0362	0.0457	0.0273	0.387

Tabla 3
Análisis de Esteroles de Hoja de Tabaco Transformada con Hevea HMGR truncada y Nicotiana glauca SMT1 (MH7)

Esteroles Totales como % de peso seco

Código muestra	esqualano	cicloart	24mica	24mldf	24aldf	d7-avena	isoofuc	alto	estig	camp	col	total
MH7 53	0.1504	0.1082	0.2321	0.1357	0.1273	0.0229	0.1490	0.2241	0.1079	0.0714	0.0095	1.339
MH7 31	0.0327	0.4200	0.0292	0.0444	0.0509	0.0236	0.1148	0.1010	0.0872	0.0424	0.0315	0.978
MH7 32	0.0278	0.0930	0.1479	0.0984	0.1132	0.0194	0.1191	0.1718	0.0899	0.0512	0.0152	0.945
MH7 3	0.0189	0.0891	0.1544	0.0891	0.0973	0.0212	0.1346	0.1406	0.0829	0.0460	0.0059	0.880
MH7 35	0.0282	0.0825	0.2329	0.0794	0.0802	0.0229	0.1012	0.1208	0.0840	0.0383	0.0110	0.861
MH7 19	0.0136	0.0838	0.1311	0.0838	0.0953	0.0201	0.1253	0.1458	0.0776	0.0470	0.0042	0.827
MH7 54	0.0075	0.0912	0.1083	0.0825	0.0884	0.0179	0.1280	0.1476	0.0882	0.0633	0.0045	0.805
MH7 6	0.0096	0.1312	0.0716	0.0531	0.0841	0.0119	0.1127	0.1167	0.0800	0.0504	0.0059	0.707
MH7 4	0.0068	0.1528	0.0201	0.0328	0.0275	0.0042	0.0452	0.0857	0.1042	0.0516	0.0290	0.559
MH7 46	0.0000	0.0387	0.0158	0.0170	0.0044	0.0024	0.0175	0.0190	0.1044	0.0279	0.0288	0.276
MH7 48	0.0014	0.0215	0.0121	0.0179	0.0108	0.0032	0.0145	0.0396	0.0950	0.0481	0.0087	0.273
MH7 43	0.0000	0.0187	0.0115	0.0118	0.0119	0.0059	0.0426	0.0563	0.0590	0.0496	0.0053	0.273
MH7 45	0.0000	0.0389	0.0154	0.0158	0.0054	0.0024	0.0121	0.0285	0.0988	0.0356	0.0185	0.265
MH7 11	0.0000	0.0070	0.0136	0.0133	0.0058	0.0033	0.0258	0.0327	0.1027	0.0429	0.0177	0.284
MH7 42	0.0000	0.0293	0.0083	0.0130	0.0059	0.0016	0.0027	0.0465	0.0894	0.0489	0.0071	0.254
MH7 24	0.0000	0.0216	0.0122	0.0118	0.0042	0.0028	0.0157	0.0305	0.0845	0.0371	0.0208	0.251
MH7 27	0.0000	0.0074	0.0128	0.0104	0.0047	0.0030	0.0163	0.0302	0.1023	0.0390	0.0225	0.249
MH7 33	0.0000	0.0345	0.0140	0.0119	0.0053	0.0026	0.0083	0.0280	0.0917	0.0388	0.0120	0.247
MH7 37	0.0013	0.0276	0.0131	0.0105	0.0039	0.0029	0.0182	0.0213	0.0853	0.0318	0.0209	0.235
MH7 22	0.0000	0.0226	0.0077	0.0081	0.0038	0.0020	0.0125	0.0191	0.1011	0.0354	0.0218	0.234
MH7 34	0.0000	0.0182	0.0082	0.0073	0.0048	0.0028	0.0126	0.0328	0.0914	0.0395	0.0115	0.229
MH7 26	0.0000	0.0159	0.0111	0.0105	0.0037	0.0027	0.0164	0.0249	0.0873	0.0408	0.0142	0.227
MH7 38	0.0000	0.0130	0.0080	0.0068	0.0058	0.0032	0.0169	0.0310	0.0877	0.0381	0.0163	0.227
MH7 21	0.0000	0.0122	0.0041	0.0058	0.0066	0.0033	0.0227	0.0396	0.0726	0.0441	0.0051	0.216
MH7 47	0.0008	0.0246	0.0080	0.0086	0.0032	0.0015	0.0126	0.0187	0.0855	0.0258	0.0255	0.215
MH7 40	0.0000	0.0256	0.0119	0.0087	0.0044	0.0026	0.0123	0.0230	0.0753	0.0325	0.0150	0.212
MH7 36	0.0000	0.0131	0.0084	0.0089	0.0062	0.0019	0.0078	0.0324	0.0734	0.0398	0.0039	0.194
MH7 7	0.0000	0.0275	0.0075	0.0084	0.0030	0.0020	0.0146	0.0172	0.0585	0.0262	0.0121	0.175

~~40~~

MH7 49	0.0000	0.0088	0.0045	0.0050	0.0025	0.0024	0.0201	0.0141	0.0588	0.0298	0.0184	0.164
MH7 5	0.0000	0.0038	0.0023	0.0081	0.0036	0.0025	0.0152	0.0216	0.0640	0.0345	0.0067	0.160
MH7 23	0.0000	0.0134	0.0055	0.0083	0.0017	0.0019	0.0131	0.0128	0.0609	0.0243	0.0151	0.157
MH7 39	0.0000	0.0059	0.0036	0.0058	0.0037	0.0021	0.0117	0.0182	0.0553	0.0276	0.0085	0.142
SR1 6	0.0000	0.0188	0.0055	0.0079	0.0039	0.0017	0.0096	0.0216	0.0721	0.0284	0.0132	0.179
SR1 7	0.0000	0.0068	0.0028	0.0038	0.0039	0.0023	0.0098	0.0273	0.0966	0.0382	0.0115	0.201
SR1 9	0.0000	0.0183	0.0061	0.0074	0.0036	0.0023	0.0175	0.0321	0.0884	0.0320	0.0152	0.221
SR1 10	0.0000	0.0044	0.0024	0.0035	0.0036	0.0024	0.0121	0.0187	0.0588	0.0247	0.0108	0.141
Promedio	0.0000	0.0110	0.0042	0.0057	0.0037	0.0022	0.0122	0.0249	0.0790	0.0298	0.0127	0.185
SJ34 1	0.0000	0.0116	0.0060	0.0100	0.0063	0.0017	0.0123	0.0250	0.0688	0.0289	0.0127	0.183
SJ34 2	0.0014	0.0260	0.0102	0.0129	0.0078	0.0031	0.0241	0.0349	0.1438	0.0398	0.0264	0.330
SJ34 3	0.0000	0.0072	0.0030	0.0054	0.0044	0.0028	0.0190	0.0262	0.1013	0.0315	0.0141	0.215
SJ34 4	0.0000	0.0101	0.0042	0.0044	0.0033	0.0023	0.0119	0.0260	0.0915	0.0305	0.0137	0.198
Promedio	0.0004	0.0137	0.0058	0.0082	0.0054	0.0025	0.0166	0.0280	0.1013	0.0327	0.0167	0.232

