LÍPIDO QUE COMPRENDE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un lípido que comprende ácido docosahexaenoico y/o ácido docosapentaenoico, obtenido de células vegetales o células microbianas, y procesos para la producción y uso del lípido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (LC-PUFA) son actualmente reconocidos ampliamente como compuestos importantes para la salud humana y animal. Estos ácidos grasos pueden obtenerse de fuentes como la dieta o por conversión de ácidos grasos linoleico (LA, 18:2ω6) o α-linolénico (ALA, 18:3ω3), ambos considerados como ácidos grasos esenciales en la dieta humana. Si bien los humanos y muchos otros animales vertebrados tiene la capacidad de convertir LA o ALA, obtenidos de fuentes vegetales a C22, esta conversión la llevan a cabo a una velocidad muy baja. Adicionalmente, las sociedades más modernas tienen dietas no balanceadas en las cuales por lo menos el 90% de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) es de los ácidos grasos ω6, en lugar de la relación 4:1 o menor para ácidos grasos ω6:ω3, que es considerada la ideal (Trautwein, 2001). La fuente inmediata de LC-PUFA de la dieta tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5ω3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6ω3) para humanos, principalmente es a partir de pescado o aceite de pescado. Por lo tanto, los profesionales de la salud han recomendado la inclusión regular de pescado que contenga niveles significativos de LC-PUFA en la dieta humana. Los aceites con LC-PUFA derivados de pescados están siendo incorporados cada vez más en productos alimenticios y en fórmulas infantiles, por ejemplo. Sin embargo, debido a una disminución en la industria pesquera global y nacional, se requieren fuentes alternativas de estos aceites que mejoran la salud

beneficiosamente.

Las plantas que florecen, al contrario de los animales, carecen de la capacidad para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados con cadenas largas mayores a 18 carbonos. En particular, las plantas de cultivo y horticultura junto con otros angiospermas no tienen las enzimas que se necesitan para sintetizar los ácidos grasos ω3 de cadenas más largas tales como EPA, ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5ω3) y DHA que derivan de ALA. Por lo tanto, un objetivo importante en la biotecnología vegetal es el diseño de plantas para cultivo que produzcan cantidades sustanciales de LC-PUFA, proveyendo de este modo una fuente alternativa de estos compuestos.

Vías de biosíntesis de LC-PUFA

La biosíntesis de LC-PUFA en organismos tales como microalgas, musgos y hongos usualmente ocurre como una serie de reacciones de desaturación y elongación dependiente de oxígeno (Figura 1). La vía más común que produce EPA en estos organismos incluye una Δ6-desaturación, Δ6-elongación y Δ5-desaturación (llamada la vía de Δ6-desaturación) mientras que una vía menos común usa una Δ9-elongación, Δ8-desaturación y Δ5-desaturación (llamada la vía de Δ9-desaturación). Estas reacciones consecutivas de desaturación y elongación pueden comenzar con el sustrato ácido graso ω6 LA, mostrado esquemáticamente como la parte izquierda superior en la Figura 1 (ω6) o el sustrato ω3 ALA a través de EPA, mostrado como la parte derecha inferior de la Figura 1 (ω3). Si la Δ6-desaturación inicial se lleva a cabo sobre el sustrato ω6 LA, el producto LC-PUFA de la serie de tres enzimas será el ácido graso ω6 ARA. Los organismos que sintetizan LC-PUFA pueden convertir los ácidos grasos ω6 a ácidos grasos ω3 usando una ω3-desaturasa, como se muestra en el paso de la Δ17-desaturasa en la Figura 1 para la conversión de ácido araquidónico (ARA, 20:4ω6) a EPA. Algunos miembros de la familia de ω3-desaturasa pueden actuar en una variedad de sustratos que varían en un rango entre LA y ARA.

Las ω3-desaturasas vegetales con frecuencia catalizan específicamente la Δ15-desaturación de LA a ALA, mientras que las ω3-desaturasas de hongos y levaduras pueden ser específicas por la Δ17-desaturación de ARA a EPA (Pereira y col., 2004a; Zank y col., 2005). Algunos informes sugieren que pueden existir ω3-desaturasas no específicas que pueden convertir una amplia variedad de sustratos ω6 a sus correspondientes productos ω3 (Zhang y col., 2008).

La conversión de EPA a DHA en estos organismos se produce por una Δ5-elongación de EPA para producir DPA, seguido por una Δ4-desaturación para producir DHA (Figura 1). Por el contrario, los mamíferos usan la vía llamada “Sprecher” que convierte DPA a DHA por tres reacciones separadas que son independientes de una Δ4-desaturasa (Sprecher y col., 1995).

Las desaturasas terminales que se encuentran generalmente en plantas, musgos, microalgas, y animales inferiores tales como *Caenorhabditis elegans* aceptan predominantemente sustratos de ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 de un sustrato fosfatidilcolina (PC). Por ello, estas desaturasas son conocidas como acil-PC desaturasas terminales, ligadas a lípido (Domergue y col., 2003). Por el contrario, las desaturasas terminales de animales superiores generalmente aceptan sustratos acil-CoA en donde el sustrato ácido graso esta unido a CoA en lugar de PC (Domergue y col., 2005). Se sabe que algunas desaturasas de microalgas y una desaturasa vegetal usan sustratos de ácido graso esterificado a CoA (Tabla 2).

Cada reacción de elongación de PUFA consiste en cuatro pasos catalizados por un complejo proteico multicomponente: primero, una reacción de condensación da como resultado la adición de una unidad de 2C de malonil-CoA al ácido graso, dando la formación de un intermediario β-cetoacilo. Este es reducido luego por NADPH, seguido por deshidratación para dar un intermediario enoilo. Este intermediario finalmente es reducido una segunda vez para producir el ácido graso elongado. En

general se piensa que el paso de condensación de estas cuatro reacciones es específico de sustrato mientras que los otros pasos no lo son. En la práctica, esto significa que la maquinaria de elongación natural de la planta tiene la capacidad de elongar PUFA con la condición que se provea la enzima de condensación (típicamente llamada una "elongasa") específica del PUFA, a pesar de que la eficacia de la maquinaria de elongación natural de la planta para elongar sustratos PUFA no naturales puede ser baja. En 2007 se publicó la identificación y caracterización de la deshidratasa del ciclo de elongación en levaduras (Denic y Weissman, 2007).

La desaturación de PUFA en plantas, musgos y microalgas se produce naturalmente sobre sustratos ácidos grasos predominantemente en el conjunto de acil-PC mientras que la elongación se produce sobre sustratos en el conjunto de acil-CoA. La transferencia de ácidos grasos de moléculas de acil-PC a un transportador CoA se lleva a cabo por fosfolipasas (PLA) mientras que la transferencia de ácidos grasos acil-CoA a un transportador PC se lleva a cabo por las lisofosfatidil-colina aciltransferasas (LPCAT) (Figura 9) (Singh y col., 2005).

Producción diseñada de LC-PUFA

La mayor parte del diseño metabólico de LC-PUFA ha sido realizado con el uso de la vía aeróbica de Δ6-desaturación/elongación. La biosíntesis de ácido γ-linolénico (GLA, 18:3ω6) en tabaco se informó inicialmente en 1996 usando una Δ6-desaturasa de la cianobacteria *Synechocystis* (Reddy y Thomas, 1996). Más recientemente, se ha producido GLA en plantas para cultivo tales como cártamo (73% de GLA en aceite de semilla, WO 2006/127789) y soja (28% de GLA; Sato y col., 2004). La producción de LC-PUFA tales como EPA y DHA involucra un diseño más complicado debido al número en aumento de pasos de desaturación y elongación involucrados. La producción de EPA en una planta terrestre fue informado por primera vez por Qi y col. (2004) que introdujeron genes que codifican para una Δ9-elongasa de *Isochrysis*

galbana, una Δ8-desaturasa de *Euglena gracilis* y una Δ5-desaturasa de *Mortierella alpina* en *Arabidopsis* dando como resultado hasta un 3% de EPA. Este trabajo fue continuado por Abbadi y col. (2004) que informaron la producción de hasta 0,8% de EPA en semillas de lino usando genes que codifican para una Δ6-desaturasa y Δ6-elongasa de *Physcomitrella patens* y una Δ5-desaturasa de *Phaeodactylum tricornutum*.

Este primer informe de producción de DHA fue en WO 04/017467 en donde se describe la producción de 3% de DHA en embriones de soja, pero no semillas, por introducción de genes que codifican para la Δ6-desaturasa de *Saprolegnia diclina*, Δ6-desaturasa de *Mortierella alpina*, Δ5-desaturasa de *Mortierella alpina*, Δ4-desaturasa de *Saprolegnia diclina*, Δ17-desaturasa de *Saprolegnia diclina*, Δ6-elongasa de *Mortierella alpina* y Δ5-elongasa de *Pavlova lutheri*. El nivel máximo de EPA en embriones también produciendo DHA fue 19,6%, indicando que la eficacia de conversión de EPA a DHA fue pobre (WO 2004/071467). Este hallazgo fue similar al publicado por Robert y col. (2005), en donde el flujo de EPA a DHA fue bajo, con la producción de 3% de EPA y 0,5% de DHA en *Arabidopsis* usando la Δ5/6-desaturasa de *Danio rerio*, la Δ6-elongasa de *Caenorhabditis elegans*, y la Δ5-elongasa y Δ4-desaturasa de *Pavlova salina*. También en 2005, Wu y col. publicaron la producción de 25% de ARA, 15% de EPA, y 1,5% de DHA en *Brassica juncea* usando la Δ6-desaturasa de *Pythium irregulare*, una Δ5-desaturasa de *Thraustochytrid*, la Δ6-elongasa de *Physcomitrella patens*, la Δ12-desaturasa de *Calendula officianalis*, una Δ5-elongasa de *Thraustochytrid*, la Δ17-desaturasa de *Phytophthora infestans*, la LC-PUFA elongasa *de Oncorhyncus mykiss*, una Δ4-desaturasa de *Thraustochytrid* y una LPCAT de *Thraustochytrid* (Wu y col., 2005). En Venegas-Caleron y col. (2010) y Ruiz-Lopez y col. (2012) se provee un resumen de los esfuerzos para producir cultivos de semillas oleaginosas que sinteticen LC-PUFA ω3. Como se indica en Ruiz-Lopez y col.

(2012), los resultados obtenidos hasta la actualidad para la producción de DHA en plantas transgénicas no han sido siquiera cercanos a los niveles observados en los aceites de pescado. Más recientemente, Petrie y col. (2012) informaron la producción de aproximadamente 15% de DHA en semillas de *Arabidopsis thaliana*, y en WO2013/185184 se informó la producción de ciertos aceites de semillas que tienen entre 7% y 20% de DHA. Sin embargo, no hay informes de la producción de aceites vegetales que tengan más de 20% de DHA.

No hay informes de la producción de DPA en células recombinantes en niveles significativos sin la producción concomitante de DHA. De hecho, los inventores de la presente no están al tanto de ninguna sugerencia o motivación publicada para producir DPA en células recombinantes sin la producción de DHA.

Por lo tanto existe una necesidad de una producción más eficaz de LC-PUFA en células recombinantes, en particular de DHA o DPA en semillas de plantas oleaginosas.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente han identificado métodos y plantas para producir lípidos con niveles altos de DHA y/o DPA. Como se describe en WO2013/185184, los inventores de la presente han descrito previamente lípido vegetal extraído, y plantas y partes de plantas para producir dicho lípido, que comprende DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído entre 7% y 20%. Se definió un límite superior de 20% porque en ese momento si consideró una cantidad máxima de DHA que podría ser producido en plantas. Sin embargo, como se describe en la presente, los inventores se sorprendieron de encontrar que podían obtenerse niveles de DHA en el contenido de ácidos grasos totales mayores de 20%. Los inventores también encontraron lípidos vegetales, y partes de plantas y plantas para producir lípido que comprende DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído entre 7%

y 35%, particularmente en ausencia de DHA.

En consecuencia, en un primer aspecto la presente invención provee lípido vegetal extraído, que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%.

En otro aspecto, la presente invención provee lípido vegetal extraído, que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 2% y 16%, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído, si está presente, es menor que 1%, y en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%.

En otro aspecto, la invención provee un lípido extraído, preferentemente lípido vegetal extraído o lípido microbiano extraído, que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3

que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosapentaenoico (DPA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 7% y 35%. En formas de realización de este aspecto, el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12%, aproximadamente 15%, aproximadamente 18%, aproximadamente 20%, aproximadamente 22%, aproximadamente 24%, aproximadamente 26%, aproximadamente 28%, aproximadamente 30%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 28%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y 35%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22%, entre aproximadamente 14% y 35%, entre aproximadamente 16% y 35%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 25%, o entre aproximadamente 16% y aproximadamente 22%.

En una forma de realización del aspecto precedente, el DHA está presente en un nivel menor de 0,5% del contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído y más preferentemente está ausente en el contenido de ácidos grasos totales del lípido.

En otro aspecto, la invención provee un lípido extraído, preferentemente lípido vegetal extraído o lípido microbiano extraído, que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido docosapentaenoico (DPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG. En una forma de realización, el lípido extraído se caracteriza

adicionalmente por uno o más o todo de (i) comprende ácidos grasos que comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), y ácido eicosatetraenoico (ETA), (ii) por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 48%, entre 35% y aproximadamente 60%, o entre 35% y aproximadamente 50%, del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG, y (iii) el nivel de DPA y/o DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 1% y 35%, o entre aproximadamente 7% y 35% o entre aproximadamente 20,1% y 35%. en formas de realización de este aspecto, el nivel de DPA y/o DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12%, aproximadamente 15%, aproximadamente 18%, aproximadamente 20%, aproximadamente 22%, aproximadamente 24%, aproximadamente 26%, aproximadamente 28%, aproximadamente 30%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 28%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y 35%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22%, entre aproximadamente 14% y 35%, entre aproximadamente 16% y 35%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 25%, o entre aproximadamente 16% y aproximadamente 22%. En formas de realización preferidas, el lípido extraído se caracteriza por (i) y (ii), (i) y (iii) o (ii) y (iii), más preferentemente todos de (i), (ii) y (iii). Preferentemente, el lípido extraído se caracteriza adicionalmente por un nivel de ácido palmítico en el contenido

de ácidos grasos totales del lípido extraído el cual es entre aproximadamente 2% y 16%, y un nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído, si está presente, menor que 1%.

Las formas de realización de cada uno de los cuatro aspectos precedentes se describen con mayor detalle más adelante. Tal como la persona con experiencia podría entender, cualquier forma de realización descrita que sea más amplia que la correspondiente característica en un aspecto precedente no se aplica a ese aspecto.

En una forma de realización, el lípido extraído tiene una o más de las siguientes características

i) el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 2% y 18%, entre aproximadamente 2% y 16%, entre aproximadamente 2% y 15%, o entre aproximadamente 3% y aproximadamente 10%,

ii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que 6%, menor que 3%, menor que 2%, menor que 1%, o aproximadamente 0,1%,

iii) el nivel de ácido oleico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 1% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 3% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 6% y aproximadamente 30%, entre 1% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 60%, entre aproximadamente 45% y aproximadamente 60%, aproximadamente 30%, o entre aproximadamente 15% y aproximadamente 30%,

iv) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 4% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 4% y aproximadamente 17%, o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10%,

v) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 4% y 16%, o entre aproximadamente 2% y 16%,

vi) el nivel de ácido γ-linolénico (GLA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menos de 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 0,5%, entre 0,05% y aproximadamente 7%, entre 0,05% y aproximadamente 4%, entre 0,05% y aproximadamente 3%, o entre 0,05% y aproximadamente 2%,

vii) el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 7%, entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 6%, entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 4%, entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 3%, entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 10%, o entre 0,05% y aproximadamente 2%,

viii) el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 0,5%, entre 0,05% y aproximadamente 6%, entre 0,05% y aproximadamente 5%, entre 0,05% y aproximadamente 4%, entre 0,05% y aproximadamente 3%, o entre 0,05% y aproximadamente 2%,

ix) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido de ácidos grasos

totales del lípido extraído es menos de 4%, menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1%, entre 0,05% y 4%, entre 0,05% y 3%, o entre 0,05% y aproximadamente 2%, o entre 0,05% y aproximadamente 1%,

x) el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 15%, menos de 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, entre 0,05% y 10%, entre 0,05% y 5%, entre 0,05% y aproximadamente 3%, o entre 0,05% y aproximadamente 2%,

xi) si el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 35%, el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menos de 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, entre 0,05% y 8%, entre 0,05% y 5%, entre 0,05% y aproximadamente 3%, entre 5% y 15%, entre 5% y 10%, o entre 0,05% y aproximadamente 2%,

xii) el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es aproximadamente 22%, aproximadamente 24%, aproximadamente 26%, aproximadamente 28%, aproximadamente 31%, entre 20,1% y 29%, entre 20,1% y 28%, entre 20,1% y aproximadamente 27%, entre 20,1% y aproximadamente 26%, entre 20,1% y aproximadamente 25%, entre 20,1% y aproximadamente 24%, entre 21% y 35%, entre 21% y 30%, entre 21% y 28%, entre 21% y aproximadamente 26%, o entre 21% y aproximadamente 24%,

xiii) el lípido comprende ácido docosapentaenoico ω6 ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácidos grasos,

xiv) el lípido comprende menos de 0,1% de ácido docosapentaenoico ω6 ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácidos grasos,

xv) el lípido comprende menos de 0,1% de uno o más o todos de SDA, EPA

y ETA en su contenido de ácidos grasos,

xvi) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 4% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 6% y aproximadamente 20%, o entre aproximadamente 6% y aproximadamente 12%,

xvii) el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 8% y aproximadamente 25%, entre 8% y aproximadamente 22%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 40% o entre aproximadamente 15% y aproximadamente 35%,

xviii) el nivel de total ácidos grasos poliinsaturados en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 20% y aproximadamente 75%, entre 30% y 75%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 75%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, o entre aproximadamente 60% y aproximadamente 75%,

xix) el nivel de ácidos grasos totales ω6 en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 35% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 6% y 20%, menos de 20%, menos de aproximadamente 16%, menos de aproximadamente 10%, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 16%, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 10%, o entre aproximadamente 4% y aproximadamente 10%,

xx) el nivel de nuevos ácidos grasos ω6 en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 6%, menos de 4%, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 1% y

aproximadamente 10%, entre 0,5% y aproximadamente 8%, o entre 0,5% y 4%,

xxi) el nivel de ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 36% y aproximadamente 65%, entre 36% y aproximadamente 70%, entre 40% y aproximadamente 60%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 60%, entre aproximadamente 35% y aproximadamente 60%, entre 40% y aproximadamente 65%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 65%, entre aproximadamente 35% y aproximadamente 65%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65% o aproximadamente 70%,

xxii) el nivel de ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 21% y aproximadamente 45%, entre 21% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 23% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 25% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 27% y aproximadamente 35%, aproximadamente 23%, aproximadamente 25%, aproximadamente 27%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40% o aproximadamente 45%,

xxiii) la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 3,0, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, menos de aproximadamente 0,50, menos de aproximadamente 0,40, menos de aproximadamente 0,30, menos de aproximadamente 0,20, menos de aproximadamente 0,15, aproximadamente 1,0, aproximadamente 0,1, entre aproximadamente 0,10 y aproximadamente 0,4, o aproximadamente 0,2,

xxiv) la proporción de ácidos grasos ω6 nuevos: ácidos grasos ω3 nuevos en

el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 3,0, entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 0,1, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, menos de aproximadamente 0,50, menos de aproximadamente 0,40, menos de aproximadamente 0,30, menos de aproximadamente 0,20, menos de aproximadamente 0,15, aproximadamente 0,02, aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2 o aproximadamente 1,0,

xxv) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por parte de la Δ12-desaturasa de por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 98%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 95%, o entre aproximadamente 75% y aproximadamente 90%,

xxvi) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a SDA por parte de la Δ6-desaturasa de por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 70%, entre aproximadamente 35% y aproximadamente 60%, o entre aproximadamente 50% y aproximadamente 70%,

xxvii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA por parte de la Δ6-elongasa de por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 88%, o entre aproximadamente 75% y aproximadamente 85%,

xxviii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ETA a EPA por parte de la Δ5-desaturasa de por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 99%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 99%, o entre aproximadamente 75% y aproximadamente 98%,

xxix) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de EPA a DPA por parte de la Δ5-elongasa de por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 99%, entre aproximadamente 85% y aproximadamente 99%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, o entre aproximadamente 85% y aproximadamente 95%,

xxx) si el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de DPA a DHA por parte de la Δ4-desaturasa de por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 93%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 80% y aproximadamente 95%, o entre aproximadamente 85% y aproximadamente 95%,

xxxi) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA y/o DPA de por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25% o entre aproximadamente 20% y aproximadamente 30%,

xxxii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de LA a DHA y/o DPA de por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 22%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 40%, o entre aproximadamente 20% y aproximadamente 30%,

xxxiii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a DHA y/o DPA de por lo menos aproximadamente 17%, por lo menos aproximadamente 22%, por lo menos aproximadamente 24%, por lo menos aproximadamente 30%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, entre aproximadamente 22% y aproximadamente 70%, entre aproximadamente 17% y aproximadamente 55%, entre aproximadamente 22% y aproximadamente 40%, o entre aproximadamente 24% y aproximadamente 40%,

xxxiv) los ácidos grasos totales en el lípido extraído tienen menos del 1,5% de C20:1, menos de 1% de C20:1 o aproximadamente 1% de C20:1,

xxxv) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos 95%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 99%, o entre aproximadamente 90% y aproximadamente 99%,

xxxvi) el lípido comprende diacilglicerol (DAG), en donde DAG preferentemente comprende DHA y/o DPA,

xxxvii) el lípido comprende menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 1%, o entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 5%, de ácidos grasos libres (no esterificados) y/o fosfolípidos, o es esencialmente libre de los mismos,

xxxviii) por lo menos 70%, por lo menos 72% o por lo menos 80%, del DHA y/o DPA esterificado en la forma de TAG está en la posición sn-1 o sn-3 del TAG,

xxxix) la especie TAG que contiene DHA más abundante en el lípido es DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12), el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18), y

xl) el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12%, aproximadamente 15%, aproximadamente 18%, aproximadamente 20%, aproximadamente 22%, aproximadamente 24%, aproximadamente 26%, aproximadamente 28%, aproximadamente 31%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 31%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 28%, entre aproximadamente 10% y 35%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22%, entre aproximadamente 14% y 35%, entre aproximadamente 16% y 35%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 25%, o entre aproximadamente 16% y aproximadamente 22%, opcionalmente en donde el nivel de DHA es menor que 0,5% del contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído.

En otra forma de realización, el lípido extraído tiene una o más de las siguientes características

i) el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 2% y 15%,

ii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es aproximadamente 0,1%,

iii) el nivel de ácido oleico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 1% y 30%,

iv) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 4% y 20%,

v) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 4% y 40%,

vi) el nivel de ácido γ-linolénico (GLA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 0,05% y 7%,

vii) el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 0,05% y 10%,

viii) el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es menor que 6%,

ix) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es menor que 4%,

x) el lípido vegetal extraído comprende menos de 0,1% de ácido docosapentaenoico ω6 ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácidos grasos,

xi) el nivel de nuevos ácidos grasos ω6 en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es menor que 10%,

xii) la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido vegetal extraído es entre 1,0 y 3,0, o entre 0,1 y 1,

xiii) la proporción de ácidos grasos ω6 nuevos: ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido vegetal extraído es entre 1,0 y 3,0, entre 0,02 y 0,1, o entre 0,1 y 1,

xiv) la composición de ácidos grasos del lípido vegetal extraído se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA de por lo menos 10%,

xv) la composición de ácidos grasos del lípido vegetal extraído se basa en una eficacia de conversión de LA a DHA de por lo menos 15%,

xvi) la composición de ácidos grasos del lípido vegetal extraído se basa en una eficacia de conversión de ALA a DHA de por lo menos 17%,

xvii) los ácidos grasos totales en el lípido vegetal extraído tienen menos de 1,5% de C20:1, y

xviii) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido vegetal extraído es por lo menos 70%, y puede caracterizarse por una o más de las siguientes características

xix) el lípido vegetal extraído comprende diacilglicerol (DAG) el cual comprende DHA,

xx) el lípido vegetal extraído comprende menos de 10% ácidos grasos libres (no esterificados) y/o fosfolípidos, o es esencialmente libre de los mismos,

xxi) por lo menos el 70% del DHA esterificado en la forma de TAG está en la posición sn-1 o sn-3 del TAG,

xxii) la especie que contiene DHA más abundante en el lípido vegetal extraído es DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12), y

xxiii) el lípido vegetal extraído comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18).

En una forma de realización, el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 0,05% y 10%.

En otra forma de realización, en donde DHA está presente entre 20,1% y 35%, el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es menor que aproximadamente 4%.

En una forma de realización adicional, el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido vegetal extraído es entre 20,1% y 30%.

En otra forma de realización, el lípido extraído está en la forma de un aceite, en donde por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o entre aproximadamente 95% y aproximadamente 98%, en peso del aceite es el lípido.