Tabla 4
Análisis de Esteroles de Semilla de Tabaco Transformada con Hevea HMGR truncada y Nicotiana SMT1 (MH7)

Esteroles Totales como % de peso seco

Código muestra	esqualeno	cicloart	24mca	24mld	24elod	d7-avena	lcofuc	sito	estig	camp	col	total
MH7 53	0.0204	0.0976	0.1707	0.0473	0.0735	0.0242	0.1345	0.2483	0.0482	0.0888	0.0233	0.987
MH7 3	0.0188	0.1082	0.1649	0.0625	0.0714	0.0216	0.1254	0.2345	0.0573	0.0940	0.0175	0.972
MH7 32	0.0127	0.1004	0.1281	0.0559	0.0783	0.0288	0.1295	0.2484	0.0836	0.0863	0.0232	0.965
MH7 35	0.0144	0.0832	0.1349	0.0445	0.0639	0.0185	0.1228	0.2301	0.0515	0.0907	0.0194	0.874
MH7 54	0.0139	0.0836	0.1341	0.0401	0.0705	0.0142	0.1191	0.2253	0.0454	0.0786	0.0252	0.850
MH7 31	0.0178	0.1770	0.0449	0.0182	0.0476	0.0133	0.1080	0.1854	0.0486	0.0692	0.0245	0.755
MH7 7	0.0272	0.0302	0.0100	0.0283	0.1234	0.0104	0.1248	0.2123	0.0337	0.0674	0.0246	0.690
MH7 21	0.0182	0.0217	0.0142	0.0282	0.1089	0.0111	0.1203	0.2288	0.0346	0.0712	0.0191	0.673
MH7 28	0.0152	0.0179	0.0113	0.0245	0.1115	0.0101	0.1104	0.2414	0.0321	0.0681	0.0163	0.659
MH7 23	0.0147	0.1047	0.0248	0.0161	0.0488	0.0079	0.0873	0.1818	0.0413	0.0642	0.0320	0.635
MH7 37	0.0114	0.0549	0.0228	0.0237	0.0594	0.0080	0.1020	0.2008	0.0415	0.0757	0.0230	0.623
MH7 47	0.0268	0.0539	0.0078	0.0153	0.1037	0.0096	0.1009	0.1930	0.0312	0.0520	0.0263	0.621
MH7 40	0.0122	0.0627	0.0224	0.0186	0.0538	0.0065	0.0895	0.1889	0.0378	0.0666	0.0254	0.584
MH7 33	0.0143	0.0278	0.0108	0.0193	0.0785	0.0083	0.0958	0.1968	0.0351	0.0651	0.0208	0.573
MH7 49	0.0149	0.0648	0.0070	0.0122	0.0598	0.0087	0.1008	0.1931	0.0307	0.0586	0.0289	0.573
MH7 5	0.0190	0.0213	0.0076	0.0175	0.0797	0.0079	0.0978	0.2009	0.0317	0.0638	0.0205	0.568
MH7 24	0.0098	0.0810	0.0095	0.0135	0.0433	0.0063	0.0844	0.1698	0.0401	0.0620	0.0230	0.543
MH7 39	0.0115	0.0463	0.0091	0.0116	0.0545	0.0066	0.0780	0.1847	0.0405	0.0596	0.0217	0.524
MH7 45	0.0112	0.0550	0.0150	0.0139	0.0438	0.0050	0.0805	0.1710	0.0362	0.0584	0.0273	0.517
MH7 27	0.0124	0.0184	0.0068	0.0142	0.0735	0.0078	0.0871	0.1915	0.0299	0.0555	0.0177	0.515
MH7 48	0.0099	0.0496	0.0103	0.0115	0.0447	0.0063	0.0813	0.1692	0.0403	0.0592	0.0274	0.510
MH7 22	0.0124	0.0239	0.0078	0.0139	0.0716	0.0085	0.0834	0.1780	0.0320	0.0535	0.0217	0.505
MH7 36	0.0087	0.0205	0.0068	0.0098	0.0540	0.0061	0.0718	0.1677	0.0383	0.0578	0.0177	0.460
MH7 48	0.0097	0.0341	0.0047	0.0085	0.0453	0.0051	0.0798	0.1565	0.0333	0.0533	0.0265	0.457
MH7 4	0.0109	0.0492	0.0128	0.0101	0.0390	0.0048	0.0651	0.1549	0.0369	0.0512	0.0215	0.456
MH7 34	0.0053	0.0147	0.0054	0.0040	0.0534	0.0060	0.0867	0.1726	0.0358	0.0526	0.0158	0.432
MH7 43	0.0073	0.0369	0.0062	0.0067	0.0397	0.0045	0.0648	0.1464	0.0387	0.0480	0.0240	0.421
MH7 11	0.0081	0.0368	0.0037	0.0057	0.0327	0.0044	0.0723	0.1386	0.0362	0.0459	0.0303	0.416
MH7 38	0.0066	0.0356	0.0042	0.0051	0.0336	0.0038	0.0535	0.1363	0.0347	0.0449	0.0204	0.379

41

42

SR1 9	0.0086	0.0458	0.0055	0.0062	0.0430	0.0051	0.0675	0.1501	0.0362	0.0512	0.0255	0.445
SR1 4	0.0075	0.0460	0.0042	0.0069	0.0414	0.0047	0.0735	0.1423	0.0342	0.0468	0.0272	0.435
SR1 3	0.0087	0.0453	0.0030	0.0063	0.0404	0.0048	0.0673	0.1407	0.0316	0.0469	0.0249	0.420
SR1 2	0.0106	0.0400	0.0044	0.0049	0.0366	0.0046	0.0607	0.1485	0.0357	0.0484	0.0214	0.419
SR1 8	0.0075	0.0431	0.0053	0.0055	0.0379	0.0049	0.0626	0.1439	0.0347	0.0487	0.0232	0.417
SR1 7	0.0079	0.0400	0.0049	0.0055	0.0421	0.0045	0.0628	0.1403	0.0342	0.0480	0.0234	0.412
SR1 5	0.0065	0.0349	0.0051	0.0026	0.0385	0.0049	0.0605	0.1437	0.0311	0.0404	0.0258	0.394
SR1 10	0.0062	0.0343	0.0051	0.0042	0.0354	0.0052	0.0603	0.1421	0.0328	0.0456	0.0224	0.394
SR1 1	0.0081	0.0368	0.0048	0.0048	0.0383	0.0042	0.0620	0.1372	0.0298	0.0410	0.0258	0.393
Promedio	0.0080	0.0407	0.0047	0.0052	0.0396	0.0048	0.0641	0.1432	0.0334	0.0461	0.0244	0.414
SJ34 8	0.0091	0.0426	0.0044	0.0058	0.0393	0.0045	0.0659	0.1407	0.0307	0.0451	0.0247	0.413
SJ34 5	0.0092	0.0439	0.0040	0.0061	0.0380	0.0044	0.0625	0.1406	0.0344	0.0474	0.0223	0.413
SJ34 3	0.0081	0.0345	0.0048	0.0050	0.0366	0.0041	0.0625	0.1484	0.0357	0.0463	0.0234	0.410
SJ34 2	0.0084	0.0382	0.0048	0.0050	0.0373	0.0041	0.0592	0.1437	0.0333	0.0450	0.0225	0.401
SJ34 6	0.0079	0.0387	0.0045	0.0044	0.0375	0.0046	0.0584	0.1471	0.0353	0.0445	0.0185	0.401
SJ34 4	0.0049	0.0269	0.0027	0.0028	0.0218	0.0036	0.0414	0.1293	0.0415	0.0429	0.0160	0.334
Promedio	0.0081	0.0375	0.0042	0.0049	0.0351	0.0042	0.0583	0.1416	0.0351	0.0452	0.0212	0.395