En una forma de realización preferida de los dos primeros aspectos precedentes, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene las siguientes características: en el contenido de ácidos grasos totales del lípido o aceite, el nivel de DHA es entre aproximadamente 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, el nivel de ácido palmítico es entre aproximadamente 2% y aproximadamente 16%, el nivel de ácido mirístico es menor que aproximadamente 6%, el nivel de ácido oleico es entre aproximadamente 1% y aproximadamente 30%, el nivel de LA es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, ALA está presente, el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 25%, la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre 0,05 y aproximadamente 3,0, y el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es por lo menos aproximadamente 70%, y opcionalmente el lípido está esencialmente libre de colesterol y/o el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18). Más preferentemente, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene adicionalmente una o más o todas de las siguientes características: por lo menos 70% del DHA está esterificado en la posición sn-1 o sn-3 del triacilglicerol (TAG), ALA está presente en un nivel entre 4% y 40% del contenido total de ácidos grasos, GLA está presente y/o el nivel de GLA es menor que 4% del contenido total de ácidos grasos, el nivel de SDA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ETA es menor que aproximadamente 4%, el nivel de EPA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de DPA es entre 0,05% y aproximadamente 8%, el nivel de ácidos grasos

monoinsaturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, el nivel de total ácidos grasos poliinsaturados en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 20% y aproximadamente 75%, la proporción de ácidos grasos ω6 nuevos: ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0, preferentemente menos de aproximadamente 0,50, la composición de ácidos grasos del lípido se basa en: una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por parte de la Δ12-desaturasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA por parte de la Δ6-elongasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de EPA a DPA por parte de la Δ5-elongasa de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, una eficacia de conversión de DPA a DHA por parte de la Δ4-desaturasa de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA de por lo menos aproximadamente 10%. Más preferentemente, por lo menos 81% del DHA está esterificado en la posición sn-1 o sn-3 del triacilglicerol (TAG).

En una forma de realización preferida del tercer aspecto precedente, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene las siguientes características: en el contenido de ácidos grasos totales del lípido o aceite, el nivel de DPA es entre aproximadamente 7% y 30% o entre aproximadamente 7% y 35%, el nivel de ácido palmítico es entre aproximadamente 2% y aproximadamente 16%, el nivel de ácido mirístico es menor que 1%, el nivel de ácido oleico es entre aproximadamente 1% y aproximadamente 30%, el nivel de LA es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, ALA está presente, el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 25%, la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos

ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre 0,05 y aproximadamente 3,0, y el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es por lo menos aproximadamente 70%, y opcionalmente el lípido está esencialmente libre de colesterol y/o el lípido comprende tri-DPA TAG (TAG 66:15). Más preferentemente, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene adicionalmente una o más o todas de las siguientes características: por lo menos 70% del DPA está esterificado en la posición sn-1 o sn-3 del triacilglicerol (TAG), ALA está presente en un nivel entre 4% y 40% del contenido total de ácidos grasos, GLA está presente y/o el nivel de GLA es menor que 4% del contenido total de ácidos grasos, el nivel de SDA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ETA es menor que aproximadamente 4%, el nivel de EPA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, el nivel de total ácidos grasos poliinsaturados en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 20% y aproximadamente 75%, la proporción de ácidos grasos ω6 nuevos: ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0, preferentemente menos de aproximadamente 0,50, la composición de ácidos grasos del lípido se basa en: una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por parte de la Δ12-desaturasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA por parte de la Δ6-elongasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de EPA a DPA por parte de la Δ5-elongasa de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, una eficacia de conversión de ácido oleico a DPA de por lo menos aproximadamente 10%. Más preferentemente, por lo menos 81% del DPA está esterificado en la posición sn-1 o sn-3 del triacilglicerol (TAG).

En otra forma de realización preferida del cuarto aspecto precedente, el lípido o

aceite, preferentemente un aceite de semilla, que comprende DHA y/o DPA tiene las siguientes características: en el contenido de ácidos grasos totales del lípido o aceite, el nivel de ácido palmítico es entre aproximadamente 2% y aproximadamente 16%, el nivel de ácido mirístico es menor que 1%, el nivel de ácido oleico es entre aproximadamente 1% y aproximadamente 30%, el nivel de LA es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, ALA está presente, el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 25%, la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre 0,05 y aproximadamente 3,0, el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es por lo menos aproximadamente 70%, y opcionalmente el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18) y/o tri-DPA TAG (TAG 66:15), en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG. Más preferentemente, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene adicionalmente una o más o todas de las siguientes características: ALA está presente en un nivel entre 4% y 40% del contenido total de ácidos grasos, GLA está presente y/o el nivel de GLA es menor que 4% del contenido total de ácidos grasos, el nivel de SDA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ETA es menor que aproximadamente 4%, el nivel de EPA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, el nivel de total ácidos grasos poliinsaturados en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 20% y aproximadamente 75%, la proporción de ácidos grasos ω6 nuevos: ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0, preferentemente menos de aproximadamente 0,50, la

composición de ácidos grasos del lípido se basa en: una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por parte de la Δ12-desaturasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA por parte de la Δ6-elongasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de EPA a DPA por parte de la Δ5-elongasa de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, una eficacia de conversión de DPA a DHA por parte de la Δ4-desaturasa (si está presente) de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, una eficacia de conversión de ácido oleico a DPA de por lo menos aproximadamente 10%.

En el contexto del lípido extraído o aceite de la invención, el nivel de DHA y/o DPA en el lípido extraído o aceite no ha aumentado, o es sustancialmente el mismo que, el nivel de DHA y/o DPA en el lípido o aceite de la parte de la planta o microbio antes de la extracción. En otras palabras, no se ha realizado un procedimiento para aumentar el nivel de DHA y/o DPA en el lípido o aceite en relación a otros ácidos grasos luego de la extracción. Tal como resultaría evidente, el lípido o aceite puede ser tratado posteriormente por fraccionamiento u otros procedimientos para alterar la composición de ácidos grasos.

En otra forma de realización preferida, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene las siguientes características: en el contenido de ácidos grasos totales del lípido o aceite, el nivel de DHA es entre aproximadamente 20,1% y 30% o entre aproximadamente 20,1% y 35%, el nivel de ácido palmítico es entre aproximadamente 2% y aproximadamente 16%, el nivel de ácido mirístico es menor que aproximadamente 6% y preferentemente menor que 1%, el nivel de ácido oleico es entre aproximadamente 1% y aproximadamente 30%, el nivel de LA es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, ALA está presente, GLA está presente, el nivel de SDA es entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ETA es menor que aproximadamente 6%, el nivel de EPA es entre

aproximadamente 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de DPA es entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 8%.

En otra forma de realización preferida, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla y más preferentemente un aceite de semilla de *Brassica* tal como aceite de mostaza o aceite de canola, tiene las siguientes características: en el contenido de ácidos grasos totales del lípido o aceite, el nivel de DPA es entre aproximadamente 7% y 35%, el nivel de ácido palmítico es entre aproximadamente 2% y aproximadamente 16%, el nivel de ácido mirístico es menor que aproximadamente 6% y preferentemente menor que 1%, el nivel de ácido oleico es entre aproximadamente 1% y aproximadamente 30%, el nivel de LA es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, ALA está presente, el nivel de SDA es entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ETA es menor que aproximadamente 6%, el nivel de EPA es entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 10%. El DHA puede o no estar presente en el lípido o aceite. Preferentemente, si el DHA está presente, está presente en un nivel no mayor de 0,5% del contenido de ácidos grasos totales del lípido o aceite y más preferentemente está ausente en el contenido de ácidos grasos totales del lípido o aceite. Opcionalmente, el lípido está esencialmente libre de colesterol y/o el lípido comprende tri-DPA TAG (TAG 66:15). Más preferentemente, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene adicionalmente una o más o todas de las siguientes características: por lo menos 70% del DPA está esterificado en la posición sn-1 o sn-3 del triacilglicerol (TAG), ALA está presente en un nivel entre 4% y 40% del contenido total de ácidos grasos, GLA está presente y/o el nivel de GLA es menor que 4% del contenido total de ácidos grasos, el nivel de SDA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ETA es menor que aproximadamente 4%, el nivel de EPA es entre 0,05% y aproximadamente 10%, el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido de ácidos

grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 4% y aproximadamente 35%, el nivel de total ácidos grasos poliinsaturados en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 20% y aproximadamente 75%, la proporción de ácidos grasos ω6 nuevos: ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0, preferentemente menos de aproximadamente 0,50, la composición de ácidos grasos del lípido se basa en: una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por parte de la Δ12-desaturasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA por parte de la Δ6-elongasa de por lo menos aproximadamente 60%, una eficacia de conversión de EPA a DPA por parte de la Δ5-elongasa de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, una eficacia de conversión de ácido oleico a DPA de por lo menos aproximadamente 10%. En una forma de realización, por lo menos 81% del DPA está esterificado en la posición sn-1 o sn-3 del triacilglicerol (TAG). Como alternativa, por lo menos el 35% del DPA esterificado en la forma de TAG está esterificado en la posición *sn*-2 de TAG.

En una forma de realización adicional, el lípido extraído de la invención además comprende uno o más esteroles, preferentemente esteroles vegetales.

En otra forma de realización, el lípido extraído está en la forma de un aceite, y comprende menos de aproximadamente 10 mg de esteroles/g de aceite, menos de aproximadamente 7 mg de esteroles/g de aceite, entre aproximadamente 1,5 mg y aproximadamente 10 mg de esteroles/g de aceite, o entre aproximadamente 1,5 mg y aproximadamente 7 mg de esteroles/g de aceite.

Los ejemplos de esteroles que pueden estar en el lípido extraído incluyen, a título enunciativo no taxativo, uno o más o todos de campesterol/24-metilcolesterol, Δ5-estigmasterol, eburicol, β-sitosterol/24-etilcolesterol, Δ5-avenasterol/isofucosterol, Δ7-estigmasterol/estigmast-7-en-3β-ol, y Δ7-avenasterol.

En una forma de realización, la especie vegetal es una de las que se listan en la Tabla 14, tal como canola, y el nivel de esteroles es aproximadamente el mismo que el listado en la Tabla 14 para esa especie vegetal particular. La especie vegetal puede ser mostaza (*B. juncea*) o *C. sativa* y comprenden un nivel de esteroles de aproximadamente el encontrado en aceite extraído de mostaza de tipo salvaje o *C. sativa*, respectivamente.

En una forma de realización, el lípido vegetal extraído comprende uno o más o todos de campesterol/24-metilcolesterol, Δ5-estigmasterol, eburicol, β-sitosterol/24-etilcolesterol, Δ5-avenasterol/isofucosterol, Δ7-estigmasterol/estigmast-7-en-3β-ol, y Δ7-avenasterol, o el cual tiene un contenido de esterol esencialmente igual que el aceite de canola de tipo salvaje.

En una forma de realización, el lípido extraído tiene un contenido de esterol que es esencialmente igual que el aceite de canola de tipo salvaje, aceite de mostaza o aceite de *C. sativa*.

En una forma de realización, el lípido extraído comprende menos de aproximadamente 0,5 mg de colesterol/g de aceite, menos de aproximadamente 0,25 mg de colesterol/g de aceite, entre aproximadamente 0 mg y aproximadamente 0,5 mg de colesterol/g de aceite, o entre aproximadamente 0 mg y aproximadamente 0,25 mg de colesterol/g de aceite, o que está esencialmente libre de colesterol.

En una forma de realización adicional, el lípido es un aceite, preferentemente aceite de una semilla oleaginosa. Los ejemplos de dichos aceites incluyen a, a título enunciativo no taxativo, aceite de *Brassica sp.* tal como por ejemplo aceite de canola o aceite de mostaza, aceite de *Gossypium hirsutum*, aceite de *Linum usitatissimum*, aceite de *Helianthus sp.*, aceite de *Carthamus tinctorius*, aceite de *Glycine max*, aceite de *Zea mays*, aceite de *Arabidopsis thaliana*, aceite de *Sorghum bicolor*, aceite de *Sorghum vulgare*, aceite de *Avena sativa*, aceite de *Trifolium sp.*, aceite de *Elaesis*

guineenis, aceite de *Nicotiana benthamiana*, aceite de *Hordeum vulgare*, aceite de *Lupinus angustifolius*, aceite de *Oryza sativa*, aceite de *Oryza glaberrima*, aceite de *Camelina sativa*, aceite de *Crambe abyssinica*, aceite de *Miscanthus x giganteus*, o aceite de *Miscanthus sinensis*. Más preferentemente, el aceite es un aceite de *Brassica sp*., un aceite de *Camelina sativa* o un aceite de *Glycine max* (soja). En una forma de realización el lípido comprende o es aceite de *Brassica sp.* tal como aceite de *Brassica napus* o aceite de *Brassica juncea*, aceite de *Gossypium hirsutum*, aceite de *Linum usitatissimum*, aceite de *Helianthus sp.*, aceite de *Carthamus tinctorius*, aceite de *Glycine max*, aceite de *Zea mays*, aceite de *Elaesis guineenis*, aceite de *Nicotiana benthamiana,* aceite de *Lupinus angustifolius*, aceite de *Camelina sativa*, aceite de *Crambe abyssinica*, aceite de *Miscanthus x giganteus*, o aceite de *Miscanthus sinensis*. En una forma de realización adicional, el aceite es aceite de canola, aceite de mostaza (*B. juncea*), aceite de soja (*Glycine max*), aceite de *Camelina sativa* o aceite de *Arabidopsis thaliana*. En una forma de realización alternativa, el aceite es un aceite vegetal diferente de aceite de *A. thaliana* y/u otro diferente de aceite de *C. sativa*. En una forma de realización, el aceite vegetal es un aceite diferente de aceite de *G. max* (soja). En una forma de realización, el aceite se obtuvo de una planta crecida bajo condiciones estándares, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 1, o de una planta crecida en el campo o en un vivero bajo condiciones estándares.

En otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir el lípido vegetal extraído, que comprende los pasos de

i) obtener una parte de planta que comprende un lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido

docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraíble en la parte de planta es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, y

ii) extraer el lípido de la parte de la planta,

en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%.

En otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir lípido vegetal extraído, que comprende los pasos de

i) obtener una parte de planta que comprende el lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 2% y 16%, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído, si está presente, es menor que 1%, y en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales de lípido extraíble en la parte de la planta es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, y

ii) extraer el lípido de la parte de la planta,

en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%.

En otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir lípido vegetal extraído, que comprende los pasos de

i) obtener una parte de planta que comprende el lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 2% y 16%, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído, si está presente, es menor que 1%, y en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales de lípido extraíble en la parte de planta es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, y

ii) extraer el lípido de la parte de la planta,

en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%.

En una forma de realización de los tres aspectos precedentes, la invención provee un proceso para producir lípido vegetal extraído, que comprende los pasos de

i) obtener una parte de planta que comprende el lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde el lípido tiene una composición de ácidos grasos que comprende ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde (i) el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%, (ii) el nivel de ácido palmítico en el contenido de

ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 2% y 16%, (iii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que 1%, (iv) el nivel de ácido oleico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 1% y 30%, (v) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 35%, (vi) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 40%, (vii) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que 4%, (viii) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 25%, (ix) la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre 0,05 y 1, (x) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es por lo menos 70%, y (xi) por lo menos 70% del DHA esterificado en la forma de TAG está en la posición sn-1 o sn-3 del TAG, y

ii) extraer el lípido de la parte de planta,

en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%. Preferentemente, por lo menos 81% o por lo menos 90% del DHA esterificado en la forma de TAG está en la posición sn-1 o sn-3 del TAG.

En otro aspecto, la invención provee un proceso para producir lípido vegetal extraído o lípido microbiano, que comprende los pasos de

i) obtener una parte de planta o células microbianas que comprende el lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosapentaenoico (DPA), y opcionalmente uno o más de ácido

estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido de la parte de la planta o células microbianas es entre aproximadamente 7% y 35%, y

ii) extraer el lípido de la parte de planta o células microbianas,

en donde el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 7% y 35%. En una forma de realización, el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 7% y 20%, o entre 20,1% y 35%.

En una forma de realización del aspecto precedente, la invención provee un proceso para producir lípido vegetal extraído o lípido microbiano, que comprende los pasos de

i) obtener una parte de planta o células microbianas que comprende el lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde el lípido tiene una composición de ácidos grasos que comprende ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DPA), y uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde (i) el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 7% y 30% o entre 7% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%, (ii) el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 2% y 16%, (iii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que 6%, preferentemente menor que 1%, (iv) el nivel de ácido oleico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 1% y 30%, (v) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 35%, (vi) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido

extraído es entre 4% y 40%, (vii) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que 4%, (viii) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 25%, (ix) la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre 0,05 y 1, (x) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es por lo menos 70%, y (xi) por lo menos 70% del DPA esterificado en la forma de TAG está en la posición sn-1 o sn-3 del TAG y

ii) extraer el lípido de la parte de planta,

en donde el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 7% y 30% o entre 7% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%. Preferentemente, por lo menos 81% o por lo menos 90% del DPA esterificado en la forma de TAG está en la posición sn-1 o sn-3 del TAG.

En otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir lípido extraído, que comprende los pasos de

i) obtener células, preferentemente una parte de planta que comprende las células o células microbianas, que comprenden el lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido docosapentaenoico (DPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG, y

ii) extraer el lípido de las células,

en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG. En una forma de realización, el lípido extraído producido por el proceso se caracteriza adicionalmente por uno o más o todos de (i)

comprende ácidos grasos que comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), y ácido eicosatetraenoico (ETA), (ii) por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 48%, entre 35% y aproximadamente 60%, o entre 35% y aproximadamente 50%, del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG, y (iii) el nivel de DPA y/o DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 1% y 35%, o entre aproximadamente 7% y 35% o entre aproximadamente 20,1% y 35%. en formas de realización de este aspecto, el nivel de DPA y/o DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12%, aproximadamente 15%, aproximadamente 18%, aproximadamente 20%, aproximadamente 22%, aproximadamente 24%, aproximadamente 26%, aproximadamente 28%, aproximadamente 30%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 28%, entre aproximadamente 7% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y 35%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22%, entre aproximadamente 14% y 35%, entre aproximadamente 16% y 35%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 16% y aproximadamente 25%, o entre aproximadamente 16% y aproximadamente 22%. En formas de realización preferidas, el lípido extraído se caracteriza por (i) y (ii), (i) y (iii) o (ii) y (iii), más preferentemente todos de (i), (ii) y (iii). Preferentemente, el lípido extraído se caracteriza adicionalmente por un nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído el cual es entre

aproximadamente 2% y 16%, y un nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído, si está presente, es menor que 1%.

En una forma de realización del aspecto precedente, la invención provee un proceso para producir lípido extraído, que comprende los pasos de

i) obtener células, preferentemente una parte de planta que comprende las células o células microbianas, que comprenden el lípido, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido docosapentaenoico (DPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), y además comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), y uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde (i) el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 2% y 16%, (ii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que 1%, (iii) el nivel de ácido oleico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 1% y 30%, (iv) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 35%, (v) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 40%, (vi) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es menor que 4%, (vii) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre 4% y 25%, (viii) la proporción de ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es entre 0,05 y 1, (ix) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es por lo menos 70%, y (x) por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG, y

ii) extraer el lípido de la parte de planta,

en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG.

El paso de obtener la parte de planta o células microbianas puede comprender recolectar las partes de la planta, preferentemente semillas, de plantas que producen las partes de la planta, recuperar las células microbianas de cultivos de dichas células, u obtener las partes de plantas o células microbianas comprándolas de un productor o proveedor, o por importación. El proceso puede comprender un paso de determinar la composición de ácidos grasos del lípido en una muestra de las partes de plantas o células microbianas, o del lípido extraído.

En una forma de realización preferida, el lípido extraído obtenido por un proceso de la invención tiene, cuando es relevante, una o más de las características definidas en la presente, por ejemplo como se definió precedentemente en relación a los primeros cuatro aspectos.

Las formas de realización de cada uno de los cinco aspectos precedentes se describen con mayor detalle más adelante. Tal como la persona con experiencia podría entender, cualquier forma de realización descrita que es más amplia que la característica correspondiente en el aspecto precedente no se aplica a ese aspecto.

En una forma de realización, la parte de la planta es una semilla, preferentemente una semilla oleaginosa. Los ejemplos de dichas semillas incluyen a, a título enunciativo no taxativo, *Brassica sp., Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium sp.*, *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, o *Crambe abyssinica*, preferentemente una semilla de

Brassica sp., una semilla de *C. sativa* o una semilla de *G. max* (soja), más preferentemente una semilla de *Brassica napus, B. juncea* o *C. sativa*. En una forma de realización, la parte de planta es una semilla, preferentemente una semilla oleaginosa tal como *Brassica sp.* tal como *Brassica napus* o *Brassica juncea, Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Lupinus angustifolius*, *Camelina sativa*, o *Crambe abyssinica*, preferentemente una semilla de *Brassica napus, B juncea* o *C. sativa*. En una forma de realización, la semilla es semilla de canola, semilla de mostaza*,* semilla de soja, semilla de *Camelina sativa* o semilla de *Arabidopsis thaliana*. En una forma de realización alternativa, la semilla es una semilla diferente de semilla de *A. thaliana* y/u otra diferente de semilla de *C. sativa*. En una forma de realización, la semilla es una semilla diferente de semilla de soja. En una forma de realización, la parte de la planta es una semilla de *Brassica sp.*. En una forma de realización, la semilla se obtuvo de una planta crecida bajo condiciones estándares, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 1, o de una planta crecida en el campo o en un vivero bajo condiciones estándares.

En otra forma de realización, la semilla comprende por lo menos aproximadamente 18 mg, por lo menos aproximadamente 22 mg, por lo menos aproximadamente 26 mg, entre aproximadamente 18 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 22 mg y aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 80mg, o entre aproximadamente 24 mg y aproximadamente 50 mg, de DHA y/o DPA por gramo de semilla.

En una forma de realización adicional, la parte de la planta tal como una semilla comprende polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-

desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iv) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

v) una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vi) una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vii) una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

viii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

y en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de planta.

En una forma de realización adicional, la parte de la planta tal como una semilla o células recombinantes tal como células microbianas comprenden polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-

elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iv) una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

v) una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vi) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

y en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de planta o las células.

En una forma de realización, si la parte de la planta o células comprenden lípido que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido docosapentaenoico (DPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG, la parte de la planta tal como una semilla o células recombinantes tales como células microbianas comprenden un polinucleótido exógeno que codifica para una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), en donde el polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores que tienen la capacidad de dirigir la expresión del polinucleótido en una célula de la parte de planta o las células. En una forma de realización adicional, las células comprenden polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y

opcionalmente una Δ4-desaturasa,

ii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

iii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

iv) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

v) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

vi) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

vii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

viii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula. Preferentemente, la LPAAT puede usar un sustrato acil-CoA graso poliinsaturado C22 tal como DHA-CoA y/o DPA-CoA.

En una forma de realización, la Δ12-desaturasa también tiene actividad ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, es decir las actividades son conferidas por un polipéptido único. Como alternativa, la Δ12-desaturasa no tiene actividad ω3-desaturasa y no tiene actividad Δ15-desaturasa es decir la Δ12-desaturasa es un polipéptido separado al polipéptido que tiene actividad ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa.

En aún otra forma de realización, la parte de la planta tal como una semilla o células recombinantes tales como células microbianas tienen una o más o todas de las siguientes características:

i) la Δ12-desaturasa convierte ácido oleico a ácido linoleico en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 90%, o entre aproximadamente 75% y aproximadamente 85%,

ii) la ω3-desaturasa convierte ácidos grasos ω6 a ácidos grasos ω3 en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de por lo menos aproximadamente 65%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 85%, entre aproximadamente 65% y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 75% y aproximadamente 91%, o entre aproximadamente 80% y aproximadamente 91%,

iii) la Δ6-desaturasa convierte ALA a SDA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, entre aproximadamente

30% y aproximadamente 70%, entre aproximadamente 35% y aproximadamente 60%, o entre aproximadamente 50% y aproximadamente 70%,

iv) la Δ6-desaturasa convierte ácido linoleico a ácido γ-linolénico en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 2,5%, menos de aproximadamente 1%, entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5%, entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 2,5%, o entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 1%,

v) la Δ6-elongasa convierte SDA a ETA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%, o entre aproximadamente 75% y aproximadamente 80%,

vi) la Δ5-desaturasa convierte ETA a EPA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 70% y aproximadamente 95%, o entre aproximadamente 75% y aproximadamente 95%,

vii) la Δ5-elongasa convierte EPA a DPA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 90%, o entre aproximadamente 85% y aproximadamente 95%,

viii) la Δ4-desaturasa convierte DPA a DHA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes con una eficacia de por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 93%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 95%, entre aproximadamente 80% y aproximadamente 95%, o entre aproximadamente 85% y aproximadamente 95%,

ix) la eficacia de conversión de ácido oleico a DHA o DPA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes es por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25%, o entre aproximadamente 20% y aproximadamente 30%,

x) la eficacia de conversión de LA a DHA o DPA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes es por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 22%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 50%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 40%, o entre aproximadamente 20% y aproximadamente 30%,

xi) la eficacia de conversión de ALA a DHA o DPA en una o más células de la parte de planta o en las células recombinantes es por lo menos aproximadamente 17%, por lo menos aproximadamente 22%, por lo menos aproximadamente 24%, por lo menos aproximadamente 30%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, entre aproximadamente 17% y aproximadamente 55%, entre

aproximadamente 22% y aproximadamente 35%, o entre aproximadamente 24% y aproximadamente 35%,

xii) una o más células de la parte de planta o las células recombinantes comprenden por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, entre aproximadamente 25% y aproximadamente 40%, o entre aproximadamente 27,5% y aproximadamente 37,5%, más de ácidos grasos ω3 que las correspondientes células que carecen de los polinucleótidos exógenos,

xiii) la Δ6-desaturasa preferencialmente desatura ácido α-linolénico (ALA) en relación a ácido linoleico (LA),

xiv) la Δ6-elongasa también tiene actividad Δ9-elongasa,

xv) la Δ12-desaturasa también tiene actividad Δ15-desaturasa,

xvi) la Δ6-desaturasa también tiene actividad Δ8-desaturasa,

xvii) la Δ8-desaturasa también tiene actividad de Δ6-desaturasa o no tiene actividad de Δ6-desaturasa,

xviii) la Δ15-desaturasa también tiene actividad ω3-desaturasa sobre GLA,

xix) la ω3-desaturasa también tiene actividad Δ15-desaturasa sobre LA,

xx) la ω3-desaturasa desatura LA y/o GLA,

xxi) la ω3-desaturasa preferencialmente desatura GLA en relación a LA,

xxii) una o más o todas las desaturasas, preferentemente la Δ6-desaturasa y/o la Δ5-desaturasa, tienen mayor actividad sobre un sustrato acil-CoA que sobre un sustrato acil-PC correspondiente,

xxiii) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad de Δ6-desaturasa sobre ALA que sobre LA como sustrato ácido graso,

xxiv) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad de Δ6-desaturasa sobre ALA-CoA como sustrato ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato ácido graso,

xxv) la Δ6-desaturasa tiene por lo menos aproximadamente una actividad 2 veces mayor de Δ6-desaturasa, por lo menos actividad 3 veces mayor, por lo menos actividad 4 veces mayor, o por lo menos actividad 5 veces mayor, sobre ALA como sustrato en comparación a LA,

xxvi) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad sobre ALA-CoA como sustrato ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato ácido graso,

xxvii) la Δ6-desaturasa tiene por lo menos aproximadamente una actividad 5 veces mayor de Δ6-desaturasa o por lo menos actividad 10 veces mayor, sobre ALA-CoA como sustrato ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato ácido graso,

xxviii) la desaturasa es una desaturasa terminal, y

xxix) la Δ6-desaturasa no tiene actividad Δ5-desaturasa detectable sobre ETA.