Tabla 6
Análisis de Esteroles Libres y Fracciones de Esteres Esteroles de Muestras de Semillas Transgénicas MH7

Esteroles como % de peso seco

Muestra/ Fracción	cicloart	24mca	24mlol	24elol	d7-avena	isofuc	alto	estig	camp	col	Total
MH7 32											
Esterol Total (TS)	0.1004	0.1281	0.0559	0.0783	0.0286	0.1295	0.2484	0.0636	0.0963	0.0232	0.965
Esterol Libre (FS)	0.0097	0.0243	0.0047	0.0152	0.0019	0.0239	0.0702	0.0362	0.0261	0.0050	0.217
Ester Esterol (TS-FS)	0.0906	0.1039	0.0512	0.0631	0.0267	0.1055	0.1782	0.0274	0.0702	0.0182	0.748
MH7 63											
Esterol Total (TS)	0.0976	0.1707	0.0473	0.0735	0.0242	0.1345	0.2483	0.0482	0.0989	0.0233	0.967
Esterol Libre (FS)	0.0122	0.0307	0.0064	0.0222	0.0024	0.0300	0.0774	0.0308	0.0253	0.0044	0.242
Ester Esterol (TS-FS)	0.0854	0.1400	0.0410	0.0513	0.0218	0.1044	0.1709	0.0174	0.0735	0.0189	0.745
SR1 Control											
Esterol Total (TS)	0.0260	0.0161	0.0000	0.0237	0.0017	0.0534	0.1615	0.0366	0.0486	0.0205	0.388
Esterol Libre (FS)	0.0126	0.0032	0.0000	0.0156	0.0000	0.0181	0.0726	0.0314	0.0244	0.0060	0.185
Ester Esterol (TS-FS)	0.0134	0.0129	0.0000	0.0081	0.0017	0.0343	0.0889	0.0052	0.0241	0.0145	0.203

% FS vs. SE para componentes esteroles

Muestra/ Fracción	cicloart	24mca	24mlol	24elol	d7-avena	isofuc	alto	estig	camp	col	Total
MH7 32											
FS	9.7	18.9	8.4	19.4	6.7	18.5	28.3	56.9	27.1	21.5	22.8
SE	90.3	81.1	91.6	80.6	93.3	81.5	71.7	43.1	72.9	78.5	77.2
MH7 63											
FS	12.5	18.0	13.5	30.2	8.9	22.3	31.2	63.9	25.6	18.8	25.0
SE	87.5	82.0	86.5	69.8	90.1	77.7	68.8	36.1	74.4	81.2	75.0
SR1 control											
FS	48.6	19.9	0.0	65.9	0.0	35.8	45.0	85.7	50.3	29.1	47.6
SE	51.4	80.1	0.0	34.1	100.0	64.2	55.0	14.3	49.7	70.9	52.4

Tabla 6
Análisis de Esteroles de Semilla de Tabaco Transformada con Levadura HMGR truncada+ N. Tabacum SMT1 (MH8)

Esteroles Totales como % de peso seco

Código muestra	esqualeno	cicloart	24mca	24mlof	24eldf	d7-avena	isofuc	sito	estig	camp	col	total
MH8 16	0.0143	0.0092	0.0058	0.0070	0.0647	0.0073	0.0864	0.2106	0.0371	0.0689	0.0143	0.526
MH8 53	0.0084	0.0111	0.0081	0.0080	0.0605	0.0071	0.0876	0.1931	0.0360	0.0688	0.0162	0.505
MH8 46	0.0090	0.0243	0.0060	0.0125	0.0614	0.0065	0.0740	0.1736	0.0368	0.0587	0.0174	0.480
MH8 54	0.0089	0.0172	0.0083	0.0103	0.0567	0.0061	0.0780	0.1741	0.0398	0.0630	0.0158	0.476
MH8 58	0.0098	0.0187	0.0064	0.0093	0.0542	0.0056	0.0737	0.1783	0.0406	0.0611	0.0161	0.474
MH8 38	0.0088	0.0124	0.0077	0.0062	0.0575	0.0072	0.0749	0.1732	0.0406	0.0568	0.0167	0.472
MH8 18	0.0083	0.0129	0.0070	0.0053	0.0553	0.0068	0.0719	0.1836	0.0433	0.0599	0.0148	0.469
MH8 19	0.0081	0.0173	0.0082	0.0078	0.0533	0.0065	0.0805	0.1702	0.0348	0.0571	0.0188	0.482
MH8 32	0.0052	0.0098	0.0066	0.0055	0.0466	0.0070	0.0883	0.1699	0.0348	0.0601	0.0182	0.453
MH8 48	0.0072	0.0453	0.0056	0.0053	0.0334	0.0046	0.0838	0.1459	0.0355	0.0487	0.0260	0.421
MH8 14	0.0044	0.0284	0.0075	0.0047	0.0330	0.0058	0.0670	0.1504	0.0349	0.0454	0.0264	0.408
MH8 44	0.0065	0.0300	0.0061	0.0060	0.0328	0.0070	0.0688	0.1385	0.0348	0.0449	0.0271	0.403
MH8 40	0.0041	0.0056	0.0046	0.0037	0.0396	0.0057	0.0551	0.1608	0.0469	0.0586	0.0099	0.385
MH8 12	0.0042	0.0130	0.0048	0.0025	0.0398	0.0054	0.0500	0.1538	0.0456	0.0508	0.0163	0.386
MH8 43	0.0060	0.0340	0.0041	0.0049	0.0318	0.0041	0.0626	0.1346	0.0307	0.0430	0.0243	0.380
MH8 15	0.0044	0.0244	0.0058	0.0038	0.0282	0.0050	0.0516	0.1403	0.0414	0.0446	0.0220	0.371
MH8 11	0.0030	0.0075	0.0058	0.0018	0.0299	0.0045	0.0446	0.1510	0.0556	0.0520	0.0116	0.367
MH8 23	0.0030	0.0055	0.0081	0.0024	0.0376	0.0051	0.0491	0.1500	0.0436	0.0523	0.0104	0.365
MH8 34	0.0054	0.0299	0.0039	0.0049	0.0316	0.0040	0.0511	0.1322	0.0381	0.0455	0.0176	0.364
MH8 29	0.0024	0.0086	0.0054	0.0039	0.0280	0.0041	0.0497	0.1443	0.0468	0.0525	0.0145	0.360
MH8 33	0.0027	0.0187	0.0037	0.0025	0.0185	0.0040	0.0377	0.1175	0.0501	0.0474	0.0140	0.318
MH8 7	0.0000	0.0036	0.0047	0.0014	0.0098	0.0025	0.0208	0.0990	0.0601	0.0487	0.0088	0.257
MH8 8	0.0000	0.0020	0.0050	0.0000	0.0068	0.0019	0.0208	0.0982	0.0604	0.0492	0.0068	0.251
SR1 3	0.0085	0.0403	0.0058	0.0059	0.0365	0.0051	0.0589	0.1511	0.0461	0.0505	0.0188	0.429
SR1 2	0.0063	0.0287	0.0052	0.0040	0.0311	0.0041	0.0511	0.1448	0.0480	0.0493	0.0161	0.389
SR1 4	0.0038	0.0252	0.0051	0.0032	0.0232	0.0043	0.0516	0.1361	0.0466	0.0506	0.0213	0.371
SR1 1	0.0065	0.0312	0.0046	0.0046	0.0306	0.0039	0.0514	0.1321	0.0367	0.0432	0.0179	0.363