En aún otra forma de realización, la parte de la planta tal como una semilla o la célula recombinante tal como células microbianas tiene una o más o todas de las siguientes características

i) la Δ12-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:4, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:4,

ii) la ω3-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:6, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:6,

iii) la Δ6-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:9, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:9,

iv) la Δ6-elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:16, un fragmento biológicamente activo de la misma tal

como SEQ ID NO:17, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:16 y/o SEQ ID NO:17,

v) la Δ5-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:20, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:20,

vi) la Δ5-elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:25, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:25, y

vii) la Δ4-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:28, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:28.

En una forma de realización, la parte de la planta tal como una semilla o las células recombinantes tales como células microbianas además comprenden un polinucleótido exógeno que codifica para una diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT), glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT) preferentemente una LPAAT que puede usar un Sustrato acil-CoA graso poliinsaturado C22 tal como DHA-CoA y/o DPA-CoA, acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT), fosfolipasa A_2 (PLA_2), fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD), CDP-colina diacilglicerol colina fosfotransferasa (CPT), fosfatidilcolina diacilglicerol aciltransferasa (PDAT), fosfatidilcolina:diacilglicerol colina fosfotransferasa (PDCT), acil-CoA sintasa (ACS), o una combinación de dos o más de las mismas.

En otra forma de realización, la parte de la planta tal como una semilla o las células recombinantes tales como células microbianas además comprenden una mutación introducida o un polinucleótido exógeno que disminuye la producción y/o actividad de una enzima endógena en una célula de la parte de planta seleccionada de

FAE1, DGAT, MGAT, GPAT, LPAAT, LPCAT, PLA_2, PLC, PLD, CPT, PDAT, una tioesterasa tal como FATB, o a Δ12-desaturasa, o una combinación de dos o más de las mismas.

En una forma de realización adicional, por lo menos uno, o todos, de los promotores son promotores específicos de semilla. En una forma de realización, por lo menos uno, o todos, de los promotores han sido obtenidos a partir de un gen de biosíntesis o acumulación de aceite tal como un gen que codifica para oleosina, o de un gen para proteína de almacenamiento de la semilla tal como un gen que codifica para conlinina.

En otra forma de realización, el o los promotores que dirigen la expresión de los polinucleótidos exógenos que codifican para la Δ4-desaturasa y la Δ5-elongasa inician la expresión de los polinucleótidos en la semilla en desarrollo de la planta o las células recombinantes tales como las células microbianas antes, o alcanzan el pico de expresión antes, el o los promotores dirigen la expresión de los polinucleótidos exógenos que codifican para la Δ12-desaturasa y la ω3-desaturasa.

En una forma de realización adicional, los polinucleótidos exógenos están covalentemente unidos en una molécula de ADN, preferentemente una molécula de T-ADN, integrada en el genoma de las células de la parte de planta o las células recombinantes tales como las células microbianas y preferentemente en donde el número de dichas moléculas de ADN integradas en el genoma de las células de la parte de planta o las células recombinantes no es mayor de uno, dos o tres, o es dos o tres.

En aún otra forma de realización, la parte de la planta comprende por lo menos dos polinucleótidos exógenos diferentes, que cada uno codifica para una Δ6-desaturasa que tiene la misma o diferente secuencia de aminoácidos.

En una forma de realización adicional, el contenido total de aceite de la parte

de planta que comprende los polinucleótidos exógenos es por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 80%, o entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100% del contenido total de aceite de una parte de planta correspondiente que carece de los polinucleótidos exógenos. En una forma de realización adicional, la semilla que comprende los polinucleótidos exógenos tiene un peso de semilla por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 80%, o entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100% del peso de una semilla correspondiente que carece de los polinucleótidos exógenos.

En otra forma de realización, el lípido está en la forma de un aceite, preferentemente un aceite de semilla de una semilla oleaginosa, y en donde por lo menos aproximadamente 90%, o aproximadamente por lo menos 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o entre aproximadamente 95% y aproximadamente 98%, en peso del lípido son triacilgliceroles.

En una forma de realización adicional, el proceso además comprende tratar el lípido para aumentar el nivel de DHA y/o DPA como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Por ejemplo, el tratamiento comprende transesterificación. Por ejemplo, el lípido tal como aceite de canola puede tratarse para convertir los ácidos grasos en el aceite a ésteres de alquilo tales como ésteres de metilo o etilo, que luego pueden fraccionarse para enriquecer el lípido o aceite en DHA y/o DPA. En formas de realización, la composición de ácidos grasos del lípido después de dicho tratamiento comprende por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de DHA y/o DPA. La proporción de

DHA:DPA en el lípido después del tratamiento preferentemente es mayor de 2:1, o alternativamente menor de 0,5:1. Como alternativa, el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido después del tratamiento es menor que 2,0% o menor de 0,5%, preferentemente está ausente en el lípido.

También se provee lípido, o aceite que comprende el lípido, producido usando un proceso de la invención.

En otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir ésteres de metilo o etilo de ácidos grasos poliinsaturados, en donde el proceso comprende hacer reaccionar triacilgliceroles en el lípido vegetal extraído, o durante el proceso de extracción, con metanol o etanol, respectivamente, en donde el lípido vegetal extraído comprende ácidos grasos esterificados en la forma de TAG, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 20,1% y 30%, o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%, produciendo de este modo los ésteres de metilo o etilo de ácidos grasos poliinsaturados.

En otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir ésteres de metilo o etilo de ácidos grasos poliinsaturados, en donde el proceso comprende hacer reaccionar triacilgliceroles en el lípido vegetal extraído, o durante el proceso de extracción, con metanol o etanol, respectivamente, en donde el lípido vegetal extraído comprende ácidos grasos esterificados en la forma de TAG, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), y

ácido docosapentaenoico (DPA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 7% y 35%, preferentemente entre 20,1% y 30% o entre 20,1% y 35%, produciendo de este modo los ésteres de metilo o etilo de ácidos grasos poliinsaturados.

En otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir ésteres de metilo o etilo de ácido docosapentaenoico (DPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en donde el proceso comprende hacer reaccionar triacilgliceroles (TAG) en el lípido vegetal extraído, o durante el proceso de extracción, con metanol o etanol, respectivamente, en donde el lípido vegetal extraído comprende ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido docosapentaenoico (DPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de TAG está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG, produciendo de este modo los ésteres de metilo o etilo de ácidos grasos poliinsaturados.

En una forma de realización preferida, el lípido que se usa en el proceso de los tres aspectos precedentes tiene una o más de las características definidas en la presente en el contexto del lípido extraído o aceite de la invención.

En otro aspecto, la presente invención provee una planta de semillas oleaginosas o parte de la misma tal como una semilla que comprende

a) lípido en su semilla, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ6-

desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más de los promotores específicos de semilla que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla en desarrollo de la planta, en donde los ácidos grasos comprende ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido de la semilla es entre 20,1% y 30%, o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%.

En otro aspecto, la presente invención provee una planta de semillas oleaginosas o parte de la misma tal como una semilla que comprende

a) lípido en su semilla, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-

elongasa,

en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores específicos de semilla que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla en desarrollo de la planta, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido de la semilla es entre 20,1% y 30%, o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35%.

En otro aspecto, la presente invención provee una planta de semillas oleaginosas o parte de la misma tal como una semilla que comprende

a) lípido en su semilla, en donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores específicos de semilla que tiene la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla en desarrollo de la planta, en donde los ácidos

grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y en donde el nivel de DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido de la semilla es entre 20,1% y 30%, o entre 20,1% y 35%, y en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido de ácidos grasos totales del lípido es entre aproximadamente 2% y 16%, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido de ácidos grasos totales del lípido, si está presente, es menor que 1%.

En otro aspecto, la presente invención provee una planta de semillas oleaginosas o parte de la misma tal como una semilla que comprende lípido en su semilla, o una célula microbiana, que comprende

a) lípido que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

iv) una ω3-desaturasa y/o Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores específicos de semilla que tiene la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla en desarrollo de la planta, o uno o más promotores

que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula microbiana, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y opcionalmente ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), y ácido docosapentaenoico (DPA), y opcionalmente ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y en donde el nivel de DPA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido de la semilla o célula microbiana es entre 7% y 35%. En una forma de realización preferida de este aspecto, el DHA está presente en un nivel menor de 0,5% del contenido de ácidos grasos totales del lípido de la semilla y del lípido extraído y más preferentemente está ausente en el contenido de ácidos grasos totales de los lípidos.

En otro aspecto, la presente invención provee una célula, preferentemente una célula en o de una planta tal como una planta de semillas oleaginosas o parte de la misma tal como una semilla, o una planta de semillas oleaginosas o parte de la misma, o una célula microbiana, que comprende

a) ácidos grasos en una forma esterificada, en donde los ácidos grasos comprenden ácido docosapentaenoico (DPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en donde por lo menos el 35% del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

ii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-

elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

iii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

iv) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

v) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

vi) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

vii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

viii) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula. Preferentemente, la LPAAT puede usar un sustrato acil-CoA graso poliinsaturado C22 tal como DHA-CoA y/o DPA-CoA y el nivel de DPA y/o DHA en el contenido de ácidos grasos totales del lípido extraído es entre aproximadamente 1% y 35%, o entre aproximadamente 7% y 35% o entre aproximadamente 20,1% y 35%. In formas de realización, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos

aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 48%, entre 35% y aproximadamente 60%, o entre 35% y aproximadamente 50%, del DPA y/o DHA esterificado en la forma de triacilglicerol (TAG) está esterificado en la posición *sn*-2 del TAG.

En formas de realización de cada uno de los cinco aspectos precedentes, la Δ15-desaturasa es una Δ15-desaturasa fúngica y la ω3-desaturasa es una ω3-desaturasa fúngica.

En una forma de realización preferida, la planta de semilla oleaginosa, célula microbiana o célula de la invención tiene, cuando es relevante, una o más de las características definidas en la presente, por ejemplo como se definió precedentemente en relación al lípido vegetal extraído, lípido microbiano extraído o un proceso para la producción del mismo.

Los ejemplos de plantas oleaginosas incluyen a, a título enunciativo no taxativo, *Brassica sp., Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium sp.*, *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, o *Crambe abyssinica*. En una forma de realización, la planta es una planta *Brassica sp*., una planta *C. sativa* o una planta *G. max* (soja). En una forma de realización, la planta de semilla oleaginosa es una planta de canola, *B. juncea, Glycine max*, *Camelina sativa* o *Arabidopsis thaliana*. En una forma de realización alternativa, la planta de semilla oleaginosa es diferente de *A. thaliana* y/u otra diferente de *C. sativa*. En una forma de realización, la planta de semilla oleaginosa es una planta diferente de *G. max* (soja). En una forma de realización, la planta de semilla oleaginosa está en el campo, o se hizo crecer en el campo, o se hizo crecer en un vivero bajo condiciones estándares, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 1.

En una forma de realización, una o más de las desaturasas usadas en un proceso de la invención o presente en una célula, o planta o parte de la misma de la invención, tiene la capacidad de usar un sustrato acil-CoA. En una forma de realización preferida, una o más de Δ6-desaturasa, Δ5-desaturasa, Δ4-desaturasa y Δ8-desaturasa, si está presente, tiene la capacidad de usar un sustrato acil-CoA, preferentemente cada una de i) Δ6-desaturasa, Δ5-desaturasa y Δ4-desaturasa o ii) Δ5-desaturasa, Δ4-desaturasa y Δ8-desaturasa tiene la capacidad de usar un sustrato acil-CoA. En una forma de realización, una Δ12-desaturasa y/o una ω3-desaturasa tiene la capacidad de usar un sustrato acil-CoA. El sustrato acil-CoA preferentemente es un ALA-CoA para la Δ6-desaturasa, ETA-CoA para la Δ5-desaturasa, DPA-CoA para la Δ4-desaturasa, y ETrA-CoA para la Δ8-desaturasa, oleoil-CoA para la Δ12-desaturasa, o uno o más de LA-CoA, GLA-CoA, y ARA-CoA para la ω3-desaturasa.

En una forma de realización, la semilla madura recolectada de la planta tiene un contenido de DHA y/o DPA de por lo menos aproximadamente 28 mg por gramo de semilla, preferentemente por lo menos aproximadamente 32 mg por gramo de semilla, por lo menos aproximadamente 36 mg por gramo de semilla, por lo menos aproximadamente 40 mg por gramo de semilla, más preferentemente por lo menos aproximadamente 44 mg por gramo de semilla o por lo menos aproximadamente 48 mg por gramo de semilla, aproximadamente 80 mg por gramo de semilla, o entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 80 mg por gramo de semilla.

En otro aspecto, la presente invención provee una planta *Brassica napus, B. juncea* o *Camelina sativa* que tiene la capacidad de producir semillas que comprenden DHA y/o DPA, en donde la semilla madura recolectada de la planta tiene un contenido de DHA y/o DPA de por lo menos aproximadamente 28 mg por gramo de semilla, preferentemente por lo menos aproximadamente 32 mg por gramo de semilla, por lo menos aproximadamente 36 mg por gramo de semilla, por lo menos aproximadamente

40 mg por gramo de semilla, más preferentemente por lo menos aproximadamente 44 mg por gramo de semilla o por lo menos aproximadamente 48 mg por gramo de semilla, aproximadamente 80 mg por gramo de semilla, o entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 80 mg por gramo de semilla.

En otro aspecto, la presente invención provee una célula vegetal de una planta de la invención que comprende los polinucleótidos exógenos definidos en la presente.

También se provee una parte de planta, preferentemente una semilla, o células recombinantes tales como células microbianas que tienen una o más de las siguientes características

i) es de una planta de la invención,

ii) comprende lípido como se define en la presente, o

iii) puede usarse en un proceso de la invención.

En aún otro aspecto, la presente invención provee semilla madura recolectada de *Brassica napus, B. juncea* o *Camelina sativa* que comprende DHA y/o DPA y un contenido de humedad de entre aproximadamente 4% y aproximadamente 15% en peso, preferentemente entre aproximadamente 6% y aproximadamente 8% en peso o entre aproximadamente 4% y aproximadamente 8% en peso, más preferentemente entre aproximadamente 4% y aproximadamente 6% en peso, en donde el contenido de DHA y/o DPA de la semilla es por lo menos aproximadamente 28 mg por gramo de semilla, preferentemente por lo menos aproximadamente 32 mg por gramo de semilla, por lo menos aproximadamente 36 mg por gramo de semilla, por lo menos aproximadamente 40 mg por gramo de semilla, más preferentemente por lo menos aproximadamente 44 mg por gramo de semilla o por lo menos aproximadamente 48 mg por gramo de semilla, aproximadamente 80 mg por gramo de semilla, o entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 80 mg por gramo de semilla.

En una forma de realización, la célula de la invención, la planta de semilla

oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, o la semilla de la invención, puede usarse para producir lípido extraído que comprende una o más o todas las características definidas en la presente.

En aún otro aspecto, la presente invención provee un método para producir una planta o célula que puede usarse para producir lípido extraído de la invención, en donde el método comprende

a) ensayar el nivel de DHA y/o DPA en el lípido producido por una o más partes de plantas tales como semillas o células recombinantes tales como células microbianas de una pluralidad de plantas o células recombinantes tales como células microbianas, en donde cada planta o célula recombinante tal como una célula microbiana comprende uno o más polinucleótidos exógenos que codifican para uno o más de los siguientes grupos de enzimas;

i) una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iv) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

v) una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vi) una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vii) una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

viii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

ix) una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

x) una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

xi) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

xiii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

xiv) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

en donde cada polinucleótido está operativamente ligado a uno o más promotores que tienen la capacidad de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de una parte de planta o célula recombinante, e

b) identificar una planta o célula recombinante, de una pluralidad de plantas o células recombinantes, que pueden usarse para producir lípido vegetal extraído o lípido celular de la invención en una o más de sus partes, y

c) opcionalmente, producir plantas progenie o células recombinantes de la planta o célula recombinante identificada, o semilla de la misma.

En una forma de realización, la planta o célula recombinante además comprende un polinucleótido exógeno que codifica para una LPAAT como se define en la presente.

Preferentemente, la planta progenie es por lo menos una segunda o tercera generación extraída de la planta identificada, y preferentemente es homocigota para el uno o más polinucleótidos. Más preferentemente, el uno o más polinucleótidos están presentes en la planta progenie en un solo *locus* de inserción. Es decir, la invención provee un método que puede usarse como un método de tamizaje para identificar una planta o semilla de la misma de una pluralidad de plantas o semillas candidatas transformadas, en donde la planta identificada o su planta progenie produce lípido de la invención, preferentemente en su semilla. Dicha planta o planta progenie o su semilla se selecciona si produce lípido de la invención, en particular que tiene el nivel especificado de DHA y/o nivel de DPA, o no se selecciona si no produce lípido de la invención.

En una forma de realización, el o los polinucleótidos exógenos presentes en una célula tal como una célula microbiana, o planta o parte de la misma como se define en la presente, se vuelve establemente integrado en el genoma de la célula, planta o la parte de la planta tal como semilla. Preferentemente, el o los polinucleótidos exógenos se vuelven establemente integrados en el genoma de la célula, planta o parte de planta tal como semilla en un único *locus* en el genoma, y preferentemente es homocigota para la inserción. Más preferentemente, la planta, parte de planta o semilla se caracteriza adicionalmente en que carece de polinucleótidos exógenos diferentes de la una o más moléculas de T-ADN. Es decir, no se integran secuencias de vectores exógenos en el genoma diferentes de la secuencias de T-ADN.

En una forma de realización, antes del paso a) el método incluye introducir el uno o más polinucleótidos exógenos en una o más células de la planta.

También se provee una planta producida usando un método de la invención, y semillas de dichas plantas.

En una forma de realización, la planta de la invención tiene fertilidad de macho y hembra, preferentemente tiene niveles de fertilidad de macho y hembra que son por lo menos 70% en relación a, o preferentemente son aproximadamente los mismos que, una planta de tipo salvaje correspondiente. En una forma de realización, el polen producido por la planta de la invención o la planta producida a partir de la semilla de la invención es entre 90 y 100% viable de acuerdo a lo determinado por tinción con un colorante de viabilidad. Por ejemplo, la viabilidad del polen puede evaluarse como se describe en el Ejemplo 1.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para producir semilla, en donde el método comprende,

a) hacer crecer una planta de la invención, o una planta que produce una parte de la invención, preferentemente en un campo como parte de una población de por lo menos 1000 o 2000 o 3000 de dichas plantas o en un área de por lo menos 1 hectárea o 2 hectáreas o 3 hectáreas plantadas con una densidad de plantación estándar, como alternativa en un vivero bajo condiciones estándares,

b) recolectar la semilla de la planta o plantas, y

c) opcionalmente, extraer lípido de la semilla, preferentemente para producir aceite con un rendimiento total de DHA y/o rendimiento de DPA de por lo menos 60 kg o 70 kg o 80 kg de DHA y/o DPA /hectárea.

En una forma de realización, la planta, célula vegetal, parte de planta o semilla, o célula recombinante, de la invención tiene una o más de las siguientes características

i) su aceite es como se define en la presente, o

ii) la parte de planta o semilla o célula recombinante tiene la capacidad de ser usada en un proceso de la invención.

Por ejemplo, la semilla puede usarse para producir una planta de la invención.

La planta puede hacerse crecer en el campo o en un vivero bajo condiciones estándares, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 1.

En otro aspecto, la presente invención provee lípido, o aceite, producido por, u obtenido de, el uso del proceso de la invención, la célula de la invención, la planta de semilla oleaginosa de la invención, la planta *Brassica* sp., *Brassica napus*, *B. juncea*, *G. max* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, o la planta, célula vegetal, parte de planta o semilla de la invención. Preferentemente, el lípido o aceite se purifica para eliminar contaminantes tales como ácido nucleico (ADN y/o RNA), proteína y/o hidrato de carbono, o pigmentos tales como clorofila. El lípido o aceite también puede purificarse para enriquecer la proporción de TAG, por ejemplo por eliminación de ácidos grasos libres (FFA) o fosfolípidos.

En una forma de realización, el lípido o aceite puede obtenerse por extracción de aceite de una semilla oleaginosa. Los ejemplos de aceite de semillas oleaginosas incluyen a, a título enunciativo no taxativo, aceite de canola (*Brassica napus, Brassica rapa* sp.), aceite de mostaza (*Brassica juncea*), otro aceite de Brassica, aceite de girasol (*Helianthus annus*), aceite de lino (*Linum usitatissimum*), aceite de soja (*Glycine max*), aceite de cártamo (*Carthamus tinctorius*), aceite de maíz (*Zea mays*), aceite de tabaco (*Nicotiana tabacum*), aceite de maní (*Arachis hypogaea*), aceite de palma, aceite de semilla de algodón (*Gossypium hirsutum*), aceite de coco (*Cocos nucifera*), aceite de palta (*Persea americana*), aceite de oliva (*Olea europaea*), aceite castaña de cajú (*Anacardium occidentale*), aceite de macadamia (*Macadamia intergrifolia*), aceite de almendra (*Prunus amygdalus*) o aceite de semilla de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*).

En una forma de realización, una célula (célula recombinante) de, o usada en, la invención es una célula microbiana tal como una célula adecuada para

fermentación, preferentemente una célula microbiana oleaginosa que tiene la capacidad de acumular triacilgliceroles hasta un nivel de por lo menos 25% en base al peso. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbicos, que son bien conocidos en el arte. Las células fermentadoras adecuadas, típicamente microorganismos tienen la capacidad de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directamente o indirectamente a los ácidos grasos deseados. Los ejemplos de microorganismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tal como levaduras. Tal como se usa en la presente, "levadura" incluye *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis, Candida* spp*., Kluveromyces* spp*., Pichia* spp*., Hansenula* spp*., Trichoderma* spp*., Lipomyces starkey,* y preferentemente *Yarrowia lipolytica.*

En otro aspecto, la presente invención provee ácido graso producido por, u obtenido a partir de, usando el proceso de la invención, la célula de la invención, la planta de semilla oleaginosa de la invención, la planta *Brassica* sp., *Brassica napus*, *B. juncea, G. max* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, o la planta, célula vegetal, parte de planta o semilla de la invención. Preferentemente el ácido graso es DHA y/o DPA. El ácido graso puede ser una mezcla de ácidos grasos que tienen una composición de ácidos grasos como se describe en la presente, o puede estar enriquecido tal que el ácido graso comprende por lo menos 40% o por lo menos 90% del contenido de ácido graso de la mezcla. En una forma de realización, el ácido graso no está esterificado. Como alternativa, el ácido graso está esterificado tal como, por ejemplo, con un grupo metilo, etilo, propilo o butilo.

También se provee alimento en base a semillas obtenido de la semilla de la invención u obtenido de una planta de la invención. El alimento a base de semillas preferido incluye, a título enunciativo no taxativo, alimento a base de semillas de

Brassica sp., *Brassica napus*, *B. juncea*, *Camelina sativa* o *Glycine max*. En una forma de realización, el alimento a base de semillas comprende uno o más polinucleótidos exógenos y/o construcciones genéticas como se define en la presente. En una forma de realización preferida, el alimento a base de semillas retiene parte del lípido o aceite producido en la semilla a partir del cual se obtiene el alimento a base de semillas, pero en un nivel bajo (por ejemplo, menos de 2% en peso) después de la extracción de la mayor parte del lípido o aceite. El alimento a base de semillas puede usarse como pienso para animales o como un ingrediente en la producción de alimentos.

En otro aspecto, la presente invención provee una composición que comprende uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso de la invención, la célula de acuerdo a la invención, la planta de semilla oleaginosa de la invención, la planta *Brassica* sp., *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, o el alimento a base de semillas de la invención. En formas de realización, la composición comprende un transportador adecuado para uso farmacéutico, alimenticio o agrícola, un compuesto para tratamiento de semilla, un fertilizante, otro ingrediente para alimento o pienso, o proteínas o vitaminas agregadas.

También se proveen alimentos, cosméticos o químicos que comprenden uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso de la invención, la célula de acuerdo con la invención, la planta de semilla oleaginosa de la invención, la planta *Brassica* sp., *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, el alimento a base de semillas de la invención, o la composición de la invención.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para producir un alimento, en donde el método comprende mezclar uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso de la invención, la célula de acuerdo con la invención, la

planta de semilla oleaginosa de la invención, la planta *Brassica* sp., *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, el alimento a base de semillas de la invención, o la composición de la invención, por lo menos con otro ingrediente alimenticio. El método puede comprender los pasos de mezclar, cocinar, hornear, extruir, emulsificar o formular de otra forma el alimento, o empaquetar el alimento, o analizar la cantidad de lípido o aceite en el alimento.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar o prevenir una condición que podría beneficiarse de un PUFA, preferentemente DHA y/o DPA, en donde el método comprende administrar a un sujeto uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso de la invención, la célula de acuerdo con la invención, la planta de semilla oleaginosa de la invención, la planta *Brassica* sp., *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, el alimento a base de semillas de la invención, la composición de la invención, o el alimento de la invención. En una forma de realización preferida, el PUFA se administra en la forma de una composición farmacéutica que comprende un éster de etilo del PUFA. El sujeto puede ser un humano o un animal diferente de un humano.

Los ejemplos de condiciones que podrían beneficiarse por un PUFA incluyen a, a título enunciativo no taxativo, niveles de triglicéridos séricos elevados, niveles de colesterol sérico elevados tales como niveles de colesterol de LDL elevados, arritmias cardíacas, angioplastia, inflamación, asma, psoriasis, osteoporosis, cálculos renales, SIDA, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esquizofrenia, cáncer, síndrome de alcoholismo fetal, trastorno de hiperactividad con deficiencia de atención, fibrosis quística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva, adrenoleucodistrofia, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, diabetes,

obesidad, enfermedad de Alzheimer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerativa, restenosis posterior a angioplastia, eczema, presión sanguínea elevada, agregación plaquetaria, sangrado gastrointestinal, endometriosis, síndrome premenstrual, encefalomielitis mialgica, fatiga crónica posterior infecciones virales o una enfermedad ocular.

También se provee el uso de uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso de la invención, la célula de acuerdo con la invención, la planta de semilla oleaginosa de la invención, la planta *Brassica* sp., *Brassica napus, B. juncea, Glycine max* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, el alimento a base de semillas de la invención, la composición de la invención, o el alimento de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una condición que podría beneficiarse por un PUFA preferentemente DHA y/o DPA.

La producción del medicamento puede comprender la mezcla del aceite de la invención con un transportador farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de una condición como se describe en la presente. El método puede comprender purificar primeramente el aceite y/o transesterificar, y/o fraccionar el aceite para aumentar el nivel de DHA y/o DPA. En una forma de realización particular, el método comprende tratar el lípido o aceite tal como aceite de canola para convertir los ácidos grasos en el aceite a ésteres de alquilo tales como ésteres de metilo o etilo. Puede aplicarse un tratamiento adicional tal como fraccionamiento o destilación para enriquecer el lípido o aceite en DHA y/o DPA. En una forma de realización preferida, el medicamento comprende ésteres de etilo de DHA y/o DPA. En una forma de realización incluso más preferida, el nivel de ésteres de etilo de DHA y/o DPA en el medicamento es entre 30% y 50%, o por lo menos 80% o por lo menos aproximadamente 85% o por lo menos 90% o por lo menos aproximadamente 95%. El medicamento además puede

comprender ésteres de etilo de EPA, tal como entre 30% y 50%, o por lo menos 90%, del contenido de ácidos grasos totales en el medicamento. Dichos medicamentos son adecuados para la administración a sujetos humanos o animales para el tratamiento de condiciones médicas como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para comercializar la semilla, que comprende obtener la semilla de la invención, y comercializar la semilla obtenida para una ganancia monetaria.

En una forma de realización, obtener la semilla comprende cultivar plantas de la invención y/o recolectar la semilla de las plantas.

En otra forma de realización, obtener la semilla además comprende colocar la semilla en un recipiente y/o almacenar la semilla.

En una forma de realización adicional, obtener la semilla además comprende transportar la semilla a un lugar diferente.

En aún otra forma de realización, el método además comprende transportar la semilla a un lugar diferente después que la semilla es comercializada.

En una forma de realización adicional, la comercialización se realiza usando medios electrónicos tales como una computadora.

En aún otro aspecto, la presente invención provee un proceso para producir depósitos de semillas que comprende:

a) surcar, formación de hileras y/o cosechar partes de plantas por encima de la tierra que comprenden la semilla de la invención,

b) desgranar y/o separar las partes de las plantas para separar la semilla del resto de las partes de la planta, y

c) tamizar y/o seleccionar la semilla separada en el paso b), y cargar la semilla tamizada y/o seleccionada en depósitos, produciendo de esta forma depósitos de semillas.

En una forma de realización, cuando es relevante, el lípido o aceite, preferentemente aceite de semilla, de, o útil para, la invención tiene niveles grasos aproximadamente como los provistos en una Tabla en la sección de Ejemplos, tal como semilla CT136-27-18-2 o CT136-27-18-19 de la Tabla 10, o el aceite de semilla de las Tablas 12, 20, 22, 23 o 24.

Cualquier forma de realización en la presente debe tomarse para aplicar *mutatis mutandis* a cualquier otra forma de realización a menos que se indique específicamente de otra forma.

La presente invención no está limitada en alcance por las formas de realización específicas descritas en la presente, que tienen como intención solamente el propósito de ejemplificación. Los productos, composiciones y métodos equivalentes funcionalmente están claramente dentro del alcance de la invención, como se describe en la presente.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que se indique específicamente de otra forma o que el contexto lo requiera de otra forma, la referencia a un paso simple, composición de materia, grupo de pasos o grupo de composiciones de materia deben tomarse como que abarcan uno y una pluralidad (es decir uno o más) de aquellos pasos, composiciones de materia, grupos de pasos o grupo de composiciones de materia.

La invención se describe a partir de aquí por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes y en referencia a las figuras anexas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS ANEXAS

Figura 1. Vías de biosíntesis aeróbica de DHA.

Figura 2. Mapa de la región de inserción de T-ADN entre los bordes izquierdo y derecho de pJP3416-GA7. RB indica borde derecho; LB, borde izquierdo; TER, región terminadora de la transcripción/poliadenilacion; PRO, promotor; Las regiones

codificantes están indicadas por encima de las flechas, los promotores y terminadores por debajo de las flechas. Micpu-Δ6D, Δ6-desaturasa de *Micromonas pusilla*; Pyrco-Δ6E, Δ6-elongasa de *Pyramimonas cordata*; Pavsa-Δ5D, Δ5-desaturasa de *Pavlova salina*; Picpa-ω3D, ω3-desaturasa de *Pichia pastoris*; Pavsa-Δ4D, Δ4-desaturasa de *P. salina*; Lackl-Δ12D, Δ12-desaturasa de *Lachancea kluyveri*; Pyrco-Δ5E, Δ5-elongasa *Pyramimonas cordata*. NOS indica la región del terminador de transcripción/poliadenilación de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, promotor de napina truncado de *Brassica napus*; FAE1, promotor FAE1 de *Arabidopsis thaliana*; Lectina, región del terminador de transcripción/poliadenilación de lectina de *Glycine max*; Cnl1 y Cnl2 indica el promotor o terminador de conlinina1 o conlinina2 de *Linum usitatissimum*. MAR indica la región de unión a matriz Rb7 de *Nicotiana tabacum*.

Figura 3. Mapa de la región de inserción de T-ADN entre el borde izquierdo y derecho de pJP3404. Las etiquetas son como en la Figura 2.

Figura 4. Contenido de aceite (peso en peso) vs. contenido de DHA, como un porcentaje del contenido de ácidos grasos totales de lípido de semillas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 5. Análisis de distribución posicional por RMN en A) aceite de atún y, B) aceite de semilla transgénica para DHA de *Arabidopsis* semilla. Los picos indicados “DHA-alfa” representan la cantidad de DHA presente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de TAG (sin preferencia posicional esto sería igual a 66% del DHA total) mientras que los picos indicados “DHA-beta” representan la cantidad de DHA presente en la posición *sn*-2 de TAG (sin preferencia esto sería igual a 33% de DHA).

Figura 6. Análisis por LC-MS de las especies principales de triacilgliceroles que contienen DHA en semillas transgénicas de *A. thaliana* en desarrollo (gris) y maduras (negro). El número luego de DHA indica el número total de átomos de carbono y el

número total de enlaces dobles en los otros dos ácidos grasos. Por lo tanto DHA/34:1 también puede designarse TAG 56:7, etc.

Figura 7. (A) Estructura básica de fitoesterol con numeración de anillos y cadena lateral. (B) Estructuras químicas de algunos de los fitoesteroles.

Figura 8. Árbol filogenético de LPAAT conocidas.

Figura 9. Las diferentes enzimas de intercambio de acilo que transfieren ácidos grasos entre PC, conjuntos de CoA, y conjuntos de TAG. Adaptado de Singh y col. (2005).

Figura 10. Niveles de DHA en el contenido de ácidos grasos totales de aceite de semilla obtenidos de semillas T2 individuales de semillas de *B. napus* transformada con el T-ADN de la construcción GA7-modB. Cada punto muestra el nivel de DHA en una semilla individual, con cada columna de puntos representando semillas T2 de una planta T1 individual.

CLAVES EN EL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 – secuencia de nucleótidos de pJP3416-GA7.

SEQ ID NO:2 – secuencia de nucleótidos de pGA7- mod_B.

SEQ ID NO:3 – Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ12-desaturasa de *Lachancea kluyveri* en plantas.

SEQ ID NO:4 - Δ12-desaturasa de *Lachancea kluyveri*.

SEQ ID NO:5 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de ω3-desaturasa de *Pichia pastoris* en plantas.

SEQ ID NO:6 - ω3-desaturasa de *Pichia pastoris*.

SEQ ID NO:7 – Marco de lectura abierto que codifica para Δ6-desaturasa de *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO:8 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ6-desaturasa de *Micromonas pusilla* en plantas.

SEQ ID NO:9 - Δ6-desaturasa de *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO:10 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO:11 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* en plantas.

SEQ ID NO:12 - Δ6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus*.

SEQ ID NO:13 - Δ6-desaturasa de *Ostreococcus tauri*.

SEQ ID NO:14 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ6-elongasa de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:15 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ6-elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (truncaad en el extremo 3' y que codifica para elongasa funcional).

SEQ ID NO:16 - Δ6-elongasa de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:17 –Δ6-elongasa truncada de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:18 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ5-desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:19 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ5-desaturasa *Pavlova salina* en plantas.

SEQ ID NO:20 - Δ5-desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:21 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ5-desaturasa de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:22 - Δ5-desaturasa de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:23 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ5-elongasa de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:24 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ5-elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas.

SEQ ID NO:25 - Δ5-elongasa de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO:26 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ4-desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:27 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ4-desaturasa de *Pavlova salina* en plantas.

SEQ ID NO:28 - Δ4-desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:29 - Δ9-elongasa de *Isochrysis galbana*.

SEQ ID NO:30 - Marco de lectura abierto con optimización de codones para la expresión de Δ9-elongasa de *Emiliania huxleyi* en plantas.

SEQ ID NO:31 - *CCMP1516* Δ9-elongasa de *Emiliania huxleyi*.

SEQ ID NO:32 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ9-elongasa de *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO:33 - Δ9-elongasa de *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO:34 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ9-elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:35 - Δ9-elongasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:36 - Marco de lectura abierto que codifica para Δ8-desaturasa *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:37 - Δ8-desaturasa de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO:38 – supresor viral V2.

SEQ ID NO:39 – Marco de lectura abierto que codifica para el supresor viral V2.

SEQ ID NO: 40 - LPAAT2 *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO: 41 - LPAAT de *Limnanthes alba*.

SEQ ID NO: 42 –LPAAT de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 43 – LPAAT de *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO: 44 –LPAAT de *Mortierella alpina*.

SEQ ID NO: 45 –LPAAT de *Braccisa napus*.

SEQ ID NO: 46 –LPAAT de *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 47 - ω3-desaturasa de *Phytophthora infestans*.

SEQ ID NO: 48 - ω3-desaturasa de *Thalassiosira pseudonana*.

SEQ ID NO: 49 - ω3-desaturasa de *Pythium irregulare*.

SEQ ID NOs: 50 a 58 – cebadores/sondas de oligonucleótidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Técnicas y definiciones generales

A menos que se defina específicamente de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente deben ser considerados como que tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por una persona con experiencia ordinaria en el arte (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, síntesis de ácidos grasos, plantas transgénicas, células recombinantes, química de proteínas, y bioquímica).

A menos que se indique de otra forma, la proteína, cultivo celular, y técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándares, bien conocidos por aquellos con experiencia en el arte. Dichas técnicas se describen y explican a lo largo de la literatura en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), ADN Cloning: A Practical Approach, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), F.M. Ausubel y col. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow y David

Lane (editores), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan y col. (editores), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

El término “y/o”, por ejemplo, “X y/o Y” debe interpretarse que se refiere a “X e Y” o “X o Y” y debe considerarse que proveen apoyo explícito a ambos significados o para cada significado.

Tal como se usa en la presente, el término “aproximadamente” a menos que se indique lo contrario, se refiere a +/- 10%, más preferentemente +/- 5%, más preferentemente +/- 1% del valor designado.

A lo largo de esta memoria descriptiva la palabra "que comprende", o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", serán interpretadas como que implican la inclusión de un elemento indicado, entero o paso, o grupo de elementos, enteros o pasos, pero sin la exclusión de cualquier otro elemento, entero o paso, o grupo de elementos, enteros o pasos.

Definiciones seleccionadas

Tal como se usan en la presente, los términos "lípido vegetal extraído" y “lípido vegetal aislado” se refieren a una composición de lípido que ha sido extraída de, por ejemplo por aplastamiento, una planta o parte de la misma tal como una semilla. El lípido extraído puede ser una composición relativamente en crudo obtenida por, por ejemplo, ruptura de una semilla de planta, o una composición más purificada en donde se ha eliminado la mayor parte, o todos, de uno o más o cada uno de agua, ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono derivados del material vegetal. Los ejemplos de métodos de purificación se describen más adelante. En una forma de realización, el lípido vegetal extraído o aislado comprende por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos

aproximadamente 95% (peso en peso) de lípido en peso de la composición. El lípido puede ser solido o líquido a temperatura ambiente, cuando es líquido es considerado un aceite. En una forma de realización, el lípido extraído de la invención no ha sido mezclado con otro lípido tal como DHA y/o DPA producido a partir de otra fuente (por ejemplo, DHA de aceite de pescado). En una forma de realización, luego de la extracción la proporción de uno o más o todos de, ácido oleico a DHA y/o DPA, ácido palmítico a DHA y/o DPA, ácido linoleico a DHA y/o DPA, y ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales, no se ha alterado significativamente (por ejemplo, no mayor de un 10% o 5% de alteración) en comparación con la relación en la semilla o célula intacta. En otra forma de realización, el lípido vegetal extraído no ha sido expuesto a un procedimiento, tal como hidrogenación o fraccionamiento, el cual puede alterar la proporción de uno o más o todos de, ácido oleico a DHA y/o DPA, ácido palmítico a DHA y/o DPA, ácido linoleico a DHA y/o DPA, y ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales, en comparación a la relación en la semilla o célula intacta. Cuando el lípido vegetal extraído de la invención está comprendido en un aceite, el aceite además puede comprender moléculas no ácido graso tales como esteroles.

Tal como se usa en la presente, los términos "aceite vegetal extraído" y “aceite vegetal aislado” se refieren a una sustancia o composición que comprende el lípido vegetal extraído o lípido vegetal aislado y el cual es un líquido a temperatura ambiente. El aceite se obtiene de una planta o parte de la misma tal como semilla. El aceite extraído o aislado puede ser una composición relativamente en crudo obtenida por, por ejemplo, ruptura de una semilla de planta, o una composición más purificada en donde se ha eliminado la mayor parte, o todo, de uno o más o cada uno de agua, ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono derivados del material vegetal. La composición puede comprender otros componentes que pueden ser lípidos o no lípidos. En una forma de realización, la composición de aceite comprende por lo

menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95% (peso en peso) de lípido vegetal extraído. En una forma de realización, el aceite extraído de la invención no ha sido mezclado con ningún otro aceite tal como DHA y/o DPA producido a partir de otra fuente (por ejemplo, DHA de aceite de pescado). En una forma de realización, luego de la extracción, la proporción de uno o más o todos de, ácido oleico a DHA y/o DPA, ácido palmítico a DHA y/o DPA, ácido linoleico a DHA y/o DPA, y ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales, no se ha alterado significativamente (por ejemplo, no más de un 10% o 5% de alteración) en comparación con la relación en la semilla o célula intacta. En otra forma de realización, el aceite vegetal extraído no ha sido expuesto a un procedimiento, tal como hidrogenación o fraccionamiento, el cual puede alterar la proporción de uno o más o todos de, ácido oleico a DHA y/o DPA, ácido palmítico a DHA y/o DPA, ácido linoleico a DHA y/o DPA, y ácidos grasos ω6 totales: ácidos grasos ω3 totales, en comparación con la relación en la semilla o célula intacta. El aceite vegetal extraído de la invención puede comprender moléculas no ácido graso tales como esteroles.

Tal como se usa en la presente, los términos tales como “lípido microbiano extraído” o “aceite microbiano extraído” tienen significados análogos a los correspondientes términos "lípido vegetal extraído" y "aceite vegetal extraído" respectivamente, siendo la principal diferencia la fuente del lípido o aceite.

Tal como se usa en la presente, un “aceite” es una composición que comprende predominantemente lípido y el cual es un líquido a temperatura ambiente. Por ejemplo, el aceite de la invención preferentemente comprende por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% o por lo menos 90% lípido en peso. Típicamente, un aceite purificado comprende por lo menos 90% de triacilgliceroles (TAG) en peso del lípido en el aceite. Los componentes menores de un aceite tales

como diacilgliceroles (DAG), ácidos grasos libres (FFA), fosfolípidos y esteroles pueden estar presentes como se describe en la presente.

Tal como se usa en la presente, el término "ácido graso" se refiere a un ácido carboxílico (o ácido orgánico), con frecuencia con una cola alifática larga, saturada o insaturada. Típicamente los ácidos grasos tienen una cadena de enlaces carbono-carbono de por lo menos 8 átomos de carbono de longitud, más preferentemente por lo menos 12 carbonos de longitud. Los ácidos grasos preferidos de la invención tienen cadenas de carbono de entre 18 y 22 átomos de carbono (ácidos grasos C18, C20, C22), más preferentemente 20-22 átomos de carbono (C20, C22) y más preferentemente 22 átomos de carbono (C22). La mayoría de los ácidos grasos de origen natural tienen un número par de átomos de carbono debido a que su biosíntesis involucra acetato que tiene dos átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden estar en un estado libre (no esterificado) o en una forma esterificada tal como parte de un triglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, acil-CoA (tio-éster) unido u otra forma unida. El ácido graso puede estar esterificado como un fosfolípido tal como una forma fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol. En una forma de realización, el ácido graso está esterificado a un grupo metilo o etilo, tal como, por ejemplo, un éster de metilo o etilo de un PUFA C20 o C22. Los ácidos grasos preferidos son los ésteres de metilo o etilo de EPA, DPA o DHA, o las mezclas EPA y DHA, o EPA, DPA y DHA, o EPA y DPA.

Los "ácidos grasos saturados" no contienen ningún enlace doble u otro grupo funcional a lo largo de la cadena. El término "saturado" se refiere a un hidrógeno, en todos los carbonos (aparte del grupo ácido carboxílico [-COOH]) contiene tantos hidrógenos como sea posible. En otras palabras, el extremo omega (ω) contiene 3 hidrógenos (-CH3-) y cada carbono dentro de la cadena contiene 2 hidrógenos (-CH2-).

Los "ácidos grasos insaturados" son de forma similar a los ácidos grasos saturados, excepto en que uno o más grupos funcionales alcaleno existen a lo largo de la cadena, con cada alcaleno sustituyendo una parte "-CH2-CH2-" con enlaces simples de la cadena con una porción "-CH=CH-" con enlaces dobles (es decir, un carbono unido por doble enlace a otro carbono). Los dos átomos de carbono siguientes en la cadena que están unidos a cada lado del enlace doble pueden estar en una configuración *cis* o *trans*, preferentemente en la configuración *cis*. En una forma de realización, el lípido o aceite o la invención tiene una composición de ácidos grasos que comprende menos de 1% de ácidos grasos que tiene un enlace doble carbono-carbono en la configuración trans (ácidos grasos trans).

Tal como se usa en la presente, el término "ácido graso monoinsaturado" se refiere a un ácido graso que comprende por lo menos 12 átomos de carbono en su cadena de carbonos y solo un grupo alcaleno (enlace doble carbono-carbono) en la cadena. Tal como se usa en la presente, los términos "ácido graso poliinsaturado" o "PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende por lo menos 12 átomos de carbono en su cadena de carbonos y por lo menos dos grupos alcaleno (enlaces dobles carbono-carbono).

Tal como se usa en la presente, los términos "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" y "LC-PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende por lo menos 20 átomos de carbono en su cadena de carbonos y por lo menos dos enlaces dobles carbono-carbono, y por lo tanto incluyen VLC-PUFA. Tal como se usan en la presente, los términos "ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga" y "VLC-PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende por lo menos 22 átomos de carbono en su cadena de carbonos y por lo menos tres enlaces dobles carbono-carbono. Ordinariamente, el número de átomos de carbono en la cadena de carbonos de los ácidos grasos se refiere a una cadena de carbonos no ramificada. Si la cadena de

carbonos está ramificada, el número de átomos de carbono excluye aquellos en los grupos laterales. En una forma de realización, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga es un ácido graso ω3, es decir, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el tercer enlace carbono-carbono del extremo metilo del ácido graso. En otra forma de realización, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga es un ácido graso ω6, es decir, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el sexto enlace carbono-carbono del extremo metilo del ácido graso. En una forma de realización adicional, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona del grupo que consiste en; ácido araquidónico (ARA, 20:4Δ5,8,11,14; ω6), ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4Δ8,11,14,17, ω3), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5Δ5,8,11,14,17; ω3), ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5Δ7,10,13,16,19, ω3), o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6Δ4,7,10,13,16,19, ω3). El LC-PUFA también puede ser ácido dihomo-γ-linoleico (DGLA) o ácido eicosatrienoico (ETrA, 20:3Δ11,14,17, ω3). Resultará fácilmente evidente que el LC-PUFA que se produce de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de cualquiera o todos los anteriores y puede incluir otros LC-PUFA o derivados de cualquiera de estos LC-PUFA. En una forma de realización preferida, los ácidos grasos ω3 son al menos DHA y/o DPA, preferentemente, DPA y DHA, o EPA, DPA y DHA, o EPA y DPA. Tal como se extrae de la planta, el DHA está presente en el lípido o aceite en un nivel de entre 20,1 y 30% o entre 20,1% y 35%, preferentemente entre 30% y 35% de la composición de ácidos grasos totales. Por ejemplo, el DHA está presente en un nivel entre 30,1% y 35% de la composición de ácidos grasos totales. En una forma de realización, el nivel de DHA es mayor que el nivel de DPA, más preferentemente mayor que el nivel de cada uno de EPA y DPA, más preferentemente mayor que el nivel combinado de EPA y DPA. En una forma de realización alternativa, el DPA está presente en un nivel entre aproximadamente 7% y 30% o 35% y DHA está ausente o, si está presente, está

presente en un nivel menor de 2,0%, preferentemente menor de 1,0%, más preferentemente menor de 0,5% de la composición de ácidos grasos totales y más preferentemente ausente o no detectable. Esto puede lograrse por ausencia de una actividad Δ4-desaturasa en la célula. En una forma de realización, el nivel de DPA es mayor que el nivel de EPA, más preferentemente mayor que el nivel de cada uno de EPA y DHA, más preferentemente mayor que el nivel combinado de EPA y DHA. En esta forma de realización, DHA puede estar ausente o, si está presente, está presente en un nivel menor de 0,5% de la composición de ácidos grasos totales.