Promedio	0.0062	0.0313	0.0052	0.0044	0.0308	0.0043	0.0533	0.1410	0.0443	0.0484	0.0185	0.388
SJ34 13	0.0064	0.0335	0.0057	0.0056	0.0323	0.0067	0.0758	0.1482	0.0332	0.0476	0.0326	0.428
SJ34 11	0.0078	0.0282	0.0055	0.0053	0.0341	0.0048	0.0724	0.1430	0.0359	0.0470	0.0300	0.414
SJ34 18	0.0017	0.0143	0.0047	0.0020	0.0165	0.0034	0.0315	0.1088	0.0515	0.0447	0.0134	0.291
SJ34 17	0.0000	0.0038	0.0027	0.0000	0.0041	0.0021	0.0143	0.0714	0.0632	0.0431	0.0084	0.213

Tabla 7
Análisis de Esteroles de Semilla Madura de planta de Tabaco ACP - NtSint-1 #27 re-transformada con Hevea HMGR N-truncada (MH5)

Esteroles Totales como % de peso seco

Código muestra	esqualeno	cicloart	24mca	24nld	24eld	d7-avena	isofuc	sito	estig	camp	col	total
MH5/27 41	0.0168	0.1735	0.0595	0.0295	0.0589	0.0166	0.1573	0.2459	0.0446	0.0997	0.0259	0.928
MH5/27 11	0.0117	0.1647	0.0532	0.0233	0.0541	0.0125	0.1591	0.2332	0.0446	0.0839	0.0256	0.866
MH5/27 25	0.0096	0.1257	0.0533	0.0256	0.0626	0.0165	0.1424	0.2343	0.0405	0.0862	0.0205	0.817
MH5/27 60	0.0132	0.1150	0.0440	0.0254	0.0660	0.0168	0.1403	0.2414	0.0381	0.0806	0.0229	0.804
MH5/27 2	0.0138	0.1037	0.0405	0.0245	0.0651	0.0136	0.1544	0.2381	0.0385	0.0857	0.0224	0.800
MH5/27 17	0.0114	0.1147	0.0435	0.0251	0.0537	0.0199	0.1303	0.2267	0.0436	0.0778	0.0229	0.769
MH5/27 44	0.0113	0.1178	0.0450	0.0256	0.0573	0.0134	0.1404	0.2116	0.0344	0.0743	0.0224	0.753
MH5/27 31	0.0067	0.0972	0.0435	0.0243	0.0543	0.0176	0.1316	0.2297	0.0419	0.0799	0.0177	0.744
MH5/27 27	0.0131	0.0736	0.0306	0.0239	0.0598	0.0164	0.1291	0.2350	0.0379	0.0804	0.0211	0.721
MH5/27 58	0.0131	0.0689	0.0370	0.0236	0.0595	0.0065	0.1253	0.2321	0.0397	0.0836	0.0212	0.710
MH5/27 39	0.0179	0.0485	0.0108	0.0206	0.0899	0.0114	0.1213	0.2539	0.0374	0.0762	0.0170	0.705
MH5/27 42	0.0056	0.0805	0.0382	0.0223	0.0477	0.0091	0.1208	0.2187	0.0444	0.0791	0.0188	0.685
MH5/27 10	0.0117	0.0665	0.0339	0.0179	0.0475	0.0104	0.1046	0.1959	0.0322	0.0662	0.0231	0.610
MH5/27 28	0.0099	0.0359	0.0100	0.0127	0.0623	0.0092	0.1047	0.2270	0.0360	0.0680	0.0175	0.593
MH5/27 53	0.0113	0.0404	0.0097	0.0156	0.0616	0.0043	0.1060	0.2174	0.0346	0.0677	0.0181	0.587
MH5/27 55	0.0098	0.0305	0.0050	0.0133	0.0543	0.0022	0.1063	0.2120	0.0372	0.0779	0.0159	0.564
MH5/27 57	0.0081	0.0305	0.0048	0.0112	0.0559	0.0029	0.0992	0.2093	0.0341	0.0710	0.0173	0.544
MH5/27 38	0.0098	0.0323	0.0049	0.0131	0.0501	0.0019	0.0935	0.2069	0.0356	0.0688	0.0168	0.534
MH5/27 3	0.0095	0.0247	0.0057	0.0093	0.0517	0.0041	0.0924	0.2072	0.0336	0.0652	0.0153	0.519
MH5/27 48	0.0094	0.0323	0.0039	0.0063	0.0557	0.0024	0.0891	0.1979	0.0353	0.0657	0.0183	0.516
MH5/27 30	0.0080	0.0241	0.0051	0.0068	0.0455	0.0076	0.0926	0.1957	0.0331	0.0687	0.0164	0.504
MH5/27 40	0.0110	0.0237	0.0042	0.0061	0.0499	0.0087	0.0886	0.1985	0.0323	0.0624	0.0176	0.503
MH5/27 7	0.0074	0.0220	0.0038	0.0095	0.0406	0.0033	0.0951	0.1862	0.0365	0.0626	0.0177	0.484
MH5/27 5	0.0080	0.0269	0.0047	0.0054	0.0470	0.0019	0.0805	0.1930	0.0355	0.0606	0.0171	0.480