Más aún, como se usan en la presente, los términos "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" (LC-PUFA) y "ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga" (VLC-PUFA) se refieren a que el ácido graso está en un estado libre (no esterificado) o en una forma esterificada tal como una parte de un triglicérido (triacilglicerol), diacilglicérido, monoacilglicérido, acil-CoA unido u otra forma unida. En el triglicérido, el LC-PUFA o VLC-PUFA tal como DHA o DPA puede estar esterificado en las posiciones *sn*-1/3 o *sn*-2, o el triglicérido puede comprender dos o tres grupos acilo seleccionados de los grupos acilo LC-PUFA y VLC-PUFA. Por ejemplo, el triglicérido puede comprender DHA o DPA en ambas posiciones *sn*-1 y *sn*-3. El ácido graso puede estar esterificado como un fosfolípido tal como forma fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol. Por lo tanto, el LC-PUFA puede estar presente como una mezcla de formas en el lípido de una célula o un aceite purificado o lípido extraído de células, tejidos u organismos. En formas de realización preferidas, la invención provee aceite que comprende por lo menos 75% o por lo menos 85% de triacilgliceroles, con el remanente presente como otras formas de lípido tales como aquellas mencionadas, en donde al menos dichos triacilgliceroles comprenden el LC-PUFA. Posteriormente el aceite puede purificarse o tratarse adicionalmente, por ejemplo por hidrólisis con una

base fuerte para liberar los ácidos grasos libres, o por transesterificación, destilación o similar.

Tal como se usa en la presente, “ácidos grasos ω6 totales” o “contenido total de ácidos grasos ω6” o similares se refieren a la suma de todos los ácidos grasos ω6, esterificados y no esterificados, en el lípido extraído, aceite, célula recombinante, parte de planta o semilla, de acuerdo a como lo determine el contexto, expresado como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Estos ácidos grasos ω6 incluyen (si está presente) LA, GLA, DGLA, ARA, EDA y ω6-DPA, y excluyen cualquier ácido graso ω3 y ácido graso monoinsaturado. Los ácidos grasos ω6 presentes en las plantas, semillas, lípido o aceites de la invención están todos incluidos en la clase de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

Tal como se usa en la presente, “ácidos grasos ω6 nuevos” o “contenido de ácidos grasos ω6 nuevos” o similares se refiere a la suma de todos los ácidos grasos ω6 excluyendo LA, esterificados y no esterificados, en el lípido extraído, aceite, célula recombinante, parte de planta o semilla, de acuerdo a como lo determine el contexto, expresado como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Estos ácidos grasos ω6 nuevos son los ácidos grasos que son producidos en las células, plantas, partes de plantas y semillas de la invención por la expresión de las construcciones genéticas (polinucleótidos exógenos) introducidas las células, e incluyen (si está presente) GLA, DGLA, ARA, EDA y ω6-DPA, pero excluyen LA y cualquier ácido graso ω3 y ácido graso monoinsaturado. Los contenidos totales de ácidos grasos ω6 y contenidos de ácidos grasos ω6 nuevos ejemplificativos se determinan por conversión de ácidos grasos en una muestra a FAME y por análisis por GC, como se describe en el Ejemplo 1.

Tal como se usa en la presente, “ácidos grasos ω3 totales” o “contenido total de ácidos grasos ω3” o similares se refiere a la suma de todos los ácidos grasos ω3,

esterificados y no esterificados, en el lípido extraído, aceite, célula recombinante, parte de planta o semilla, de acuerdo a como lo determine el contexto, expresado como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Estos ácidos grasos ω3 incluyen (si está presente) ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA, y excluyen cualquier ácido graso ω6 y ácido graso monoinsaturado. Los ácidos grasos ω3 presentes en las plantas, semillas, lípido o aceites de la invención están todos incluidos en la clase de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

Tal como se usa en la presente, “ácidos grasos ω3 nuevos” o “contenido de ácidos grasos ω3 nuevos” o similares se refiere a la suma de todos los ácidos grasos ω3 excluyendo ALA, esterificados y no esterificados, en el lípido extraído, aceite, célula recombinante, parte de planta o semilla, de acuerdo a como lo determine el contexto, expresado como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Estos ácidos grasos ω3 nuevos son los ácidos grasos ω3 que son producidos en las células, plantas, partes de plantas y semillas de la invención por la expresión de las construcciones genéticas (polinucleótidos exógenos) introducidas en las células, e incluyen (si está presente) SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA, pero excluyen ALA y cualquier ácido graso ω6 y ácido graso monoinsaturado. El contenido total de ácidos grasos ω3s y contenido de ácidos grasos ω3 nuevos ejemplificativos se determinan por conversión de ácidos grasos en una muestra a FAME y por análisis por GC, como se describe en el Ejemplo 1.

Tal como lo apreciaría la persona con experiencia, el término “obtener una parte de planta” como un paso en el proceso de la invención puede incluir obtener una o más partes de plantas para usar en el proceso. Obtener la parte de la planta incluye recolectar la parte de la planta de una planta tal como con un recolector mecánico, o comprar la parte de planta, o recibir la parte de la planta de un proveedor. En otro ejemplo, obtener una parte de planta puede ser adquirir la planta de alguien más que

ha recolectado la parte de planta.

Las proteínas desaturasa, elongasa y acil transferasa y los genes que codifican para ellas que pueden usarse en la invención son cualquiera de aquellas conocidas en el arte u homólogos o derivados de las mismas. Los ejemplos de dichos genes y tamaños de proteínas codificadas se listan en la Tabla 1. Las enzimas desaturasas que han mostrado que participan en la biosíntesis de LC-PUFA pertenecen todas al grupo de las llamadas desaturasas "de extremo frontal". Las proteínas preferidas, o combinaciones de proteínas, son aquellas codificadas por las construcciones genéticas provistas en la presente como SEQ ID NOs: 1 y 2.

Tabla 1. Genes clonados involucrados en la biosíntesis de LC-PUFA

Enzima	**Tipo de organismo**	**Especie**	**Nos. de acceso**	**Tamaño de proteína (aa)**	**Referencias**
Δ4-desaturasa	Protista	*Euglena gracilis*	AY278558	541	Meyer y col., 2003
	Algas	*Pavlova lutherii*	AY332747	445	Tonon y col., 2003
		Isochrysis galbana	AAV33631	433	Pereira y col., 2004b
		Pavlova salina	AAY15136	447	Zhou y col., 2007
	Thraustochytrid	*Thraustochytrium aureum*	AAN75707 AAN75708 AAN75709	515	N/A

			AAN75710		
		Thraustochytrium sp. ATCC21685	AAM09688	519	Qiu y col. 2001
Δ5-desaturasa	Mamíferos	*Homo sapiens*	AF199596	444	Cho y col., 1999b Leonard y col., 2000b
	Nematodes	*Caenorhabditis elegans*	AF11440, NM_069350	447	Michaelson y col., 1998b; Watts y Browse, 1999b
	Hongos	*Mortierella alpina*	AF067654	446	Michaelson y col., 1998a; Knutzon y col., 1998
		Pythium irregulare	AF419297	456	Hong y col., 2002a
		Dictyostelium discoideum	AB022097	467	Saito y col., 2000
		Saprolegnia diclina		470	WO02081668
	Diatomeas	*Phaeodactylum tricornutum*	AY082392	469	Domergue y col., 2002
	Algas	*Thraustochytriu*	AF489588	439	Qiu y col.,

		m sp			2001
		Thraustochytrium aureum		439	WO02081668
		Isochrysis galbana		442	WO02081668
	Musgos	*Marchantia polymorpha*	AY583465	484	Kajikawa y col., 2004

Enzima	**Tipo de organismo**	**Especie**	**Nos. de acceso**	**Tamaño de proteína (aa)**	**Referencias**
Δ6-desaturasa	Mamíferos	*Homo sapiens*	NM_013402	444	Cho y col., 1999a; Leonard y col., 2000
		Mus musculus	NM_019699	444	Cho y col., 1999a
	Nematodes	*Caenorhabditis elegans*	Z70271	443	Napier y col., 1998
	Plantas	*Borago officinales*	U79010	448	Sayanova y col., 1997
		Echium	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto y col., 2002
		Primula vialii	AY234127	453	Sayanova y

					col., 2003
		Anemone leveillei	AF536525	446	Whitney y col., 2003
	Musgos	*Ceratodon purpureus*	AJ250735	520	Sperling y col., 2000
		Marchantia polymorpha	AY583463	481	Kajikawa y col., 2004
		Physcomitrella patens	CAA11033	525	Girke y col., 1998
	Hongos	*Mortierella alpina*	AF110510 AB020032	457	Huang y col., 1999; Sakuradani y col., 1999
		Pythium irregulare	AF419296	459	Hong y col., 2002a
		Mucor circinelloides	AB052086	467	NCBI*
		Rhizopus sp.	AY320288	458	Zhang y col., 2004
		Saprolegnia diclina		453	WO02081668
	Diatomeas	*Phaeodactylum tricornutum*	AY082393	477	Domergue y col., 2002
	Bacterias	*Synechocystis*	L11421	359	Reddy y col., 1993
	Algas	*Thraustochytrium*		456	WO02081668

		aureum			
Δ5/Δ6-desaturasa bifuncional	Pescado	*Danio rerio*	AF309556	444	Hastings y col., 2001
C20 Δ8-desaturasa	Algas	*Euglena gracilis*	AF139720	419	Wallis y Browse, 1999
	Plantas	*Borago officinales*	AAG43277	446	Sperling y col., 2001

Enzima	**Tipo de organismo**	**Especie**	**Nos. de acceso**	**Tamaño de proteína (aa)**	**Referencias**
Δ6-elongasa	Nematodes	Caenorhabditis elegans	NM_069288	288	Beaudoin y col., 2000
	Musgos	*Physcomitrella patens*	AF428243	290	Zank y col., 2002
		Marchantia polymorpha	AY583464	290	Kajikawa y col., 2004
	Hongos	*Mortierella alpina*	AF206662	318	Parker-Barnes y col., 2000
	Algas	*Pavlova lutheri***		501	WO 03078639
		Thraustochytrium	AX951565	271	WO 03093482
		*Thraustochytrium sp***	AX214454	271	WO 0159128
PUFA-	Mamíferos	*Homo sapiens*	AF231981	299	Leonard y

elongasa					col., 2000b; Leonard y col., 2002
		Rattus norvegicus	AB071985	299	Inagaki y col., 2002
		*Rattus norvegicus***	AB071986	267	Inagaki y col., 2002
		Mus musculus	AF170907	279	Tvrdik y col., 2000
		Mus musculus	AF170908	292	Tvrdik y col., 2000
	Pescado	*Danio rerio*	AF532782	291 (282)	Agaba y col., 2004
		*Danio rerio***	NM_199532	266	Lo y col., 2003
	Gusano	*Caenorhabditis elegans*	Z68749	309	Abbott y col., 1998 Beaudoin y col., 2000
	Algas	*Thraustochytrium aureum***	AX464802	272	WO 0208401-A2
		*Pavlova lutheri***		320	WO 03078639
Δ9-elongasa	Algas	*Isochrysis galbana*	AF390174	263	Qi y col., 2002
		Euglena gracilis		258	WO 08/128241
Δ5-	Algas	*Ostreococcus*	AAV67798	300	Meyer y col.,

elongasa		*tauri*			2004
		Pyramimonas cordata		268	WO 2010/057246
		Pavlova sp. CCMP459	AAV33630	277	Pereira y col., 2004b
		Pavlova salina	AAY15135	302	Robert y col., 2009
	Diatomeas	*Thalassiosira pseudonana*	AAV67800	358	Meyer y col., 2004
	Pescado	*Oncorhynchus mykiss*	CAM55862	295	WO 06/008099
	Musgos	*Marchantia polymorpha*	BAE71129	348	Kajikawa y col., 2006

* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ** Función no probada/no demostrada

Tal como se usa en la presente, el término “desaturasa terminal” se refiere a un miembro de una clase de enzimas que introducen un enlace doble entre el grupo carboxilo y una parte insaturada preexistente de la cadena acilo de lípidos, que se caracterizan estructuralmente por la presencia de un dominio N terminal citocromo b5, junto con un dominio típico de desaturasa de ácido graso que incluye tres cajas de histidina altamente conservadas (Napier y col., 1997).

La actividad de cualquiera de las elongasas o desaturasas para usar en la invención puede ensayarse por expresión de un gen que codifica para la enzima en una célula tal como, por ejemplo, una célula vegetal o preferentemente en embriones somáticos o plantas transgénicas, y determinar si la célula, embrión o planta tiene una capacidad aumentada para producir LC-PUFA en comparación con una célula, embrión o planta comparable en donde no se expresa la enzima.

En una forma de realización, una o más de las desaturasas y/o elongasas para usar en la invención pueden purificarse de una microalga, es decir es idéntica en secuencia de aminoácidos a un polipéptido que puede purificarse de una microalga.

Si bien ciertas enzimas se describen específicamente en la presente como "bifuncionales", la ausencia de dicho término no necesariamente implica que una enzima particular no posee una actividad diferente de la definida específicamente.

Desaturasas

Tal como se usa en la presente, el término "desaturasa" se refiere una enzima que tiene la capacidad de introducir un enlace doble carbono-carbono en el grupo acilo de un sustrato ácido graso que típicamente está en una forma esterificada tal como, por ejemplo, ésteres acil-CoA. El grupo acilo puede estar esterificado a un fosfolípido tal como fosfatidilcolina (PC), o a una proteína transportadora de acilo (ACP), o en una forma de realización preferida a CoA. Por lo tanto las desaturasas generalmente pueden categorizarse en tres grupos. En una forma de realización, la desaturasa es una desaturasa terminal.

Tal como se usa en la presente, una "Δ4-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 4to enlace carbono-carbono del extremo carboxilo de un sustrato ácido graso. La "Δ4-desaturasa" al menos tiene la capacidad de convertir DPA a DHA. Preferentemente, la "Δ4-desaturasa" tiene la capacidad de convertir DPA-CoA a DHA-CoA, es decir es una acil-CoA desaturasa. En una forma de realización, la "Δ4-desaturasa" tiene la capacidad de convertir DPA esterificado en la posición *sn*-2 de PC a DHA-PC. Preferentemente la Δ4-desaturasa tiene mayor actividad sobre DPA-CoA que sobre DPA-PC. El paso de desaturación para producir DHA a partir de DPA es catalizado por una Δ4-desaturasa en organismos diferentes de mamíferos, y se ha aislado un gen que codifica para esta enzima a partir de la especie protista de agua

dulce *Euglena gracilis* y la especie marina *Thraustochytrium* sp. (Qiu y col., 2001; Meyer y col., 2003). En una forma de realización, la Δ4-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:28, o una Δ4-desaturasa de *Thraustochytrium* sp., un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a SEQ ID NO:28. En una forma de realización, una planta, parte de planta (tal como semilla) o célula de, o usada en, la invención que produce niveles altos de DPA, tal como entre 5% y 35% del contenido total de ácidos grasos que pueden extraerse es DPA, no comprende un gen que codifica para una Δ4-desaturasa funcional.

Tal como se usa en la presente, una "Δ5-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 5to enlace carbono-carbono del extremo carboxilo de un sustrato ácido graso. En una forma de realización, el sustrato ácido graso es ETA y la enzima produce EPA. Preferentemente, la "Δ5-desaturasa" tiene la capacidad de convertir ETA-CoA a EPA-CoA, es decir es una acil-CoA desaturasa. En una forma de realización, la "Δ5-desaturasa" tiene la capacidad de convertir ETA esterificado en la posición *sn*-2 de PC. Preferentemente la Δ5-desaturasa tiene mayor actividad sobre ETA-CoA que sobre ETA-PC. Los ejemplos de Δ5-desaturasas se listan en Ruiz-Lopez y col. (2012) y Petrie y col. (2010a) y en la Tabla 1 en la presente. En una forma de realización, la Δ5-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:20, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a SEQ ID NO:20. En otra forma de realización, la Δ5-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:22, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 53% idéntica a SEQ ID NO:22. En otra forma de realización, la Δ5-desaturasa

es de *Thraustochytrium* sp o *Emiliania huxleyi*.

Tal como se usa en la presente, una "Δ6-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 6to enlace carbono-carbono del extremo carboxilo de un sustrato ácido graso. En una forma de realización, el sustrato ácido graso es ALA y la enzima produce SDA. Preferentemente, la "Δ6-desaturasa" tiene la capacidad de convertir ALA-CoA a SDA-CoA, es decir es una acil-CoA desaturasa. En una forma de realización, la "Δ6-desaturasa" tiene la capacidad de convertir ALA esterificado en la posición *sn*-2 de PC. Preferentemente la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad sobre ALA-CoA que sobre ALA-PC. La Δ6-desaturasa también puede tener actividad como una Δ5-desaturasa, siendo llamada una Δ5/Δ6 desaturasa bifuncional, con la condición que tenga mayor actividad Δ6-desaturasa sobre ALA que actividad Δ5-desaturasa sobre ETA. Los ejemplos de Δ6-desaturasas se listan en Ruiz-Lopez y col. (2012) y Petrie y col. (2010a) y en la Tabla 1 en la presente. Las Δ6-desaturasas preferidas son de *Micromonas pusilla*, *Pythium irregulare* o *Ostreococcus taurii*.

En una forma de realización, la Δ6-desaturasa se caracteriza adicionalmente por tener por lo menos dos, preferentemente todo y preferentemente en una célula vegetal, de lo siguiente: i) mayor actividad de Δ6-desaturasa sobre ácido α-linolénico (ALA, 18:3Δ9,12,15, ω3) que sobre ácido linoleico (LA, 18:2Δ9,12, ω6) como sustrato ácido graso; ii) mayor actividad de Δ6-desaturasa sobre ALA-CoA como sustrato ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato ácido graso; y iii) actividad Δ8-desaturasa sobre ETrA. Los ejemplos de dichas Δ6-desaturasas se proveen en la Tabla 2.

Tabla 2. Desaturasas demostradas que tienen actividad sobre un sustrato acil-CoA

Enzima	**Tipo de**	**Especie**	**Nos. de**	**Tamañ**	**Referencias**

	organismo		**acceso**	**o de proteína (aa)**	
Δ6-desaturasa	Algas	*Mantoniella squamata*	CAQ30479	449	Hoffmann y col., 2008
		Ostreococcus tauri	AAW70159	456	Domergue y col., 2005
		Micromonas pusilla	EEH58637		Petrie y col., 2010a (SEQ ID NO: 7)
Δ5-desaturasa	Algas	*Mantoniella squamata*	CAQ30478	482	Hoffmann y col., 2008
	Plantas	*Anemone leveillei*	N/A		Sayanova y col., 2007
ω3-desaturasa	Hongos	*Pythium aphanidermatum*	FW362186.1	359	Xue y col., 2012; WO2008/054565
	Hongos	*Phytophthora*	FW362214	363	Xue y col.,

	(oomicetes)	*sojae*	.1		2012; WO2008/054565
	Hongos(oomicetes)	*Phytophthora ramorum*	FW362213.1	361	Xue y col., 2012; WO2008/054565

En una forma de realización, la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad sobre un sustrato ω3 que el correspondiente sustrato ω6 y tiene actividad sobre ALA para producir ácido octadecatetraenoico (ácido estearidónico, SDA, 18:4Δ6,9,12, 15, ω3) con una eficacia de por lo menos 30%, más preferentemente por lo menos 40%, o más preferentemente por lo menos 50% cuando se expresa a partir de un polinucleótido exógeno en una célula recombinante tal como una célula vegetal, o por lo menos 35% cuando se expresa en una célula de levaduras. En una forma de realización, la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad, por ejemplo, por lo menos aproximadamente una actividad 2 veces mayor de Δ6-desaturasa, sobre ALA que LA como sustrato ácido graso. En otra forma de realización, la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 5 veces mayor actividad de Δ6-desaturasa o por lo menos actividad 10 veces mayor, sobre ALA-CoA como sustrato ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato ácido graso. En una forma de realización adicional, la Δ6-desaturasa tiene actividad sobre ambos sustratos de ácido graso ALA-CoA y sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC.

En una forma de realización, la Δ6-desaturasa no tiene actividad Δ5-desaturasa detectable sobre ETA. En otra forma de realización, la Δ6-desaturasa comprende

aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 77% idéntica a SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13. En otra forma de realización, la Δ6-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 67% idéntica a una o ambas SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13. La Δ6-desaturasa también puede tener actividad Δ8-desaturasa.

Tal como se usa en la presente, una "Δ8-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 8vo enlace carbono-carbono del extremo carboxilo de un sustrato ácido graso. La Δ8-desaturasa tiene por lo menos la capacidad de convertir ETrA a ETA. Preferentemente, la Δ8-desaturasa tiene la capacidad de convertir ETrA-CoA a ETA-CoA, es decir es una acil-CoA desaturasa. En una forma de realización, la Δ8-desaturasa tiene la capacidad de convertir ETrA esterificado en la posición *sn*-2 de PC. Preferentemente la Δ8-desaturasa tiene mayor actividad sobre ETrA-CoA que sobre ETrA-PC. La Δ8-desaturasa también puede tener actividad como una Δ6-desaturasa, siendo llamada una Δ6/Δ8 desaturasa bifuncional, con la condición que tenga mayor actividad Δ8-desaturasa sobre ETrA que actividad Δ6-desaturasa sobre ALA. Los ejemplos de Δ8-desaturasas se listan en la Tabla 1. En una forma de realización, la Δ8-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:37, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a SEQ ID NO:37.

Tal como se usa en la presente, una "ω3-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 3er enlace carbono-carbono del extremo metilo de un sustrato ácido

graso. Por lo tanto una ω3-desaturasa puede convertir LA a ALA y GLA a SDA (todos ácidos grasos C18), o DGLA a ETA y/o ARA a EPA (ácidos grasos C20). Algunas ω3-desaturasas (grupo I) tienen actividad solo sobre sustratos C18, tal como las ω3-desaturasas vegetales y de cianobacterias. Dichas ω3-desaturasas también son Δ15-desaturasas. Otras ω3-desaturasas tienen actividad sobre sustratos C20 sin actividad (grupo II) o algo de actividad (grupo III) sobre sustratos C18. Dichas ω3-desaturasas también son Δ17-desaturasas. Las ω3-desaturasas preferidas son del tipo grupo III que convierten LA a ALA, GLA a SDA, DGLA a ETA y ARA a EPA, tal como la ω3-desaturasa de *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 6). Los ejemplos de ω3-desaturasas incluyen aquellas descritas por Pereira y col. (2004a) (ω3-desaturasa de *Saprolegnia diclina*, grupo II), Horiguchi y col. (1998), Berberich y col. (1998) y Spychalla y col. (1997) (ω3-desaturasa de *C. elegans*, grupo III). En una forma de realización preferida, la ω3-desaturasa es una ω3-desaturasa fúngica. Tal como se usa en la presente, una "ω3-desaturasa fúngica" se refiere a una ω3-desaturasa que es de una fuente fúngica, que incluye una fuente de oomicetes, o una variante de la misma cuya secuencia de aminoácidos es por lo menos 95% idéntica a la misma. Los genes que codifican para diferentes ω3-desaturasas han sido aislados de fuentes fúngicas tales como, por ejemplo, de *Phytophthora infestans* (No. de acceso CAJ30870, WO2005083053; SEQ ID NO: 47), *Saprolegnia diclina* (No. de acceso AAR20444, Pereira y col., 2004a & US 7211656), *Pythium irregulare* (WO2008022963, Grupo II; SEQ ID NO: 49), *Mortierella alpina* (Sakuradani y col., 2005; No. de acceso BAD91495; WO2006019192), *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust y col., 2004; No. de acceso XP_002291057; WO2005012316, SEQ ID NO: 48), *Lachancea kluyveri* (también conocido como *Saccharomyces kluyveri*; Oura y col., 2004; No. de acceso AB118663). Xue y col. (2012) describe ω3-desaturasas de los oomicetes *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae*, y *Phytophthora ramorum* que tuvieron la capacidad de convertir

eficazmente sustratos ácidos grasos ω6 a los correspondientes ácidos grasos ω3, con preferencia por sustratos C20, es decir tuvieron una actividad Δ17-desaturasa más fuerte que la actividad Δ15-desaturasa. Estas enzimas crecieron de actividad Δ12-desaturasa, pero podrían usar ácidos grasos en ambas fracciones acil-CoA y fosfolípidos como sustratos.

En una forma de realización más preferida, las ω3-desaturasa fúngica es la ω3-desaturasa/Δ15-desaturasa de *Pichia pastoris* (también conocido como *Komagataella pastoris*) (Zhang y col., 2008; No. de acceso EF116884; SEQ ID NO: 6), o un polipéptido que es por lo menos 95% idéntico al mismo.

En una forma de realización, la ω3-desaturasa tiene por lo menos la capacidad de convertir uno de ARA a EPA, DGLA a ETA, GLA a SDA, ARA a EPA y DGLA a ETA, ARA a EPA y GLA a SDA, o los tres de los mismos.

En una forma de realización, la ω3-desaturasa tiene actividad Δ17-desaturasa sobre un ácido graso C20 que tiene por lo menos tres enlaces dobles carbono-carbono, preferentemente ARA. En otra forma de realización, la ω3-desaturasa tiene actividad Δ15-desaturasa sobre un ácido graso C18 que tiene tres enlaces dobles carbono-carbono, preferentemente GLA. Preferentemente, están presentes ambas actividades.

Tal como se usa en la presente, una "Δ12-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 12vo enlace carbono-carbono del extremo carboxilo de un sustrato ácido graso. Las Δ12-desaturasas típicamente convierten oleoil-fosfatidilcolina u oleoil-CoA a linoleoil-fosfatidilcolina (18:1-PC) o linoleoil-CoA (18:1-CoA), respectivamente. La subclase que usa el sustrato unido a PC es referida como Δ12-desaturasas dependientes de fosfolípidos, la última subclase como Δ12-desaturasas dependiente de acil-CoA. Las Δ12-desaturasas vegetales y fúngicas generalmente son de la

primera subclase, mientras que las Δ12-desaturasas animales son de la última subclase, por ejemplo la Δ12-desaturasas codificada por genes clonados a partir de insectos por Zhou y col. (2008). Muchas otras secuencias de Δ12-desaturasa pueden identificarse fácilmente por búsqueda en base de datos de secuencias.