SJ34/27 15	0.0094	0.0174	0.0033	0.0074	0.0588	0.0018	0.1087	0.2200	0.0347	0.0834	0.0152	0.560
SJ34/27 11	0.0082	0.0171	0.0041	0.0066	0.0582	0.0029	0.0989	0.2186	0.0348	0.0772	0.0140	0.541
SJ34/27 4	0.0086	0.0181	0.0033	0.0122	0.0559	0.0024	0.1010	0.2107	0.0339	0.0778	0.0140	0.538
SJ34/27 14	0.0098	0.0170	0.0034	0.0056	0.0532	0.0017	0.1045	0.2134	0.0327	0.0727	0.0141	0.528
SJ34/27 6	0.0088	0.0150	0.0034	0.0060	0.0511	0.0020	0.0976	0.2037	0.0306	0.0724	0.0146	0.505
SJ34/27 12	0.0085	0.0211	0.0041	0.0053	0.0526	0.0021	0.0924	0.2027	0.0317	0.0670	0.0146	0.502
SJ34/27 13	0.0084	0.0237	0.0029	0.0057	0.0474	0.0032	0.0897	0.1876	0.0366	0.0685	0.0200	0.494
SJ34/27 2	0.0079	0.0249	0.0027	0.0056	0.0437	0.0027	0.0890	0.1749	0.0331	0.0600	0.0231	0.468
SJ34/27 9	0.0078	0.0191	0.0039	0.0053	0.0416	0.0028	0.0909	0.1790	0.0323	0.0635	0.0189	0.465
SJ34/27 8	0.0057	0.0154	0.0030	0.0048	0.0367	0.0013	0.0769	0.1586	0.0310	0.0567	0.0187	0.409
NH19/27 2	0.0104	0.0195	0.0046	0.0125	0.0580	0.0016	0.1085	0.2109	0.0345	0.0785	0.0156	0.555
NH19/27 1	0.0095	0.0256	0.0041	0.0118	0.0564	0.0017	0.1055	0.2085	0.0346	0.0721	0.0168	0.547
NH19/27 4	0.0093	0.0352	0.0029	0.0098	0.0427	0.0022	0.0835	0.1711	0.0339	0.0569	0.0223	0.470
NH19/27 5	0.0058	0.0114	0.0021	0.0036	0.0285	0.0015	0.0641	0.1776	0.0429	0.0629	0.0127	0.413
SR1 3	0.0075	0.0383	0.0035	0.0089	0.0403	0.0022	0.0726	0.1554	0.0360	0.0513	0.0246	0.441
SR1 5	0.0083	0.0322	0.0037	0.0084	0.0379	0.0029	0.0714	0.1643	0.0351	0.0516	0.0218	0.438
SR1 4	0.0078	0.0422	0.0039	0.0086	0.0409	0.0017	0.0724	0.1534	0.0331	0.0474	0.0240	0.435
SR1 2	0.0086	0.0252	0.0042	0.0063	0.0341	0.0050	0.0652	0.1352	0.0295	0.0423	0.0240	0.380
SR1 1	0.0072	0.0259	0.0038	0.0037	0.0364	0.0056	0.0614	0.1380	0.0300	0.0405	0.0224	0.375
Promedio	0.0079	0.0327	0.0038	0.0072	0.0379	0.0035	0.0686	0.1493	0.0327	0.0466	0.0234	0.414

Desviación Estandar para Estand total SR1 =
0.030

27

Tabla 8
Análisis de Esteroles de Semilla Madura de planta de Tabaco ACP - N8mt-1 #27 re-transformada con Hevea HMGR ACP-N-truncada (MH16)

Esteroles Totales como % de peso seco

Código muestra	esqualeno	cicloart	24mca	24mldf	24aldf	d7-avena	iso-fuc	sito	estig	camp	col	total
MH15/27 39	0.0099	0.0531	0.0088	0.0249	0.0862	0.0040	0.1768	0.3299	0.0437	0.1113	0.0164	0.865
MH15/27 28	0.0112	0.0358	0.0079	0.0166	0.1025	0.0038	0.1545	0.3200	0.0377	0.0914	0.0153	0.797
MH15/27 8	0.0100	0.0394	0.0064	0.0152	0.1092	0.0057	0.1494	0.3036	0.0369	0.0838	0.0196	0.779
MH15/27 38	0.0097	0.0400	0.0059	0.0180	0.0979	0.0028	0.1482	0.2868	0.0340	0.0902	0.0182	0.752
MH15/27 3	0.0084	0.0327	0.0065	0.0167	0.0870	0.0029	0.1401	0.3066	0.0381	0.0940	0.0157	0.749
MH15/27 21	0.0088	0.0209	0.0060	0.0180	0.0706	0.0020	0.1262	0.2781	0.0428	0.1059	0.0134	0.693
MH15/27 34	0.0095	0.0261	0.0051	0.0169	0.0731	0.0020	0.1418	0.2681	0.0405	0.0911	0.0144	0.689
MH15/27 15	0.0087	0.0228	0.0056	0.0147	0.0717	0.0028	0.1343	0.2766	0.0404	0.0943	0.0160	0.688
MH15/27 51	0.0086	0.0285	0.0066	0.0169	0.0734	0.0023	0.1441	0.2660	0.0362	0.0889	0.0164	0.688
MH15/27 23	0.0093	0.0272	0.0060	0.0145	0.0708	0.0034	0.1263	0.2739	0.0380	0.0901	0.0154	0.675
MH15/27 9	0.0102	0.0272	0.0046	0.0166	0.0763	0.0020	0.1293	0.2649	0.0353	0.0869	0.0164	0.670
MH15/27 53	0.0094	0.0242	0.0048	0.0140	0.0681	0.0033	0.1390	0.2635	0.0359	0.0810	0.0172	0.660
MH15/27 12	0.0082	0.0245	0.0044	0.0134	0.0681	0.0021	0.1271	0.2615	0.0414	0.0903	0.0175	0.658
MH15/27 59	0.0096	0.0274	0.0057	0.0134	0.0684	0.0031	0.1092	0.2751	0.0428	0.0875	0.0146	0.657
MH15/27 47	0.0083	0.0279	0.0056	0.0135	0.0669	0.0027	0.1187	0.2664	0.0360	0.0843	0.0145	0.645
MH15/27 43	0.0087	0.0251	0.0051	0.0123	0.0667	0.0028	0.1230	0.2562	0.0396	0.0797	0.0147	0.634
MH15/27 42	0.0100	0.0212	0.0039	0.0129	0.0587	0.0025	0.1249	0.2690	0.0392	0.0787	0.0127	0.634
MH15/27 22	0.0094	0.0280	0.0045	0.0138	0.0672	0.0030	0.1137	0.2593	0.0355	0.0824	0.0151	0.632
MH15/27 29	0.0075	0.0170	0.0033	0.0114	0.0649	0.0030	0.1027	0.2801	0.0449	0.0818	0.0127	0.629
MH15/27 4	0.0080	0.0227	0.0048	0.0139	0.0674	0.0032	0.1242	0.2342	0.0353	0.0886	0.0141	0.617
MH15/27 16	0.0082	0.0236	0.0044	0.0134	0.0666	0.0016	0.1320	0.2197	0.0373	0.0865	0.0157	0.609
MH15/27 14	0.0090	0.0275	0.0051	0.0137	0.0686	0.0024	0.1100	0.2274	0.0391	0.0814	0.0162	0.600
MH15/27 17	0.0084	0.0221	0.0047	0.0134	0.0620	0.0021	0.1146	0.2205	0.0371	0.0844	0.0158	0.585
MH15/27 20	0.0062	0.0217	0.0038	0.0116	0.0419	0.0023	0.1289	0.2357	0.0350	0.0785	0.0131	0.579
MH15/27 33	0.0065	0.0182	0.0027	0.0106	0.0532	0.0016	0.0908	0.2132	0.0450	0.0766	0.0134	0.532
MH15/27 31	0.0059	0.0173	0.0044	0.0094	0.0464	0.0032	0.1085	0.2091	0.0353	0.0747	0.0130	0.527
MH15/27 41	0.0081	0.0168	0.0029	0.0100	0.0525	0.0066	0.0861	0.2123	0.0463	0.0693	0.0147	0.526