Tal como se usa en la presente, una "Δ15-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 15to enlace carbono-carbono del extremo carboxilo de un sustrato ácido graso. Se han clonado varios genes que codifican para Δ15-desaturasas a partir de especies vegetales y fúngicas. Por ejemplo, la US 5952544 describe ácidos nucleicos que codifican para Δ15-desaturasas vegetales (FAD3). Estas enzimas comprenden motivos de aminoácidos que fueron característicos de Δ15-desaturasas vegetales. En WO200114538 se describe un gen que codifica para FAD3 de soja. Muchas otras secuencias de Δ15-desaturasa pueden ser fácilmente identificadas por búsqueda en base de datos de secuencias.

Tal como se usa en la presente, una "Δ17-desaturasa" se refiere a una proteína que lleva a cabo una reacción de desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 17mo enlace carbono-carbono del extremo carboxilo de un sustrato ácido graso. Una Δ17-desaturasa también es referida como una ω3-desaturasa si actúa sobre un sustrato C20 para introducir una desaturación en el enlace ω3.

En una forma de realización preferida, la Δ12-desaturasa y/o Δ15-desaturasa es una Δ12-desaturasa fúngica o Δ15-desaturasa fúngica. Tal como se usa en la presente, una “Δ12-desaturasa fúngica” o “una Δ15-desaturasa fúngica” se refiere a una Δ12-desaturasa o Δ15-desaturasa que es de una fuente fúngica, que incluye una fuente de oomicetes, o una variante de la misma cuya secuencia de aminoácidos es por lo menos 95% idéntica a la misma. Se han aislado genes que codifican para diferentes desaturasas de fuentes fúngicas. En US 7211656 se describe una Δ12

desaturasa de *Saprolegnia diclina*. En WO2009016202 se describen desaturasas fúngicas de *Helobdella robusta*, *Laccaria bicolor*, *Lottia gigantea*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Monosiga brevicollis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycospaerella graminicola*, *Naegleria gruben*, *Nectria haematococca*, *Nematostella vectensis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Trichoderma resii*, *Physcomitrella patens*, *Postia placenta*, *Selaginella moellendorffii* y *Microdochium nivale*. En WO2005/012316 se describe una Δ12-desaturasa de *Thalassiosira pseudonana* y otros hongos. **En** WO2003/099216 se describen genes que codifican para Δ12-desaturasas y Δ15-desaturasas fúngicas aisladas de *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* y *Mortierella alpina*. En WO2007133425 se describen Δ15 desaturasas fúngicas aisladas de: *Saccharomyces kluyveri*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* y *Magnaporthe grisea*. Una Δ12 desaturasa preferida es de *Phytophthora sojae* (Ruiz-Lopez y col., 2012).

Una subclase distinta de Δ12-desaturasas fúngicas, y de Δ15-desaturasas fúngicas, son las Δ12/Δ15-desaturasas bifuncionales fúngicas. Los genes que codifican para estas han sido clonados de *Fusarium monoliforme* (No. de acceso DQ272516, Damude y col., 2006), *Acanthamoeba castellanii* (No. de acceso EF017656, Sayanova y col., 2006), *Perkinsus marinus* (WO2007042510), *Claviceps purpurea* (No. de acceso EF536898, Meesapyodsuk y col., 2007) y *Coprinus cinereus* (No. de acceso AF269266, Zhang y col., 2007).

En otra forma de realización, la ω3-desaturasa tiene por lo menos algo de actividad sobre, preferentemente mayor actividad sobre, un sustrato acil-CoA que un sustrato acil-PC correspondiente. Tal como se usa en la presente, un “sustrato acil-PC correspondiente” se refiere al ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 de fosfatidilcolina (PC) en donde el ácido graso es el mismo ácido graso que en el sustrato acil-CoA. Por ejemplo, el sustrato acil-CoA puede ser ARA-CoA y el sustrato

acil-PC correspondiente es *sn*-2 ARA-PC. En una forma de realización, la actividad es por lo menos dos veces mayor. Preferentemente, la ω3-desaturasa tiene por lo menos algo de actividad sobre un sustrato acil-CoA y su sustrato acil-PC correspondiente y tiene actividad sobre sustratos C18 y C20. Los ejemplos de dichas ω3-desaturasas son conocidas entre las desaturasas fúngicas clonadas listadas precedentemente.

En una forma de realización adicional, la ω3-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:6, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60% idéntica a SEQ ID NO:6, preferentemente por lo menos 90% o por lo menos 95% idéntica a SEQ ID NO:6.

En aún otra forma de realización, una desaturasa para usar en la presente invención tiene mayor actividad sobre un sustrato acil-CoA que un sustrato acil-PC correspondiente. En otra forma de realización, una desaturasa para usar en la presente invención tiene mayor actividad sobre un sustrato acil-PC que un sustrato acil-CoA correspondiente, pero tiene algo de actividad sobre ambos sustratos. Como se detalla anteriormente, un “sustrato acil-PC correspondiente” se refiere al ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 de fosfatidilcolina (PC) en donde el ácido graso es el mismo ácido graso que en el sustrato acil-CoA. En una forma de realización, la mayor actividad es por lo menos dos veces mayor. En una forma de realización, la desaturasa es una Δ5 o Δ6-desaturasa, o una ω3-desaturasa, ejemplos de las cuales se proveen, a título enunciativo no taxativo, de aquellas listadas en la Tabla 2. Para estudiar sobre cual sustrato actúa una desaturasa, es decir un sustrato acil-CoA o uno acil-PC, pueden realizarse ensayos en células de levaduras como se describe en Domergue y col. (2003 y 2005). La capacidad de sustrato acil-CoA para una desaturasa también puede ser inferida cuando una elongasa, cuando se expresa junto con la desaturasa, tiene una eficacia enzimática de conversión en células vegetales de

por lo menos aproximadamente 90% en donde la elongasa cataliza la elongación del producto de la desaturasa. Así, la Δ5-desaturasa y Δ4-desaturasa expresadas a partir de la construcción GA7 (Ejemplos 2 y 3) y variantes de las mismas (Ejemplo 4) tiene la capacidad de desaturar sus respectivos sustratos acil-CoA, ETA-CoA y DPA-CoA.

Elongasas

La evidencia bioquímica sugiere que la elongación del ácido graso consiste de 4 pasos: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción. En el contexto de esta invención, una "elongasa" se refiere al polipéptido que cataliza el paso de condensación en presencia de otros miembros del complejo de elongación, bajo condiciones fisiológicas adecuadas. Se ha mostrado que la expresión heteróloga u homóloga en una célula de solo el componente de condensación ("elongasa") del complejo proteico de elongación se requiere para la elongación de la respectiva cadena acilo. Por lo tanto, la elongasa introducida tiene la capacidad de reclutar exitosamente las actividades de reducción y deshidratación del huésped transgénico para llevar a cabo las elongaciones de acilo exitosas. La especificidad de la reacción de elongación respecto a la longitud de la cadena y el grado de desaturación de los sustratos ácidos grasos se piensa que reside en el componente de condensación. Este componente también se piensa que es el paso limitante en la reacción de elongación.

Tal como se usa en la presente, una "Δ5-elongasa" tiene por lo menos la capacidad de convertir EPA a DPA. Los ejemplos de Δ5-elongasas incluyen aquellas descritas en WO2005/103253. En una forma de realización, la Δ5-elongasa tiene actividad sobre EPA para producir DPA con una eficacia de por lo menos 60%, más preferentemente por lo menos 65%, más preferentemente por lo menos 70% o más preferentemente por lo menos 80% o 90%. En una forma de realización adicional, la Δ5-elongasa comprende una secuencia de aminoácidos como se provee en SEQ ID NO:25, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de

aminoácidos que es por lo menos 47% idéntica a SEQ ID NO:25. En una forma de realización adicional, la Δ6-elongasa es de *Ostreococcus taurii* o *Ostreococcus lucimarinus* (US2010/088776).

Tal como se usa en la presente, una "Δ6-elongasa" tiene por lo menos la capacidad de convertir SDA a ETA. Los ejemplos de Δ6-elongasas incluyen aquellos listados en la Tabla 1. En una forma de realización, la elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:16, un fragmento biológicamente activo de la misma (tal como el fragmento provisto como SEQ ID NO:17), o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 55% idéntica a uno o ambas de SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:17. En una forma de realización, la Δ6-elongasa es de *Physcomitrella patens* (Zank y col., 2002; No. de acceso AF428243) o *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopez y col., 2012).

Tal como se usa en la presente, una "Δ9-elongasa" tiene por lo menos la capacidad de convertir ALA a ETrA. Los ejemplos de Δ9-elongasas incluyen aquellas listadas en la Tabla 1. En una forma de realización, la Δ9-elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:29, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a SEQ ID NO:29. En otra forma de realización, la Δ9-elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:31, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 81% idéntica a SEQ ID NO:31. En otra forma de realización, la Δ9-elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:33, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:33. En otra forma de realización, la Δ9-elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO:35, un fragmento biológicamente

activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:35. En una forma de realización adicional, la Δ9-elongasa tiene mayor actividad sobre un sustrato ω6 que sobre el sustrato ω3 correspondiente, o al contrario.

Tal como se usa en la presente, el término “tiene mayor actividad sobre un sustrato ω6 que el sustrato ω3 correspondiente” se refiere a la actividad relativa de la enzima sobre sustratos que difieren en la acción de una ω3 desaturasa. Preferentemente, el sustrato ω6 es LA y el sustrato ω3 es ALA.

Una elongasa con actividad Δ6-elongasa y Δ9-elongasa tiene por lo menos la capacidad de (i) convertir SDA a ETA y (ii) convertir ALA a ETrA y tiene mayor actividad Δ6-elongasa que actividad Δ9-elongasa. En una forma de realización, la elongasa tiene una eficacia de conversión sobre SDA para producir ETA que es por lo menos 50%, más preferentemente por lo menos 60%, y/o una eficacia de conversión sobre ALA para producir ETrA que es por lo menos 6% o más preferentemente por lo menos 9%. En otra forma de realización, la elongasa tiene por lo menos aproximadamente una actividad Δ6-elongasa 6,5 veces mayor que actividad Δ9-elongasa. En una forma de realización adicional, la elongasa no tiene actividad Δ5-elongasa detectable.

Otras enzimas

Los transgenes introducidos en la célula recombinante tal como una célula microbiana, o planta transgénica o parte de la misma también pueden codificar para una LPAAT. Tal como se usa en la presente, el término "1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa" (LPAAT), también llamada ácido lisofosfatídico-aciltransferasa o acilCoA-lisofosfatidato-aciltransferasa, se refiere a una proteína que acila *sn*-1-acil-glicerol-3-fosfato (*sn*-1 G-3-P) en la posición *sn*-2 para formar ácido fosfatídico (PA). Por lo tanto, el término "actividad 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa" se refiere a la

acilación de (*sn*-1 G-3-P) en la posición *sn*-2 para producir PA (EC 2.3.1.51). Las LPAAT preferidas son aquellas que pueden usar un acil-CoA C22 poliinsaturado como sustrato para transferir el grupo acilo C22 poliinsaturado a la posición *sn*-2 de LPA, formando PA. En una forma de realización, el acil-CoA C22 poliinsaturado es DHA-CoA y/o DPA-CoA. Dichas LPAAT se ejemplifican en el Ejemplo 7 y pueden estudiarse como se describe en la presente. En una forma de realización, una LPAAT útil para la invención comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en cualquiera de SEQ ID NOs: 40 a 46, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 40% idéntica a uno cualquiera o más de SEQ ID NOs: 40 a 46. En otra forma de realización, la LPAAT no tiene aminoácidos que tengan una secuencia como la que se provee en SEQ ID NO: 44. En una forma de realización preferida, una LPAAT útil para la invención que puede usar un sustrato acil-CoA graso C22 poliinsaturado, preferentemente DHA-CoA y/o DPA-CoA, comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en cualquiera de SEQ ID NOs: 41, 42 y 44, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 40% idéntica a una cualquiera de o más de SEQ ID NOs: 41, 42 y 44. En una forma de realización preferida, una LPAAT útil para la invención que puede usar un sustrato acil-CoA graso C22 poliinsaturado, preferentemente DHA-CoA y/o DPA-CoA, comprende aminoácidos que tienen una secuencia como la que se provee en cualquiera de SEQ ID NOs: 41 o 42, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 40% idéntica a una cualquiera o ambas de SEQ ID NOs: 41 y 42. En una forma de realización en donde la construcción genética expresa una Δ4-desaturasa en la célula transgénica y/o la célula transgénica produce DHA, la LPAAT preferentemente es una LPAAT diferente de LPAAT de *Mortierella alpina* cuya secuencia de aminoácidos se indica como SEQ ID NO: 44. Como alternativa, si la

construcción genética no expresa una Δ4-desaturasa en la célula transgénica y/o la célula transgénica produce DPA pero no DHA, la LPAAT preferentemente es la LPAAT de *Mortierella alpina* cuya secuencia de aminoácidos se indica como SEQ ID NO: 44 u otra LPAAT que tiene la capacidad de usar DPA-CoA como un sustrato para transferir el DPA a LPA, formando DAG que tiene DPA en la posición *sn*-2.

Los transgenes introducidos en la célula recombinante, planta transgénica o parte de la misma también pueden codificar para una DGAT. Tal como se usa en la presente, el término “diacilglicerol aciltransferasa” (EC 2.3.1.20; DGAT) se refiere a una proteína que transfiere un grupo acil graso de acil-CoA a un sustrato diacilglicerol para producir un triacilglicerol. Por lo tanto, el término “actividad diacilglicerol aciltransferasa” se refiere a la transferencia de acil-CoA a diacilglicerol para producir triacilglicerol. Hay tres tipos conocidos de DGAT referidos como DGAT1, DGAT2 y DGAT3 respectivamente. Los polipéptidos de DGAT1 típicamente tienen 10 dominios transmembrana, DGAT2 típicamente tiene 2 dominios transmembrana, mientras que DGAT3 típicamente es soluble. Los ejemplos de polipéptidos de DGAT1 incluyen polipéptidos codificados por los genes DGAT1 de *Aspergillus fumigatus* (No. de acceso XP_755172), *Arabidopsis thaliana* (CAB44774), *Ricinus communis* (AAR11479), *Vernicia fordii* (ABC94472), *Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946), *Euonymus alatus* (AAV31083), *Caenorhabditis elegans* (AAF82410), *Rattus norvegicus* (NP_445889), *Homo sapiens* (NP_036211), así como también variantes y/o mutantes de los mismos. Los ejemplos de polipéptidos de DGAT2 incluyen polipéptidos codificados por los genes DGAT2 genes de *Arabidopsis thaliana* (No. de acceso NP_566952), *Ricinus communis* (AAY16324), *Vernicia fordii* (ABC94474), *Mortierella ramanniana* (AAK84179), *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), *Mus musculus* (AAK84175), *Micromonas* CCMP1545, así como también variantes y/o mutantes de los mismos. Los ejemplos de polipéptidos de

DGAT3 incluyen polipéptidos codificados por genes DGAT3 de maní (*Arachis hypogaea*, Saha, y col., 2006), así como también variantes y/o mutantes de los mismos.

Polipéptidos/Péptidos

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan generalmente como sinónimos.

Un polipéptido o clase de polipéptido puede definirse por la extensión de la identidad (% de identidad) de su secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia, o por tener un % de identidad mayor que una secuencia de aminoácidos de referencia que otra. El % de identidad de un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de referencia se determina típicamente por análisis GAP (Needleman y Wunsch, 1970; programa GCG) con parámetros de una penalidad de creación de no coincidencia=5, y una penalidad de extensión de no coincidencia=0,3. La secuencia de búsqueda tiene por lo menos 15 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias en una región de por lo menos 15 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de búsqueda tiene por lo menos 50 aminoácidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias en una región de por lo menos 50 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia de búsqueda tiene por lo menos 100 aminoácidos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias en una región de por lo menos 100 aminoácidos. Incluso más preferentemente, la secuencia de búsqueda tiene por lo menos 250 aminoácidos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias en una región de por lo menos 250 aminoácidos. Incluso más preferentemente, el análisis GAP alinea dos secuencias en la totalidad de su longitud. El polipéptido o clase de polipéptidos puede tener la misma actividad enzimática como, o una actividad diferente de, o carece de actividad de, el polipéptido de referencia. Preferentemente, el polipéptido tiene una actividad enzimática de por lo menos 10%, por lo menos 50%, por lo menos 75% o por lo menos 90%, de la actividad del

polipéptido de referencia.

Tal como se usa en la presente un fragmento "biológicamente activo" es una porción de un polipéptido definido en la presente que mantiene una actividad definida de un polipéptido de referencia de longitud completa, por ejemplo que posee actividad desaturasa y/o elongasa u otra actividad enzimática. Los fragmentos biológicamente activos como se usan en la presente excluyen el polipéptido de longitud completa. Los fragmentos biológicamente activos pueden ser de cualquier porción de tamaño con la condición de que mantengan la actividad definida. Preferentemente, el fragmento biológicamente activo mantiene por lo menos 10%, por lo menos 50%, por lo menos 75% o por lo menos 90%, de la actividad de la proteína de longitud completa.

Respecto a un polipéptido definido o enzima, se apreciará que la figura de % de identidad mayor que aquellas provistas en la presente abarcará formas de realización preferidas. Por lo tanto, cuando sea aplicable, a la luz de las figuras de % de identidad mínima, se prefiere que el polipéptido/enzima comprenda una secuencia de aminoácidos que sea por lo menos 60%, más preferentemente por lo menos 65%, más preferentemente por lo menos 70%, más preferentemente por lo menos 75%, más preferentemente por lo menos 76%, más preferentemente por lo menos 80%, más preferentemente por lo menos 85%, más preferentemente por lo menos 90%, más preferentemente por lo menos 91%, más preferentemente por lo menos 92%, más preferentemente por lo menos 93%, más preferentemente por lo menos 94%, más preferentemente por lo menos 95%, más preferentemente por lo menos 96%, más preferentemente por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, más preferentemente por lo menos 99%, más preferentemente por lo menos 99,1%, más preferentemente por lo menos 99,2%, más preferentemente por lo menos 99,3%, más preferentemente por lo menos 99,4%, más preferentemente por lo menos 99,5%, más preferentemente por lo menos 99,6%, más preferentemente por lo menos 99,7%,

más preferentemente por lo menos 99,8%, e incluso más preferentemente por lo menos 99,9% idéntica a la SEQ ID NO nominada relevante.

La secuencia de aminoácidos variantes/mutantes de los polipéptidos definidos en la presente puede prepararse por introducción de cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico definido en la presente, o por síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Dichas variantes/mutantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos en la secuencia de aminoácidos. Puede hacerse una combinación de eliminación, inserción y sustitución para obtener la construcción final, con la condición de que el producto peptídico final posea la actividad enzimática deseada.

Los péptidos mutantes (alterados) pueden prepararse usando cualquier técnica conocida en el arte. Por ejemplo, un polinucleótido definido en la presente puede ser sometido a mutagénesis *in vitro* o técnicas de desordenamiento de ADN como los describe ampliamente Harayama (1998). Los productos derivados de ADN mutado/alterado pueden ser tamizados fácilmente usando técnicas descritas en la presente para determinar si poseen, por ejemplo, actividad desaturasa o elongasa.

En el diseño de mutantes de secuencias de aminoácidos, la localización del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerá de la o las características a modificar. Los sitios para la mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, por (1) sustitución primero con alternativas de aminoácidos conservativos y luego con selecciones más radicales dependiendo de los resultados obtenidos, (2) eliminación del residuo blanco, o (3) inserción de otros residuos adyacentes al sitio localizado.

Las eliminaciones de secuencias de aminoácidos generalmente varían en un rango entre aproximadamente 1 y 15 residuos, más preferentemente aproximadamente entre 1 y 10 residuos y típicamente aproximadamente entre 1 y 5

residuos contiguos.

Las mutaciones de sustitución tienen eliminado por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula polipeptídica y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen sitios que no son conservados entre las desaturasas o elongasas de origen natural. Estos sitios preferentemente se sustituyen de un modo relativamente conservado con el objetivo de mantener la actividad enzimática. Dichas sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 3 bajo el título de "sustituciones ejemplificativas".

En una forma de realización preferida un polipéptido mutante/variante tiene solo, o no más de, uno o dos o tres o cuatro cambios conservativos de aminoácidos en comparación con un polipéptido de origen natural. Los detalles de los cambios conservativos de aminoácidos se proveen en la Tabla 3. Tal como la persona con experiencia podría darse cuenta, puede predecirse razonablemente que dichos cambios menores no alterarán la actividad del polipéptido cuando se exprese en una célula recombinante.

Polinucleótidos

La invención también provee el uso de polinucleótidos que pueden ser, por ejemplo, un gen, un polinucleótido aislado, una construcción genética quimérica tal como una molécula de T-ADN, o un ADN quimérico. Puede ser ADN o ARN de origen genómico o sintético, de hebra doble o hebra simple, y combinado con hidrato de carbono, lípidos, proteína u otros materiales para llevar a cabo una actividad particular definida en la presente. El término "polinucleótido" se usa como sinónimo en la presente con el término "molécula de ácido nucleico".

En una forma de realización, el polinucleótido no es de origen natural. Los ejemplos de polinucleótidos de origen no natural incluyen a, a título enunciativo no taxativo, aquellos que han sido mutados (tal como con el uso de métodos descritos en

la presente), y polinucleótidos en los cuales un marco de lectura abierto que codifica para una proteína está operativamente ligado a un promotor al cual naturalmente no está asociado (tal como en las construcciones descritas en la presente).

Tabla 3. Sustituciones ejemplificativas.

Residuo original	**Sustituciones ejemplificativas**
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe

Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

Tal como se usa en la presente, el término "gen" se debe considerar en su contexto más amplio e incluye la secuencia de desoxirribonucleótidos que comprende la región transcripta y, si se traduce, la región que codifica para la proteína, de un gen estructural e incluyendo secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en los extremos 5' y 3' a una distancia de por lo menos aproximadamente 2 kb en cada extremo y que están involucradas en la expresión del gen. En este sentido, el gen incluye señales de control tales como promotores, potenciadores, señales de terminación y/o poliadenilación que están naturalmente asociadas con un gen dado, o señales de control heterólogo en cuyo caso el gen es referido como un "gen quimérico". Las secuencias que están localizadas 5' de la región codificante de la proteína y que están presentes en el ARNm son referidas como secuencias no traducidas 5'. Las secuencias que están localizadas 3' o corriente debajo de la región codificante de la proteína y que están presentes en el ARNm son referidas como secuencias no traducidas 3'. El término "gen" abarca ADNc y formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante que puede ser interrumpida con secuencias no codificantes llamadas "intrones" o "regiones intervinientes" o "secuencias intervinientes". Los intrones son segmentos de un gen que son transcriptos a ARN nuclear (ARNnh). Los intrones pueden contener elementos regulatorios tales como potenciadores. Los intrones son eliminados o "quitados por corte y empalme" del transcripto nuclear o primario; por lo tanto los intrones están ausentes en el transcripto ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u orden de aminoácidos en un polipéptido naciente. El término "gen" incluye una molécula sintética o de fusión que codifica para todas o parte de las proteínas descritas en la presente y una secuencia

complementaria de nucleótidos a cualquiera de las anteriores.

Tal como se usa en la presente, un "ADN quimérico" o “construcción genética quimérica” o similar se refiere a cualquier molécula de ADN que no es una molécula de ADN nativa en su localización nativa, también referida en la presente como una "construcción de ADN". Típicamente, un ADN quimérico o gen quimérico comprende secuencias regulatorias y trascriptas o que codifican para proteínas que no se encuentran operativamente ligadas naturalmente es decir que son heterólogas entre sí. En consecuencia, un ADN quimérico o gen quimérico puede comprender secuencias regulatorias y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o secuencias regulatorias y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de un modo diferente del que se encuentran en la naturaleza.

Un "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Tal como se usa en la presente, "molécula de ácido nucleico recombinante", " polinucleótido recombinante" o variaciones de los mismos se refieren a una molécula de ácido nucleico que ha sido construida o modificada por tecnología de ADN recombinante. Los términos "polinucleótido foráneo" o "polinucleótido exógeno" o "polinucleótido heterólogo" y similares se refieren a cualquier ácido nucleico que es introducido en el genoma de una célula por manipulaciones experimentales. Los genes foráneos o exógenos pueden ser genes que son insertados en un organismo no nativo, genes nativos introducidos en una localización nueva en el huésped nativo, o genes quiméricos. Un "transgen" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación. Los términos "modificado genéticamente", "transgénico" y variaciones de los mismos incluyen introducir genes en células por transformación o transducción, mutar genes en células y alterar o modular la regulación de un gen en una célula u organismos en los cuales se han hecho estos actos o su progenie. Una “región genómica” como se

usa en la presente se refiere a una posición dentro del genoma en donde se ha insertado un transgen, o grupo de transgenes (también referidos en la presente como un conjunto), en una célula, o un ancestro de la misma. Dichas regiones solo comprenden nucleótidos que han sido incorporados por la intervención del hombre tal como por métodos descritos en la presente.