5A

MH15/27 10	0.0061	0.0302	0.0035	0.0089	0.0402	0.0071	0.0656	0.1697	0.0404	0.0526	0.0211	0.445
MH15/27 40	0.0072	0.0309	0.0036	0.0086	0.0393	0.0022	0.0656	0.1675	0.0374	0.0520	0.0189	0.433
MH15/27 56	0.0077	0.0261	0.0029	0.0087	0.0366	0.0047	0.0675	0.1716	0.0353	0.0507	0.0184	0.430
NH19/27 4	0.0080	0.0197	0.0063	0.0126	0.0645	0.0024	0.1226	0.2230	0.0364	0.0863	0.0136	0.595
NH19/27 2	0.0081	0.0209	0.0063	0.0143	0.0663	0.0033	0.1056	0.2249	0.0369	0.0884	0.0128	0.588
NH19/27 3	0.0079	0.0161	0.0074	0.0114	0.0633	0.0025	0.1126	0.2273	0.0391	0.0840	0.0119	0.584
NH19/27 5	0.0089	0.0232	0.0066	0.0143	0.0569	0.0020	0.1045	0.2114	0.0329	0.0791	0.0135	0.553
NH19/27 1	0.0086	0.0221	0.0048	0.0123	0.0490	0.0020	0.1000	0.1895	0.0308	0.0713	0.0143	0.505
SJ34/27 1	0.0095	0.0224	0.0052	0.0157	0.0603	0.0025	0.1088	0.2161	0.0341	0.0827	0.0156	0.573
SJ34/27 9	0.0090	0.0227	0.0039	0.0129	0.0594	0.0014	0.1035	0.2136	0.0339	0.0758	0.0152	0.551
SJ34/27 13	0.0078	0.0191	0.0058	0.0115	0.0565	0.0024	0.1132	0.2004	0.0351	0.0789	0.0143	0.545
SJ34/27 11	0.0086	0.0178	0.0031	0.0099	0.0507	0.0026	0.0878	0.2070	0.0391	0.0697	0.0130	0.509
SR1 4	0.0069	0.0320	0.0018	0.0097	0.0373	0.0029	0.0699	0.1561	0.0406	0.0542	0.0208	0.432
SR1 5	0.0073	0.0346	0.0037	0.0087	0.0424	0.0036	0.0690	0.1507	0.0307	0.0463	0.0232	0.420
SR1 1	0.0055	0.0237	0.0028	0.0063	0.0327	0.0035	0.0551	0.1443	0.0342	0.0441	0.0185	0.371
SR1 2	0.0071	0.0206	0.0031	0.0031	0.0323	0.0031	0.0516	0.1381	0.0323	0.0408	0.0173	0.349
Promedio	0.0067	0.0277	0.0029	0.0069	0.0362	0.0033	0.0614	0.1473	0.0345	0.0463	0.0200	0.393

Desviación Estandar para Esterol total SR1 = 0.34

49

5B

Tabla 2
Análisis de Esteroides de Semilla Madura de planta de Tabaco ACP - NtSmt-1 #27 re-transformada con ACP-Hevea t-HMGR 1.4 kb (NH61)

Esteroides Totales como % de peso seco

Código muestra	eequaleno	cicloart	24mca	24mlcf	24eldf	d7-avena	isofuc	sito	estig	camp	col	total
NH61/27 11	0.0475	0.1054	0.0203	0.0689	0.2642	0.0245	0.2123	0.3423	0.0446	0.1186	0.0151	1.264
NH61/27 16	0.0517	0.1009	0.0154	0.0555	0.2246	0.0206	0.2036	0.3287	0.0423	0.1086	0.0184	1.170
NH61/27 12	0.0537	0.0968	0.0175	0.0572	0.2204	0.0216	0.2010	0.3310	0.0448	0.1099	0.0152	1.169
NH61/27 17	0.0367	0.1032	0.0172	0.0642	0.2179	0.0230	0.1795	0.3386	0.0548	0.1130	0.0160	1.164
NH61/27 38	0.0381	0.0955	0.0142	0.0602	0.2085	0.0188	0.1744	0.3129	0.0412	0.0989	0.0163	1.079
NH61/27 31	0.0366	0.0887	0.0151	0.0492	0.1914	0.0209	0.1817	0.3285	0.0407	0.1017	0.0172	1.072
NH61/27 9	0.0360	0.1020	0.0113	0.0462	0.1843	0.0183	0.1769	0.3123	0.0406	0.0867	0.0228	1.037
NH61/27 1	0.0228	0.0676	0.0105	0.0397	0.1595	0.0146	0.1672	0.3287	0.0477	0.0932	0.0169	0.968
NH61/27 15	0.0292	0.0719	0.0082	0.0378	0.1555	0.0137	0.1836	0.3148	0.0356	0.0912	0.0185	0.960
NH61/27 24	0.0253	0.0682	0.0088	0.0360	0.1378	0.0137	0.1642	0.3240	0.0411	0.0956	0.0178	0.932
NH61/27 29	0.0240	0.0679	0.0099	0.0394	0.1444	0.0147	0.1654	0.3111	0.0390	0.0950	0.0161	0.927
NH61/27 27	0.0282	0.0715	0.0116	0.0388	0.1541	0.0168	0.1635	0.2855	0.0399	0.0962	0.0147	0.921
NH61/27 10	0.0268	0.0692	0.0106	0.0383	0.1633	0.0174	0.1658	0.2897	0.0373	0.0826	0.0172	0.918
NH61/27 37	0.0289	0.0632	0.0100	0.0371	0.1485	0.0148	0.1595	0.2978	0.0415	0.0948	0.0170	0.913
NH61/27 19	0.0203	0.0540	0.0093	0.0327	0.1388	0.0127	0.1399	0.3062	0.0453	0.0878	0.0145	0.861
NH61/27 21	0.0090	0.0286	0.0042	0.0157	0.0613	0.0077	0.1070	0.2187	0.0381	0.0811	0.0156	0.587
NH61/27 32	0.0094	0.0217	0.0037	0.0131	0.0580	0.0080	0.1037	0.2249	0.0377	0.0844	0.0125	0.577
NH61/27 33	0.0091	0.0279	0.0031	0.0135	0.0522	0.0062	0.1035	0.2099	0.0361	0.0773	0.0153	0.554
NH61/27 14	0.0094	0.0268	0.0037	0.0137	0.0582	0.0066	0.0914	0.1975	0.0343	0.0680	0.0136	0.523
NH61/27 7	0.0070	0.0339	0.0028	0.0099	0.0496	0.0062	0.0820	0.1939	0.0343	0.0589	0.0188	0.497
SR1 4	0.0084	0.0440	0.0023	0.0093	0.0461	0.0060	0.0767	0.1565	0.0339	0.0497	0.0261	0.459
SR1 5	0.0067	0.0427	0.0020	0.0092	0.0408	0.0061	0.0724	0.1452	0.0368	0.0521	0.0239	0.438
SR1 7	0.0082	0.0370	0.0019	0.0082	0.0380	0.0054	0.0706	0.1401	0.0324	0.0462	0.0230	0.411
SR1 10	0.0052	0.0392	0.0020	0.0079	0.0318	0.0056	0.0642	0.1431	0.0373	0.0504	0.0226	0.409
SR1 2	0.0066	0.0358	0.0015	0.0070	0.0362	0.0051	0.0663	0.1333	0.0312	0.0430	0.0226	0.389
Promedio	0.0070	0.0398	0.0020	0.0083	0.0386	0.0056	0.0700	0.1436	0.0343	0.0483	0.0237	0.421

55

56

NH19/27 3 0.0084 0.0238 0.0027 0.0086 0.0487 0.0059 0.0868 0.1941 0.0430 0.0688 0.0163 0.507
NH19/27 1 0.0076 0.0257 0.0030 0.0111 0.0469 0.0058 0.0855 0.1894 0.0428 0.0671 0.0151 0.500
NH19/27 7 0.0087 0.0192 0.0021 0.0085 0.0436 0.0051 0.0821 0.1922 0.0427 0.0717 0.0135 0.489
NH19/27 6 0.0041 0.0125 0.0012 0.0054 0.0212 0.0032 0.0498 0.1646 0.0503 0.0617 0.0104 0.385

Tabla 10
Análisis de Esteroides de Semilla Madura de *Brassica napus* transformada con Hevea HMGR N-truncada y *N. Tabacum* SMT1 (MH7)

Esteroides Totales como % de peso seco

Código Muestra	esqualeno	cicloart	24mca	24mlcf	24elcf	d7-avena	isofuc	sito	estig	camp	brasilca esterol	col	total
MH7 11a	0.0024	0.0073	0.0035	0.0244	0.0033	0.0015	0.0028	0.2219	0.0022	0.0791	0.0233	0.0020	0.374
MH7 170	0.0024	0.0050	0.0000	0.0042	0.0000	0.0000	0.0024	0.2185	0.0023	0.0951	0.0270	0.0029	0.360
MH7 15a	0.0019	0.0039	0.0000	0.0054	0.0000	0.0000	0.0013	0.1683	0.0016	0.0717	0.0289	0.0014	0.284
MH7 14a	0.0022	0.0041	0.0000	0.0087	0.0000	0.0000	0.0018	0.1714	0.0028	0.0590	0.0238	0.0031	0.277
Control	0.0031	0.0052	0.0034	0.0177	0.0027	0.0000	0.0021	0.1327	0.0036	0.0475	0.0230	0.0017	0.243