El término "exógeno" en el contexto de un polinucleótido se refiere al polinucleótido cuando está presente en una célula en una cantidad alterada en comparación con su estado nativo. En una forma de realización, la célula es una célula que no comprende naturalmente el polinucleótido. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un polinucleótido no endógeno que da como resultado una cantidad alterada de producción del polipéptido codificado. Un polinucleótido exógeno incluye polinucleótidos que no han sido separados de otros componentes de la célula transgénica (recombinante), o sistema de expresión libre de células, en el cual está presente, y polinucleótidos producidos en dichas células o sistemas libres de células que son posteriormente purificados de por lo menos algunos otros componentes. El polinucleótido exógeno (ácido nucleico) puede ser una región contigua de nucleótidos que existen en la naturaleza, o comprenden dos o más regiones contiguas de nucleótidos de diferentes fuentes (de origen natural y/o sintética) unidas para formar un polinucleótido único. Típicamente dichos polinucleótidos quiméricos comprenden por lo menos un marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido ligado operativamente a un promotor adecuado de dirección de transcripción del marco de lectura abierto en una célula de interés.

Respecto a los polinucleótidos definidos, se apreciará que las figuras de % de identidad mayores que aquellos provistos anteriormente abarcarán formas de realización preferidas. Por lo tanto, cuando se pueda aplicar, a la luz de las figuras de % de identidad mínima, se prefiere que el polinucleótido comprenda una secuencia

polinucleotídica que sea por lo menos 60%, más preferentemente por lo menos 65%, más preferentemente por lo menos 70%, más preferentemente por lo menos 75%, más preferentemente por lo menos 80%, más preferentemente por lo menos 85%, más preferentemente por lo menos 90%, más preferentemente por lo menos 91%, más preferentemente por lo menos 92%, más preferentemente por lo menos 93%, más preferentemente por lo menos 94%, más preferentemente por lo menos 95%, más preferentemente por lo menos 96%, más preferentemente por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, más preferentemente por lo menos 99%, más preferentemente por lo menos 99,1%, más preferentemente por lo menos 99,2%, más preferentemente por lo menos 99,3%, más preferentemente por lo menos 99,4%, más preferentemente por lo menos 99,5%, más preferentemente por lo menos 99,6%, más preferentemente por lo menos 99,7%, más preferentemente por lo menos 99,8%, e incluso más preferentemente por lo menos 99,9% idéntica a la SEQ ID NO nominada relevante.

Los polinucleótidos pueden poseer, en comparación con moléculas de origen natural, una o más mutaciones que son eliminaciones, inserciones, o sustituciones de residuos de nucleótidos. Los polinucleótidos que tienen mutaciones en relación a una secuencia de referencia pueden ser de origen natural (es decir, aislados de una fuente natural) o sintéticos (por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio o desordenamiento de ADN en el ácido nucleico como se describió precedentemente). Por lo tanto resulta evidente que los polinucleótidos pueden ser de una fuente de origen natural o recombinantes. Los polinucleótidos preferidos son aquellos que tienen regiones codificantes que tienen optimización de codones para la traducción en células vegetales, como es conocido en el arte.

Vectores recombinantes

La expresión recombinante puede usarse para producir células recombinantes,

o plantas o partes de plantas de la invención. Los vectores recombinantes contienen secuencias polinucleotídicas heterólogas, es decir, secuencias polinucleotídicas que no se encuentran naturalmente adyacentes a moléculas de polinucleótidos definidas en la presente que preferentemente derivan de una especie diferente de la especie de la cual deriva la o las moléculas de polinucleótidos. El vector puede ser ARN o ADN y típicamente es un plásmido. Los vectores plasmídicos típicamente incluyen secuencias de ácido nucleico adicionales que proveen una selección fácil, amplificación, y transformación del casete de expresión en células procarióticas, por ejemplo, vectores derivados de pUC, vectores derivados de pSK, vectores derivados de pGEM, vectores derivados de pSP, vectores derivados de pBS, o preferentemente vectores binarios que contienen una o más regiones de T-ADN. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales incluyen orígenes de replicación para proveer la replicación autónoma del vector, genes de marcadores se selección, preferentemente que codifican para resistencia a antibióticos o herbicidas, sitios únicos de clonado múltiple que proveen sitios múltiples para insertar secuencias de ácidos nucleicos o genes codificados en la construcción de ácido nucleico, y secuencias que potencian la transformación de células procarióticas o eucarióticas (especialmente plantas). El vector recombinante puede comprender más de un polinucleótido definido en la presente, por ejemplo tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos definidos en la presente en combinación, preferentemente una construcción genética quimérica descrita en la presente, estando cada polinucleótido operativamente ligado a secuencias de control de expresión que son operables en la célula de interés. Preferentemente las secuencias de control de expresión incluyen, o son todas, promotores heterólogos es decir son heterólogas respecto a las regiones codificantes que controlan. Más de un polinucleótido definido en la presente, por ejemplo 3, 4, 5 o 6 polinucleótidos, preferentemente 7 u 8 polinucleótidos en donde cada uno codifican para un polipéptido diferente, están

preferentemente unidos covalentemente en un vector recombinante simple, preferentemente en una molécula de T-ADN simple, que luego puede introducirse como una molécula simple en una célula para formar una célula recombinante de acuerdo con la invención, y preferentemente integrada en el genoma de la célula recombinante, por ejemplo en una planta transgénica. La integración en el genoma puede ser en el genoma nuclear o en un genoma plástido en la planta transgénica. Por lo tanto, los polinucleótidos que están unidos de esa forma se heredarán como un *locus* genético simple en la progenie de la célula o planta recombinante. El vector o planta recombinante puede comprender dos o más de dichos vectores recombinantes, cada uno conteniendo polinucleótidos múltiples, por ejemplo en donde cada vector recombinante comprende 3, 4, 5 o 6 polinucleótidos.

"Operativamente ligado" como se usa en la presente se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional del elemento regulatorio transcripcional (promotor) con una secuencia transcripta. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado a una secuencia codificante, tal como un polinucleótido definido en la presente, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula apropiada. Generalmente, los elementos regulatorios transcripcionales promotores que están operativamente ligados a una secuencia transcripta están físicamente contiguos a la secuencia transcripta, es decir, que son de acción *cis*. Sin embargo, algunos elementos regulatorios transcripcionales, tales como potenciadores, necesitan no estar físicamente contiguos o localizados en proximidad a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

Cuando hay presentes múltiples promotores, cada promotor puede ser independientemente el mismo o diferente. Preferentemente, se usan por lo menos 3 y hasta un máximo de 6 secuencias promotoras diferentes en el vector recombinante

para controlar la expresión de los polinucleótidos exógenos.

Las moléculas recombinantes tales como los ADN quiméricos o construcciones genéticas también pueden contener (a) una o más señales secretorias que codifican para secuencias peptídicas señal, para permitir que se secrete un polipéptido expresado definido en la presente de la célula que produce el polipéptido o que provee la localización del polipéptido expresado, por ejemplo para la retención del polipéptido en el retículo endoplasmático (ER) en la célula o transferirlo al plástido, y/o (b) contiene secuencias de fusión que llevan a la expresión de moléculas de ácido nucleico como proteínas de fusión. Los ejemplos de segmentos señal adecuados incluyen cualquier segmento señal con capacidad de dirigir la secreción o localización de un polipéptido definido en la presente. Las moléculas recombinantes también pueden incluir secuencias de intervención y/o no traducidas alrededor y/o en las secuencias de ácidos nucleicos de moléculas de ácido nucleico definidas en la presente.

Para facilitar la identificación de transformantes, la construcción de ácido nucleico comprende deseablemente un gen marcador de selección o de cribado como, o adicionalmente a, el polinucleótido foráneo o exógeno. Por "gen marcador" se entiende un gen que imparte un fenotipo diferente a células que expresan el gen marcador y por lo tanto permite que dichas células transformadas se puedan distinguir de células que no tienen el marcador. Un gen marcador de selección confiere un rasgo para el cual uno puede "seleccionar" en base a resistencia a un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida, antibiótico, radiación, calor, u otro tratamiento que daña las células no transformadas). Un gen marcador de cribado (o gen reportero) confiere un rasgo que uno puede identificar por medio de la observación o ensayo, es decir, por "cribado" (por ejemplo, β-glucuronidasa, luciferasa, GFP u otra actividad enzimática no presente en células no transformadas). El gen marcador y la secuencia de nucleótidos

de interés no tienen que estar ligados. La selección actual de un marcador no es crucial siempre que sea funcional (es decir, selectivo) en combinación con las células de selección tal como una célula vegetal.

Los ejemplos de marcadores de selección son marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, eritromicina, cloramfenicol o tetraciclina, preferentemente resistencia a kanamicina. Los marcadores de selección ejemplificativos para la selección de transformantes vegetales incluyen a, a título enunciativo no taxativo, un gen *hyg* que codifica para resistencia a higromicina B; un gen de neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia a kanamicina, paromomicina, G418; un gen glutatión-S-transferasa de hígado de rata que confiere resistencia a herbicidas derivados de glutatión como, por ejemplo, los descritos en EP 256223; un gen de glutamina sintetasa que confiere, con su sobreexpresión, resistencia a inhibidores de glutamina sintetasa tal como fosfinotricina como, por ejemplo, los descritos en WO 87/05327, un gen de acetiltransferasa de *Streptomyces viridochromogenes* que confiere resistencia al agente selectivo fosfinotricina como, por ejemplo, se describe en EP 275957, un gen que codifica para una 5-enolshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere tolerancia a N-fosfonometilglicina como, por ejemplo, lo describe Hinchee y col. (1988), o preferentemente un gen *bar* que confiere resistencia contra bialafos como, por ejemplo, se describe en WO91/02071.

Preferentemente, la construcción de ácido nucleico está establemente incorporada en el genoma de la célula, tal como la célula vegetal. En consecuencia, el ácido nucleico puede comprender elementos apropiados que permiten que la molécula se incorpore en el genoma, preferentemente los bordes de las secuencias derecha e izquierda de una molécula de T-ADN, o la construcción se coloca en un vector apropiado que puede incorporarse en un cromosoma de la célula.

Expresión

Tal como se usa en la presente, un vector de expresión es un vector de ADN que tiene la capacidad de transformar una célula y de llevar a cabo la expresión de una o más moléculas polinucleotídicas específicas. Los vectores de expresión de la presente invención pueden dirigir la expresión de genes en células vegetales o en células recombinantes tales como células microbianas. Los vectores de expresión útiles para la invención contienen secuencias regulatorias tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación, y otras secuencias regulatorias que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de moléculas polinucleotídicas de la presente invención. En particular, los polinucleótidos o vectores útiles para la presente invención incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan la iniciación, elongación, y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan la iniciación de la transcripción, tales como secuencias promotoras y potenciadoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que puede funcionar en por lo menos una de las células recombinantes de la presente invención. La selección de las secuencias regulatorias usadas depende del organismo blanco tal como una planta y/u órgano blanco o tejido de interés. Dichas secuencias regulatorias pueden obtenerse a partir de cualquier organismo eucariótico tal como plantas o virus de planta, o pueden sintetizarse químicamente. Aquellos con experiencia en el arte conocen una variedad de dichas secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente preferidas son promotores activos en la dirección de la transcripción en plantas, constitutivamente o específicas de estadio y/o tejido, dependiendo del uso de la planta o partes de la misma.

Se ha descrito un número de vectores adecuados para la transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas en, por ejemplo, Pouwels y col., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; y Gelvin y col., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Típicamente, los vectores de expresión vegetal incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control transcripcional de secuencias regulatorias 5' y 3' y un marcador de selección dominante. Dichos vectores de expresión vegetal también pueden contener una región regulatoria promotora (por ejemplo, una región regulatoria que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada por el ambiente o por desarrollo, o específica de célula o tejido), un sitio de comienzo del inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

Se ha descrito un número de promotores constitutivos que son activos en células vegetales. Los promotores adecuados para la expresión constitutiva en plantas incluyen a, a título enunciativo no taxativo, el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), el 35S del virus del mosaico de escrofularia (FMV), y el promotor inducible por luz de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa.

Con el propósito de expresión en tejidos fuente de la planta, tal como la hoja, semilla, raíz o tallo, se prefiere que los promotores utilizados en la presente invención tengan una expresión relativamente alta en estos tejidos específicos. En el arte se conocen bien muchos ejemplos. También se puede usar una variedad de promotores de genes vegetales que son regulados en respuesta a señales ambientales, hormonales, químicas, y/o de desarrollo, para la expresión de genes en células vegetales, o también puede resultar ventajoso emplear promotores específicos de órganos.

Tal como se usa en la presente, el término “promotor específico de semilla” o variaciones del mismo se refiere a un promotor que preferencialmente, cuando se compara con otros tejidos vegetales, dirige la transcripción génica en una semilla en desarrollo de una planta, preferentemente una planta *Brassica sp.*, *Camelina sativa* o *G. max*. En una forma de realización, el promotor específico de semilla se expresa por lo menos 5 veces más potente en la semilla en desarrollo de la planta en relación a las hojas y/o tallos de la planta, y preferentemente se expresa más potente en el embrión de la semilla en desarrollo en comparación a otros tejidos vegetales. Preferentemente, el promotor solo dirige la expresión de un gen de interés en la semilla en desarrollo, y/o la expresión del gen de interés en otras partes de la planta tales como hojas no puede detectarse por análisis por transferencia Northern y/o RT-PCR. Típicamente, el promotor dirige la expresión de genes durante el crecimiento y desarrollo de la semilla, en particular durante la fase de síntesis y acumulación de compuestos de almacenamiento en la semilla. Dichos promotores pueden dirigir la expresión de genes en el órgano de almacenamiento vegetal completo o solo parte del mismo tal como el tegumento, o cotiledón o cotiledones, preferentemente en los embriones, en semillas de plantas dicotiledóneas o el endosperma o cada aleurona de una semilla de plantas monocotiledóneas.

Los promotores preferidos para la expresión específica de semilla incluyen i) promotores de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis y acumulación de ácidos grasos en semillas, tales como desaturasas y elongasas de ácidos grasos, ii) promotores de genes que codifican para proteínas de almacenamiento en semillas, y iii) promotores de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis y acumulación de hidratos de carbono en semillas. Los promotores específicos de semillas que son adecuados son el promotor de napin de la semilla oleaginosa de colza (US 5.608.152), el promotor USP de *Vicia faba* (Baumlein

y col., 1991), el promotor de oleosina de *Arabidopsis* (WO98/45461), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5.504.200), el promotor de Bce4 de *Brassica* (WO91/13980) o el promotor de LeB4 de legumina de *Vicia faba* (Baumlein y col., 1992), y promotores que llevan a la expresión específica de semillas en monocotiledóneas tales como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz y similares. Los promotores notables que son adecuados son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de cebada (WO95/15389 y WO95/23230) o los promotores descritos en WO99/16890 (promotores del gen hordeina de cebada, el gen de glutelina de arroz, el gen orizina de arroz, el gen prolamina de arroz, el gen gliadina de trigo, el gen glutelina de trigo, el gen zeina de maíz, el gen glutelina de avena, el gen kasirina de sorgo, el gen secalina de centeno). Otros promotores incluyen aquellos descritos por Broun y col. (1998), Potenza y col. (2004), US20070192902 y US20030159173. En una forma de realización, el promotor específico de semilla se expresa preferencialmente en partes definidas de la semilla tal como el embrión, cotiledón o cotiledones o el endosperma. Los ejemplos de dichos promotores específicos incluyen a, a título enunciativo no taxativo, el promotor FP1 (Ellerstrom y col., 1996), el promotor de legumina de arveja (Perrin y col., 2000), el promotor de fitohemaglutinina de poroto (Perrin y col., 2000), los promotores de conlinina 1 y conlinina 2 para los genes que codifican para las proteínas de almacenaje 2S de lino (Cheng y col., 2010), el promotor del gen FAE1 de *Arabidopsis thaliana*, el promotor BnGLP del gen de la proteína similar a globulina de *Brassica napus*, el promotor LPXR del gen peroxiredoxina de *Linum usitatissimum*.

La secuencia líder no traducida 5' puede derivar del promotor seleccionado para expresar la secuencia del gen heterólogo del polinucleótido de la presente invención, o preferentemente es heterólogo respecto a la región codificante de la enzima a producir, y puede ser modificada específicamente si se desea para aumentar la traducción del ARNm. Para una revisión de la optimización de la expresión de

transgenes, véase Koziel y col. (1996). Las regiones no traducidas 5' también pueden obtenerse a partir de ARN virales vegetales (virus del mosaico del tabaco, virus del grabado del tabaco, virus del mosaico enano de maíz, virus del mosaico de alfalfa, entre otros) de genes eucarióticos adecuados, genes vegetales (líder del gen de proteína de unión a clorofila a/b de trigo y maíz), o de una secuencia sintética de gen. La presente invención no se limita a las construcciones en donde la región no traducida deriva de la secuencia no traducida 5' que acompaña la secuencia promotora. La secuencia líder también podría derivar de un promotor o secuencia codificante no relacionados. Las secuencias líderes útiles en el contexto de la presente invención comprenden la líder de Hsp70 de maíz (US 5.362.865 y US 5.859.347), y el elemento omega de TMV.

La terminación de la transcripción se produce por una secuencia de ADN no traducida 3' operativamente ligada en el vector quimérico al polinucleótido de interés. La región no traducida 3' de una molécula de ADN recombinante contiene una señal de poliadenilación que actúa en plantas para producir la adición de nucleótidos de adenilato al extremo 3' del ARN. La región no traducida 3' puede obtenerse a partir de diferentes genes que se expresan en células vegetales. Con esta capacidad comúnmente se utiliza la región no traducida 3' de nopalina sintasa, la región no traducida 3' del gen de la subunidad pequeña de la Rubisco de arveja, la región no traducida 3' del gen de la proteína de almacenamiento 7S de soja o un gen de conlinina de lino. También son adecuadas las regiones transcriptas, no traducidas, 3' que contienen la señal de poliadenilacion de genes plasmídicos inductores de tumor (Ti) de *Agrobacterium*.

Pueden usarse tecnologías de ADN recombinante para mejorar la expresión de una molécula polinucleotídica transformada por manipulación, por ejemplo, del número de copias de la molécula polinucleotídica en una célula huésped, la eficacia con la cual

esas moléculas polinucleotídicas se transcriben, la eficacia con la cual se traducen los transcriptos resultantes, y la eficacia de las modificaciones postraduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de moléculas polinucleotídicas definidas en la presente incluyen a, a título enunciativo no taxativo, la integración de la molécula polinucleotídica en uno o más cromosomas de la célula huésped, adición de secuencias de estabilidad a ARNm, sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosoma, secuencias de Shine-Dalgarno), modificación de moléculas polinucleotídicas para corresponderse con el uso de codones de la célula huésped, y la eliminación de secuencias que desestabilizan los transcriptos.

Plantas transgénicas

El término "planta" como se usa en la presente como un sustantivo se refiere plantas enteras, pero cuando se usa como un adjetivo se refiere a cualquier sustancia que está presente en, obtenida de, derivada de, o relacionada con una planta, tal como por ejemplo, órganos de planta (por ejemplo hojas, tallos, raíces, flores), células simples (por ejemplo polen), semillas, células vegetales y similares. El término "parte de planta" se refiere a todas las partes de plantas que comprenden el ADN de la planta, que incluye estructuras vegetativas tales como, por ejemplo, hojas o tallos, raíces, órganos o estructuras florales, polen, semilla, partes de semillas tales como un embrión, endosperma, escutelo o recubrimiento de la semilla, tejido vegetal tal como, por ejemplo, tejido vascular, células y progenie de la misma, con la condición de que la parte de la planta sintetiza el lípido de acuerdo con la invención.

Una "planta transgénica", "planta genéticamente modificada" o variaciones de la misma se refiere a una planta que contiene una construcción génica (“transgen”)

que no se encuentra en una planta de tipo salvaje planta de la misma especie, variedad o cultivar. Las plantas transgénicas como se definen en el contexto de la presente invención incluyen plantas y su progenie que han sido modificadas genéticamente usando técnicas recombinantes para generar la producción del lípido o por lo menos un polipéptido definido en la presente en la planta deseada u órgano de la planta. Las células vegetales transgénicas y partes de planta transgénica tienen significados correspondientes. Un “transgen” como se refiere en la presente tiene el significado normal en el arte de la biotecnología e incluye una secuencia genética que ha sido producida o alterada por tecnología de ADN o ARN recombinante y que ha sido introducida en una célula vegetal. El transgen puede incluir secuencias genéticas derivadas de una célula vegetal que puede ser de la misma especie, variedad o cultivar que la célula vegetal en la cual se introduce el transgen o de una especie, variedad o cultivar diferente, o de una célula diferente de una célula vegetal. Típicamente, el transgen se ha introducido en la célula, tal como una planta, por manipulación humana tal como, por ejemplo, por transformación pero puede usarse cualquier método tal como lo reconocerá una persona con experiencia en el arte.

Los términos "semilla" y "grano" se usan como sinónimos en la presente. “Grano” se refiere a un grano maduro tal como grano recolectado o grano que aún está en una planta pero listo para recolectar, pero también se refiere a un grano después de la imbibición o germinación, de acuerdo con el contexto. El grano maduro o semilla comúnmente tiene un contenido de humedad menor de aproximadamente 18-20%, preferentemente menor de 10%. La semilla de *Brassica* tal como semilla de canola típicamente tiene un contenido de humedad de aproximadamente 4-8% o 6-8% cuando está madura, preferentemente entre aproximadamente 4% y aproximadamente 6%. “Semilla en desarrollo” como se usa en la presente se refiere a una semilla antes de la madurez, típicamente encontrada en las estructuras reproductoras de la planta

después de la fertilización o antesis, pero también puede referirse a dichas semillas antes de la madurez que son aisladas de una planta.

Tal como se usa en la presente, el término “obtener una parte de planta” u “obtener una semilla” se refiere a cualquier medio para obtener una parte de planta o semilla, respectivamente, que incluye recolectar las partes de plantas o semilla de plantas en el campo o en contenedores tales como un vivero o cámara de crecimiento, o por compra o recepción de un proveedor de las partes de plantas o semilla. Las condiciones estándares de crecimiento en un vivero incluyen una temperatura diurna de entre 22 y 24°C y temperatura nocturna de entre 16 y 18°C, con luz solar natural. La semilla puede ser adecuada para plantar es decir que tiene la capacidad para germinar y producir plantas progenie, o como alternativa han sido procesadas de tal manera que ya no tiene la capacidad para germinar, por ejemplo semilla partida, frotada o molida que es útil para aplicaciones en alimentos o pienso, o para extracción del lípido de la invención.

Tal como se usa en la presente, el término “órgano de almacenamiento vegetal” se refiere a una parte de una planta especializada en el almacenamiento de energía en la forma de, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, ácidos grasos y/o aceites. Los ejemplos de órganos de almacenamiento vegetales son semilla, fruto, raíces tuberosas, y tubérculos. Un órgano de almacenamiento vegetal preferido es la semilla.

Las plantas o partes de plantas de la invención o usadas en la invención preferentemente son fenotípicamente normales. Tal como se usa en la presente, el término “fenotípicamente normal” se refiere a una planta genéticamente modificada u órgano de la planta, particularmente un órgano de almacenamiento tal como una semilla, tubérculo o fruto que no tiene una capacidad significativamente reducida para crecer y reproducirse en comparación con una planta u órgano de planta no

modificado. En una forma de realización, la planta u órgano de la planta genéticamente modificado que es fenotípicamente normal tiene una capacidad para crecer o reproducirse que es esencialmente la misma que una planta isogénica u órgano que no comprende el o los polinucleótidos exógenos. Preferentemente, la biomasa, tasa de crecimiento, tasa de germinación, tamaño del órgano de almacenamiento, viabilidad del polen, fertilidad masculina y femenina, tamaño de semilla y/o el número de semillas viables producidas no son menores del 90% de la de una planta que carece de dicho polinucleótido exógeno cuando se hace crecer bajo condiciones idénticas. Preferentemente la viabilidad del polen de la planta de la invención, o plantas producidas a partir de la semilla de la invención, es aproximadamente 100% en relación a la viabilidad del polen de una planta de tipo salvaje correspondiente. Este término no abarca las características de la planta que pueden ser diferentes a las de la planta de tipo salvaje pero no afecta la utilidad de la planta con propósitos comerciales tal como, por ejemplo, un fenotipo de bailarina de hojas de plántulas.

Las plantas provistas por o contempladas para el uso en la práctica de la presente invención incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas. En formas de realización preferidas, las plantas de la presente invención son plantas par cultivo (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, papas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada, o arvejas), u otras legumbres. Las plantas pueden hacerse crecer para la producción de raíces, tubérculos, hojas, tallos, flores o frutos comestibles. Las plantas pueden ser vegetales o plantas ornamentales. Las plantas de, o útiles para, la invención pueden ser : maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus, Brassica rapa* spp.), mostaza (*Brassica juncea*), lino (*Linum usitatissimum*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cerale*), sorgo (*Sorghum bicolour, Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annus*), trigo (*Tritium aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco

(*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Lopmoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), ananá (*Anana comosus*), árbol cítrico (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia senensis*), banana (*Musa* spp.), palta (*Persea americana*), higos (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), castaña de cajú (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendro (*Prunus amygdalus*), remolacha (*Beta vulgaris*), avena, o cebada.

En una forma de realización preferida, la planta es un angiosperma.