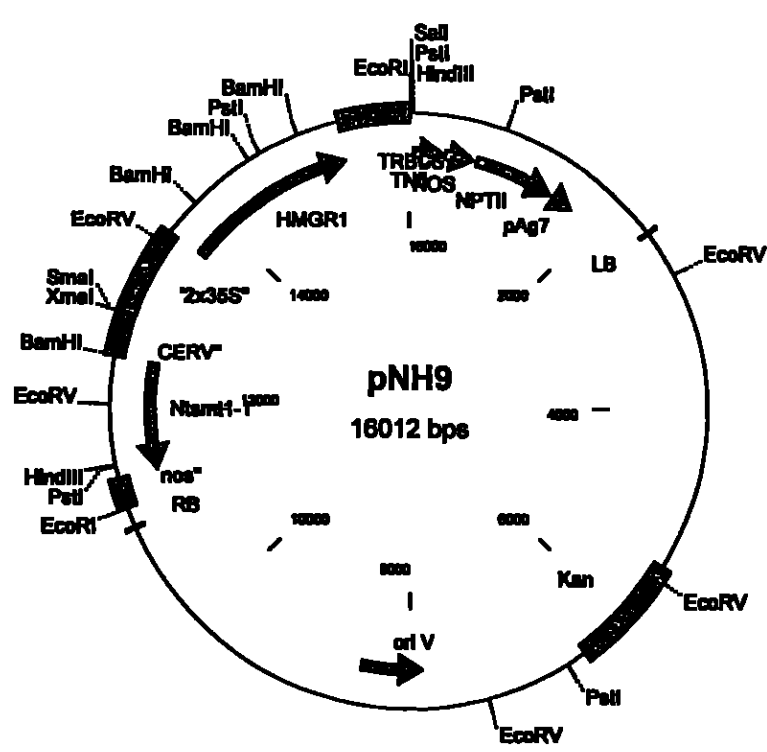


Figura 1

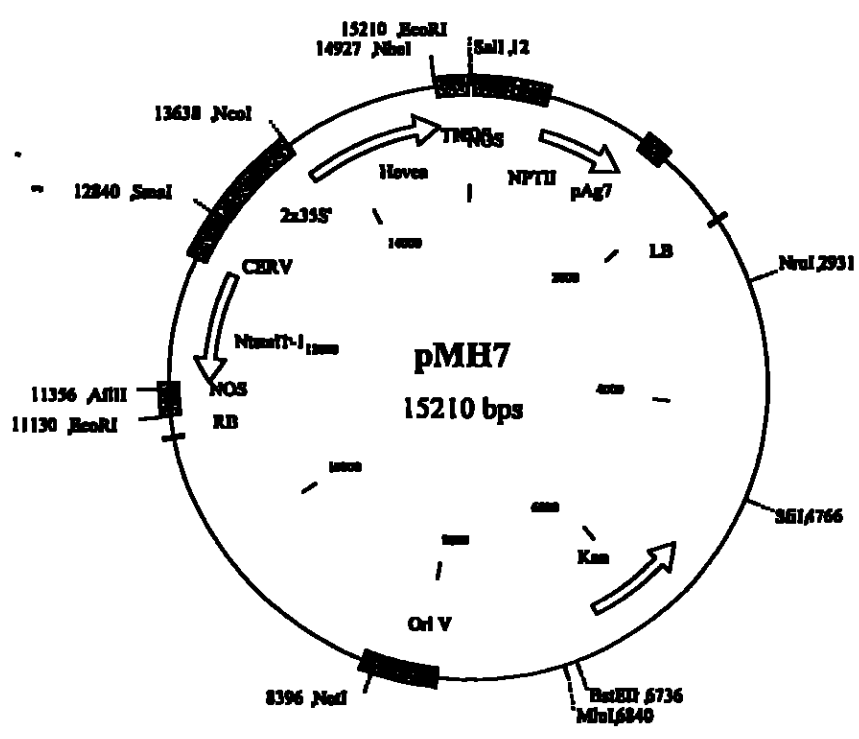


Figura 2

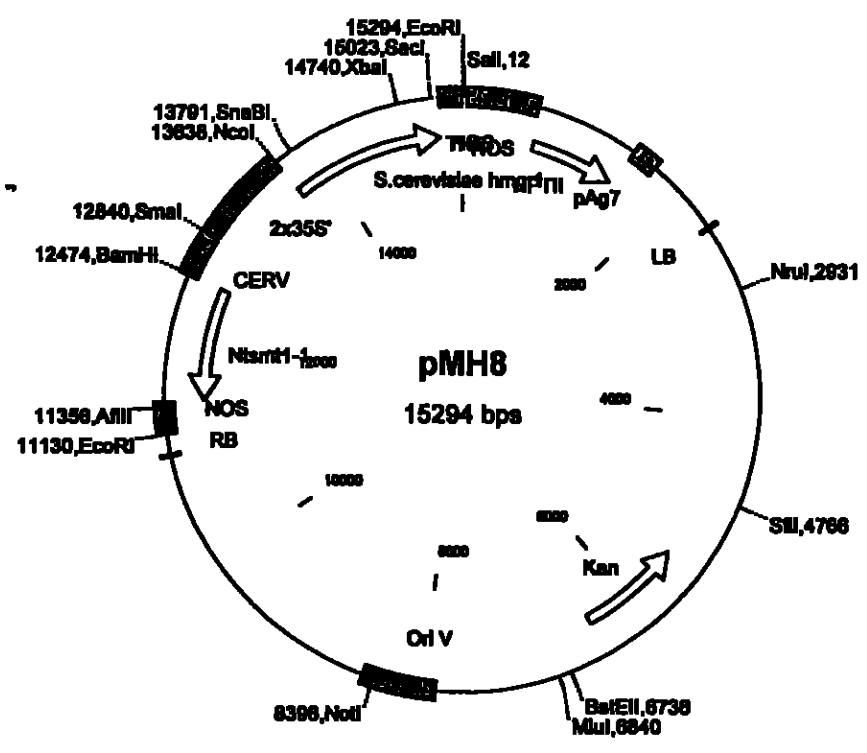


Figura 3

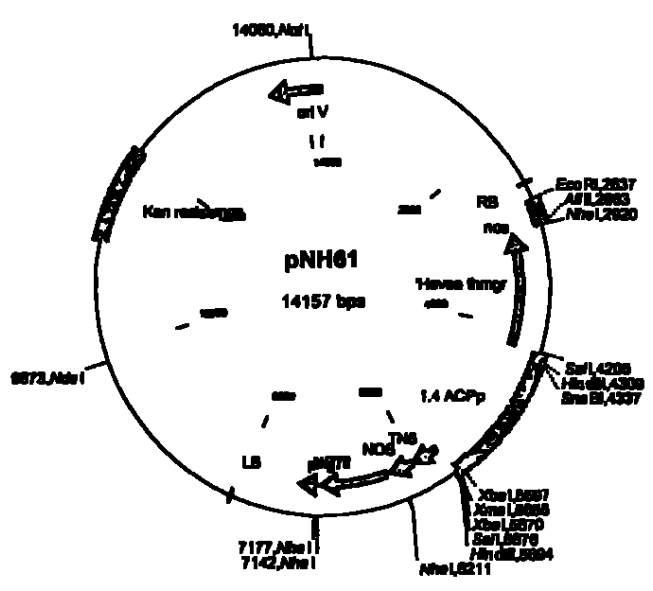


Figura 4. Vector Binario pNH61

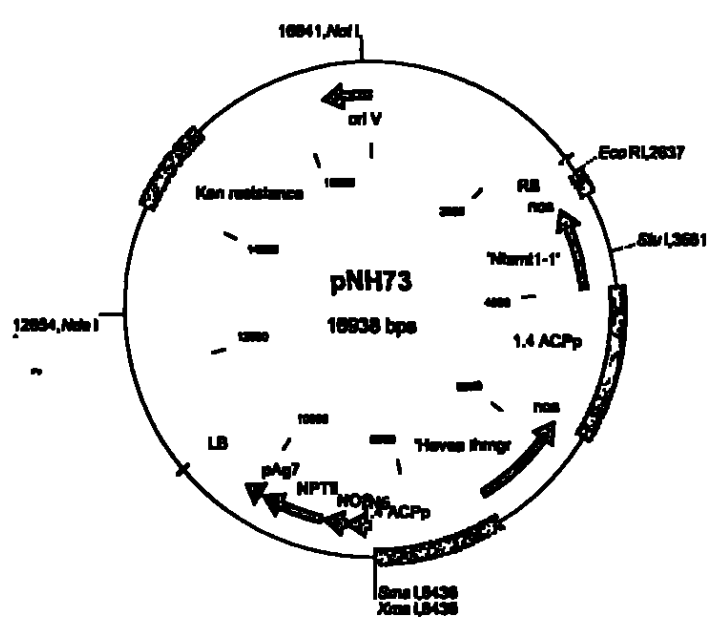


Figura 5. Vector Binario pNH73

Fotos 64 y 65
unidas



63 66

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

Radicacion : 01100340 00000000 Folios: 65
Fecha (AMD): 2001-11-22 15:24:59
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [✓]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente 41 ✓
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud 11 ✓
- Descripción de la invención 71 ✓
- Dibujos de ser estos pertinentes []
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas 24314 ✓

COMPLETA [✓] INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA [] INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA [] INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 01-100340

Fecha: 11 de diciembre de 2001

Se certifica que:

Desde fecha 25 de abril de 1990,
del folio 60830 al folio 60835
del libro de Protocolo N° 202, obra el poder
N° 12817 conferido por UNILEVER N.V.

domiciliado(a) en Rotterdam, Holanda

al doctor JOSE LLORED CAMACHO Y/O ALFONSO
LLORED CAMACHO Y/O JOSE ANTONIO LLORED

Representante Bogotá: los mismos

Facultad para desistir SI

Revisado 202027.

Folio 06

2020
Bogotá, D. C.

Doctor
JOSE ANTONIO LLOREDA
Representante o Apoderado

Oficio No. **08719**

REFERENCIA: Radicación 01-100340
 Trámite 002
 Evento 001
 Actuación 430
 Folios 001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, en concordancia con el artículo 85 de la misma decisión, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

21 FEB. 2002

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que las expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027