En una forma de realización, la planta es una planta de semilla oleaginosa, preferentemente una planta de cultivo de semilla oleaginosa. Tal como se usa en la presente, una "planta de semilla oleaginosa" es una especie vegetal usada para la producción comercial de aceites de las semillas de la planta. La planta de semilla oleaginosa puede ser planta de colza de semilla oleaginosa (tal como canola), maíz, girasol, soja, sorgo, lino (linaza) o remolacha. Más aún, la planta de semilla oleaginosa puede ser otra diferente de *Brassicas*, algodón, maní, amapola, mostaza, ricino, sésamo, girasol, cártamo, *Camelina*, *Crambe* o planta productora de nuez. La planta puede producir niveles altos de aceite en su fruto, tal como aceituna, aceite de palma o coco. Las plantas horticulturales a las cuales se puede aplicar la presente invención son lechuga, endivia, o brassicas vegetales que incluye repollo, brócoli, o coliflor. La presente invención puede aplicarse en tabaco, curcúbita, zanahoria, frutilla, tomate, o pimiento.

En otra forma de realización preferida, la planta no transgénica usada para producir una planta transgénica de la invención produce aceite, especialmente en la semilla, que tiene i) menos de 20%, menos de 10% o menos de 5% de ácidos grasos 18:2 y/o ii) menos de 10% o menos de 5% de ácidos grasos 18:3.

En una forma de realización preferida, la planta transgénica o parte de la misma es homocigota para cada uno y todos los genes (polinucleótido exógeno) que han sido introducidos (transgen) tal que la progenie no segrega el fenotipo deseado. La planta transgénica también puede ser heterocigota para el o los transgenes introducidos, preferentemente uniformemente heterocigota para el transgen, tal como por ejemplo en la progenie F1 que ha sido hecha crecer a partir de una semilla hibrida. Dichas plantas pueden proveer ventajas tales como vigor híbrido, bien conocido en el arte, o pueden ser usadas para la cruza o retrocruza de plantas.

Cuando resulta relevante, la planta transgénica o parte de la misma también puede comprender transgenes adicionales que codifican para enzimas involucradas en la producción de LC-PUFA tales como, a título enunciativo no taxativo, una Δ6-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ8-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-desaturasa, una ω3-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ5-elongasa, diacilglicerol aciltransferasa, LPAAT, una Δ17-desaturasa, una Δ15-desaturasa y/o una Δ12-desaturasa. Los ejemplos de dichas enzimas con una o más de estas actividades se conocen en el arte e incluyen aquellas descritas en la presente. En ejemplos específicos, la planta transgénica por lo menos comprende un conjunto de polinucleótidos exógenos que codifican para;

a) una Δ4-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-elongasa y una Δ6-elongasa,

b) una Δ4-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-elongasa y una Δ9-elongasa,

c) una Δ4-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-elongasa, una Δ6-elongasa, y una Δ15-desaturasa,

d) una Δ4-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-elongasa, una Δ9-elongasa, y una Δ15-desaturasa,

e) una Δ4-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-elongasa, una Δ6-elongasa, y una Δ17-desaturasa,

f) una Δ4-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-elongasa, una Δ9-elongasa, y una Δ17-desaturasa,

g) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

h) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

j) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

k) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

l) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

m) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

n) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

o) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y

opcionalmente una Δ4-desaturasa,

p) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa,

q) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa, o

r) una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa, una Δ5-elongasa y opcionalmente una Δ4-desaturasa.

En una forma de realización, los polinucleótidos exógenos codifican para un conjunto de polipéptidos que son una Δ6-desaturasa de *Pythium irregulare*, una Δ5-desaturasa de *Thraustochytrid* o una Δ5-desaturasa de *Emiliana huxleyi*, una Δ6-elongasa de *Physcomitrella patens*, una Δ5-elongasa de *Thraustochytrid* o una Δ5-elongasa de *Ostreocccus taurii*, una ω3-desaturasa de *Phytophthora infestans* o una ω3-desaturasa de *Pythium irregulare*, y una Δ4-desaturasa de *Thraustochytrid*.

En una forma de realización, las plantas de, o usadas para, la invención se hicieron crecer en el campo, preferentemente como una población de por lo menos 1.000, 1.000.000 o 2.000.000 plantas que son esencialmente las mismas, o en un área de por lo menos 1 hectárea o 2 hectáreas. Las densidades de plantación difieren de acuerdo con la especie de la planta, variedad de la planta, clima, condiciones del suelo, tasas de fertilización y otros factores conocidos en el arte. Por ejemplo, la canola se hace crecer típicamente con una densidad de plantación de entre 1,2 y 1,5 millones de plantas por hectárea. Las plantas se recolectan tal como se conoce en el arte, que puede comprender surcado, formación de hileras y/o cosechado de las plantas, seguido por desgranado y/o separación del material de la planta para separar

la semilla del resto de las partes de la planta con frecuencia en la forma de forraje. Como alternativa, la semilla puede ser recolectada de las plantas en el campo en un proceso simple, es decir por combinación.

Transformación de plantas

Se pueden producir plantas transgénicas usando técnicas conocidas en el arte, tales como las que se describen en forma general en A. Slater y col., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), y P. Christou y H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004).

Tal como se usan en la presente, los términos “transformación estable”, “transformado establemente” y variantes de los mismos se refieren a la integración de moléculas de ácido nucleico exógeno en el genoma de la célula de forma que los mismos se transfieren a las células de la progenie durante la división celular sin la necesidad de seleccionar positivamente para su presencia. Los transformantes estables, o progenie de los mismos, pueden seleccionarse por cualquier medio conocido en el arte tal como transferencia Southern de ADN cromosómico o hibridización *in situ* de ADN genómico. Preferentemente, la transformación de plantas se lleva a cabo como se describe en los Ejemplos de la presente.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es un sistema de amplia aplicación para introducir genes en células vegetales debido a que el ADN puede introducirse en las células en tejidos de plantas enteras o en órganos o explantes vegetales en cultivo de tejidos, para expresión transitoria o bien para integración estable del ADN del genoma de las células vegetales. El uso de vectores de integración en plantas mediada por *Agrobacterium* para introducir ADN en células vegetales es bien conocido en el arte (véase por ejemplo, US 5177010, US 5104310, US 5004863 o US 5159135) incluyendo a los métodos de inmersión floral que usan *Agrobacterium* u otra bacteria que pueda transferir ADN a las células vegetales. La

región de ADN a ser transferida se define mediante las secuencias borde, y el ADN (ADN-T) interviniente se inserta usualmente en el genoma de la planta. Además, la integración del ADN-T es un proceso relativamente preciso que resulta en unos pocos rearreglos. En aquellas variedades de plantas en donde la transformación mediada por *Agrobacterium* es eficaz, es el método de elección debido a la naturaleza fácil y definida de la transferencia génica. Los vectores para transformación de *Agrobacterium* preferidos son capaces de replicarse en *E. coli* así como también en *Agrobacterium*, lo que permite las manipulaciones convenientes como se ha descrito previamente (Klee y col., En: Plant ADN Infectious Agents, Hohn y Schell, eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 179-203 (1985).

Los métodos de aceleración que se pueden usar incluyen a, por ejemplo, bombardeo con microproyectiles y similares. Un ejemplo de un método para administrar moléculas de ácido nucleico transformante a las células vegetales es el bombardeo con microproyectiles. Este método se ha revisado en Yang y col., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, Inglaterra (1994). Las partículas no biológicas (microproyectiles) se pueden recubrir con ácidos nucleicos y administrarse a las células mediante una fuerza propulsora. Los ejemplos de partículas incluyen a las que comprenden tungsteno, oro, platino, y similares. Una ventaja particular del bombardeo con microproyectiles, además de que es un medio eficaz de transformación reproducible de monocotiledóneas, es que no se requiere el aislamiento de protoplastos, ni la susceptibilidad de la infección con *Agrobacterium*.

En otra forma de realización alternativa, se pueden transformar establemente plástidos. Los métodos divulgados para transformación de plástidos en plantas superiores incluyen la administración con pistola de partículas de ADN que contiene un marcador de selección y el direccionamiento del ADN hacia el genoma del plástido a través de recombinación homóloga (US 5.451.513, US 5.545.818, US 5.877.402, US

5.932479, y WO99/05265).

También se pueden usar otros métodos de transformación celular y los mismos incluyen a, a título enunciativo no taxativo, la introducción de ADN en las plantas por transferencia directa de ADN en polen, por inyección directa de ADN en los órganos reproductivos de una planta, o por inyección directa de ADN en las células de embriones inmaduros seguido por la rehidratación de los embriones desecados.

La regeneración, desarrollo, y cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos de plantas individuales o de diversos explantes transformados son bien conocidos en el arte (Weissbach y col., En: Métodos for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988). Este proceso de regeneración y crecimiento típicamente incluye los pasos de selección de células transformadas y cultivo de las células individuales a través de las etapas usuales de desarrollo embrionario a través de etapa de plántula enraizada. Los embriones y las semillas transgénicas se regeneran en forma similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se planta luego en un medio de crecimiento vegetal adecuado tal como en suelo.

El desarrollo y regeneración de plantas que contienen el gen exógeno foráneo son bien conocidos en el arte. Preferentemente, las plantas regeneradas se autopolinizan para proveer plantas transgénicas homocigotas. Por otro lado, el polen que se obtiene a partir de las plantas regeneradas se cruza con plantas crecidas a partir de semillas de líneas agronómicamente importantes. Por el contrario, el polen de estas plantas de líneas importantes se usa para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un ácido nucleico exógeno deseado se cultiva usando métodos bien conocidos para una persona con experiencia en el arte.

Para confirmar la presencia de los transgenes en las células y plantas

transgénicas, se puede llevar a cabo una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o análisis por transferencia Southern usando métodos bien conocidos en el arte. Los productos de la expresión de los transgenes pueden detectarse mediante cualquiera de una variedad de maneras, dependiendo de la naturaleza del producto, e incluyen transferencia Western y ensayo enzimático. Una vez que se han obtenido las plantas transgénicas, las mismas se pueden crecer para producir tejidos o partes vegetales que tienen el fenotipo deseado. El tejido vegetal o partes de plantas, pueden cosecharse, y/o recolectarse las semillas. La semilla puede servir como una fuente para crecer plantas adicionales con tejidos o partes que tienen las características deseadas.

Una planta transgénica formada usando *Agrobacterium* u otros métodos de transformación típicamente contiene un locus genético individual en un cromosoma. Dichas plantas transgénicas pueden denominarse como hemicigotas para el o los genes agregados. Más preferida es una planta transgénica que es homocigota para el o los genes agregados; o sea, una planta transgénica que contiene dos genes agregados, un gen en el mismo locus en cada cromosoma de un par cromosómico. Una planta transgénica homocigota puede obtenerse mediante autofertilización de una planta transgénica hemicigota, mediante la germinación de alguna de las semillas producidas y analizando las plantas resultantes para los genes de interés.

También ha de comprenderse que dos plantas transgénicas diferentes que contienen dos genes o loci exógenos de segregación independiente también pueden cruzarse (aparearse) para producir descendencia que contiene ambos grupos de genes o loci. La autopolinización de una progenie apropiada F1 puede producir plantas que sean homocigotas para ambos genes o loci exógenos. El retrocruce con una planta parental y el cruce con una planta no transgénica también están contemplados, tanto como la propagación vegetativa. Pueden hallarse descripciones de otros

métodos de cruzamiento que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en Fehr, En: Breeding Métodos for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Aumento de niveles de ARN exógenos y expresión estabilizada

Supresores de silenciamiento

En una forma de realización, una célula vegetal, planta o parte de planta comprende un polinucleótido exógeno que codifica para una proteína supresora de silenciamiento.

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) es un mecanismo de defensa específico de secuencia nucleotídica que puede alcanzar a ARNm tanto celulares como virales para su degradación. El PTGS ocurre en plantas o en hongos transformados establemente o transitoriamente con ADN foráneo (heterólogo) o endógeno y resulta en una menor acumulación de moléculas de ARN con similitud de secuencia al ácido nucleico introducido.

Se ha considerado ampliamente que la coexpresión de un supresor de silenciamiento con un transgen de interés incrementará los niveles de ARN presentes en la célula que se transcriben a partir del transgen. Mientras que esto se ha probado como verdadero para células *in vitro*, se han observado efectos secundarios significativos en muchos estudios de coexpresión e plantas enteras. Más específicamente, como se describe en Mallory y col. (2002), Chapman y col. (2004), Chen y col. (2004), Dunoyer y col. (2004), Zhang y col. (2006), Lewsey y col. (2007) y Meng y col. (2008) las plantas que expresan supresores de silenciamiento, en general bajo promotores constitutivos, con frecuencia son fenotípicamente anormales en la extensión en la que no son útiles para producción comercial.

Recientemente se ha hallado que los niveles de moléculas de ARN pueden incrementarse, y/o los niveles de moléculas de ARN pueden estabilizarse en

numerosas generaciones mediante la limitación de la expresión del supresor de silenciamiento a una semilla de una planta o parte de la misma (WO2010/057246). Tal como se usa en la presente, una “proteína supresora de silenciamiento” o SSP es cualquier polipéptido que se pueda expresar en una célula vegetal que aumente el nivel de producto de expresión a partir de otro transgen en la célula vegetal, en particular durante varias generaciones a partir de la planta inicialmente transformada. En una forma de realización, la SSP es un supresor de silenciamiento viral o mutante del mismo. Se conocen en el arte un gran número de supresores de silenciamiento virales e incluyen a, a título enunciativo no taxativo, P19, V2, P38, Pe-Po y RPV-P0. En una forma de realización, el supresor de silenciamiento viral comprende aminoácidos que tienen una secuencia como se provee en SEQ ID NO:38, un fragmento biológicamente activo de la misma, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 50% idéntica a SEQ ID NO:38 y que tiene actividad como un supresor de silenciamiento.

Tal como se usa en la presente, los términos “expresión estabilizante”, “establemente expresado”, “expresión estabilizada” y variantes de los mismos se refieren al nivel de la molécula de ARN que es esencialmente igual o mayor en las plantas de la progenie a lo largo de generaciones repetidas, por ejemplo por lo menos tres, por lo menos cinco o por lo menos 10 generaciones, en comparación con plantas isogénicas que carecen del polinucleótido exógeno que codifica para el supresor de silenciamiento. Sin embargo, este o estos términos no excluyen la posibilidad de que en generaciones repetidas haya algo de pérdida de los niveles de la molécula ARN en comparación con una generación previa, por ejemplo no menos de 10% de pérdida por generación.

El supresor se puede seleccionar de cualquier fuente por ejemplo vegetal, viral, de mamífero, etc. Véase WO2010/057246 para una lista de virus a partir de los cuales

se puede obtener el supresor y la proteína (por ejemplo B2, P14 etc.) o designación de región codificante para el supresor de cada virus particular. Se pueden usar múltiples copias de un supresor. Pueden usarse diferentes supresores juntos (por ejemplo, en tándem).

Moléculas de ARN

Esencialmente puede coexpresarse cualquier molécula de ARN que sea deseable expresar en una semilla de planta con el supresor de silenciamiento. Los polipéptidos codificados pueden estar involucrados en el metabolismo del aceite, almidón, hidratos de carbono, nutrientes, etc., o pueden ser responsable de la síntesis de proteínas, péptidos, ácidos grasos, lípidos, ceras, aceites, almidones, azúcares, hidratos de carbono, saborizantes, odorantes, toxinas, carotenoides, hormonas, polímeros, flavonoides, proteínas de almacenamiento, ácidos fenólicos, alcaloides, ligninas, taninos, celulosas, glicoproteínas, glicolípidos, etc, preferentemente en la biosíntesis o ensamblaje de TAG.

En un ejemplo particular, las plantas produjeron niveles incrementados de enzimas para producción de aceite en plantas tales como Brassicas, por ejemplo canola o girasol, cártamo, lino, algodón, poroto de soja, *Camelina* o maíz.

Niveles de los LC-PUFA producidos

Los niveles de LC-PUFA o de la combinación de LC-PUFA que se producen en la célula o parte de planta recombinante tal como una semilla, son de importancia. Los niveles se pueden expresar como una composición (en porcentaje) del ácido graso total que es un LC-PUFA particular o grupo de LC-PUFA relacionados, por ejemplo los ω3 LC-PUFA o los ω6 LC-PUFA, o los VLC-PUFA, u otros que se pueden determinar por métodos conocidos en el arte. El nivel también se puede expresar como un contenido de LC-PUFA, tal como por ejemplo el porcentaje de LC-PUFA en el peso seco de material que comprende las células recombinantes, por ejemplo el porcentaje

del peso de la semilla que está constituido por LC-PUFA. Se apreciará que el LC-PUFA que se produce en una semilla aceitera puede ser considerablemente mayor en términos de contenido de LC-PUFA que en un vegetal o un grano que no se crece para la producción de aceite, incluso ambos pueden tener composiciones similares de LC-PUFA, y ambos pueden usarse como fuentes de LC-PUFA para consumo humano o animal.

Los niveles de LC-PUFA pueden determinarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en el arte. En un método preferido, se extraen los lípidos totales de las células, tejidos u organismos y se convierten los ácidos grasos a ésteres de metilo antes de su análisis por cromatografía gaseosa (GC). Dichas técnicas se describen en el Ejemplo 1. La posición del pico en el cromatograma puede usarse para identificar cada ácido graso particular, y se integra el área bajo cada pico para determinar su cantidad. Tal como se usa en la presente, a menos que se establezca lo contrario, el porcentaje de un ácido graso particular en una muestra se determina como el área bajo el pico para ese ácido graso como un porcentaje del área total para los ácidos grasos en el cromatograma. Esto corresponde esencialmente a un porcentaje en peso (peso en peso). La identidad de los ácidos grasos puede confirmarse por GC-MS. Se pueden separar los lípidos totales por técnicas conocidas en el arte para purificar fracciones tales como la fracción de TAG. Por ejemplo, se puede realizar una cromatografía de capa delgada (TLC) a escala analítica para separar los TAG de otras fracciones lipídicas tales como los DAG, los acil-CoA o los fosfolípidos con el objetivo de determinar la composición de ácidos grasos específicamente de TAG.

En una forma de realización, la suma total de ARA, EPA, DPA y DHA en los ácidos grasos en el lípido extraído es entre aproximadamente 21% y aproximadamente 40% de los ácidos grasos totales en la célula. En una forma de realización adicional, el total de ácidos grasos en la célula es de menos de 1% de

C20:1. En formas de realización preferidas, los TAG extraíbles en la célula comprenden los ácidos grasos a los niveles en que se hace referencia en la presente. Cada combinación posible de las características que definen el lípido como se describe en la presente está también abarcada.

El nivel de producción de LC-PUFA en la célula, planta o parte de planta recombinante tal como una semilla también puede expresarse como un porcentaje de conversión de un ácido grasos sustrato específico a uno o más ácidos grasos productos, lo que también se denomina en la presente como una “eficacia de conversión” o “eficacia enzimática”. Este parámetro se basa en la composición de ácidos grasos en el extracto lipídico de la célula, planta, parte de planta o semilla, o sea, la cantidad del LC-PUFA formado (incluyendo a otros LC-PUFA que derivan del mismo) como un porcentaje de uno o más ácidos grasos sustratos (incluyendo a todos los otros ácidos grasos derivados del mismo). La fórmula general para un porcentaje de conversión es: 100 x (la suma de porcentajes del LC-PUFA producto y todos los productos que derivan del mismo)/(la suma de los porcentajes del ácido graso sustrato y todos los productos que derivan del mismo). Con respecto al DHA, por ejemplo, este puede expresarse como la proporción del nivel de DHA (como porcentaje en el contenido total de ácidos grasos en el lípido) al nivel de un ácido graso sustrato (por ejemplo OA, LA, ALA, SDA, ETA o EPA) y todos los productos incluyendo al DHA que deriva del sustrato. El porcentaje de conversión o eficacia de conversión puede expresarse mediante para un paso enzimático individual en una ruta, o para parte o la vía completa.

Las eficiencias de conversión específicas se calculan en la presente de acuerdo a las fórmulas:

1. OA a DHA = 100 x (% de DHA)/(suma de % para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA).

2. LA a DHA = 100 x (% de DHA)/(suma de % para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA).

3. ALA a DHA = 100 x (% de DHA)/(suma de % para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA).

4. EPA a DHA = 100 x (% de DHA)/(suma de % para EPA, DPA y DHA).

5. DPA a DHA (eficacia de Δ4-desaturasa) = 100 x (% de DHA)/(suma de % para DPA y DHA).

6. Eficacia de Δ12-desaturasa = 100 x (suma de % para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA)/ (suma de % para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA).

7. Eficacia de ω3-desaturasa = 100 x (suma de % para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA)/(suma de % para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA).

8. OA a ALA = 100 x (suma de % para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA)/(suma de % para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA).

9. Eficacia de Δ6-desaturasa (sobre sustrato ω3 ALA) = 100 x (suma de % para SDA, ETA, EPA, DPA y DHA)/ (%ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA).

10. Eficacia de Δ6-elongasa (sobre sustrato ω3 SDA) = 100 x (suma de % para ETA, EPA, DPA y DHA)/ (suma de % para SDA, ETA, EPA, DPA y DHA).

11. Eficacia de Δ5-desaturasa (sobre sustrato ω3 ETA) = 100 x (suma de % para EPA, DPA y DHA)/ (suma de % para ETA, EPA, DPA y DHA).

12. Eficacia de Δ5-elongasa (sobre sustrato ω3 EPA) = 100 x (suma de % para DPA y DHA)/ (suma de % para EPA, DPA y DHA).

La composición de ácidos grasos del lípido, preferentemente aceite de semilla, de la invención, también se caracteriza por la proporción de ácidos grasos ω6: ácidos

grasos ω3 en el contenido total de ácidos grasos, ya sea para los ácidos grasos totales ω6: ácidos grasos totales ω3 o para los nuevos ácidos grasos ω6: nuevos ácidos grasos ω3. Los términos ácidos grasos totales ω6, ácidos grasos totales ω3, nuevos ácidos grasos ω6 y nuevos ácidos grasos ω3 tienen los significados que se definen en la presente. Las proporciones se calculan a partir de la composición de ácidos grasos en el lípido extraído de la célula, planta, parte de planta o semilla, en la forma que se ejemplifica en la presente. Es deseable tener un mayor nivel de ácidos grasos ω3 que de ácidos grasos ω6 en el lípido, y por lo tanto se prefiere una proporción ω6: ω3 de menos de 1,0. Una proporción de 0,0 indica una ausencia completa de los ácidos grasos ω6 definidos; se consiguió una proporción de 0,03. Dichas bajas proporciones pueden conseguirse a través del uso combinado de una Δ6-desaturasa que tiene una preferencia de sustrato ω3 junto con una ω3-desaturasa, en particular una ω3-desaturasa fúngica tal como la ω3-desaturasa de *Pichia pastoris* como se ejemplifica en la presente.

El rendimiento de los LC-PUFA por peso de semilla también puede calcularse en base al contenido de aceite total en la semilla y el % de DHA y/o DPA en el aceite. Por ejemplo, si el contenido de aceite de la semilla de canola es aproximadamente 40% (peso en peso) y aproximadamente 12% del contenido total de ácidos grasos del aceite es DHA, el contenido de DHA de la semilla es aproximadamente 4,8% o aproximadamente 48 mg por gramo de semilla. Como se describe en el Ejemplo 2, el contenido de DHA de la semilla de *Arabidopsis* que tiene aproximadamente 9% de DHA, que tiene un menor contenido de aceite que la canola, fue de aproximadamente 25 mg/g de semilla. Para un contenido de DHA de aproximadamente 21%, la semilla de canola o la semilla de *Camelina sativa* tiene un contenido de DHA de aproximadamente 84 mg por gramo de semilla. La presente invención por lo tanto provee plantas de *Brassica napus, B. juncea* y *Camelina sativa*, y semillas que se

obtienen de las mismas, que comprenden por lo menos aproximadamente 80 mg o por lo menos aproximadamente 84 mg de DHA por gramo de semilla. La semilla tiene un contenido de humedad estándar para una semilla madura cosechada después de su secado (entre 4 y 15% de humedad). La invención también provee un proceso para obtener aceite, que comprende obtener la semilla y extraer el aceite de la semilla, y usos del aceite y métodos para obtener la semilla que comprenden cosechar las semillas de las plantas de acuerdo a la invención.

La cantidad de DHA y/o DPA producido por hectárea también se puede calcular si el rendimiento de semilla por hectárea es conocido o puede estimarse. Por ejemplo, la canola en Australia típicamente rinde aproximadamente 2,5 toneladas de semilla por hectárea, que a un contenido de aceite de 40% rinde aproximadamente 1000 kg de aceite. Para 20,1% de DHA y/o DPA en el aceite total, esto provee aproximadamente 200 kg de DHA y/o DPA por hectárea. Si el contenido de aceite se reduce en 50%, esto aún provee aproximadamente 100 kg de DHA y/o DPA/ha.

Hasta la fecha, la evidencia sugiere que algunas desaturasas expresadas heterólogamente en levadura o plantas tienen una actividad relativamente baja en combinación con algunas elongasas. Esto se puede mejorar proveyendo una desaturasa con una capacidad para usar una forma de acil-CoA del ácido graso como sustrato en la síntesis de LC-PUFA, y se cree que esto es ventajoso en células recombinantes particularmente en células vegetales. Una combinación particularmente ventajosa para una síntesis eficiente de DHA y/o DPA es una ω3-desaturasa fúngica, por ejemplo tal como la ω3-desaturasa de *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 6), con una Δ6-desaturasa que tiene una preferencia por sustratos ω3 acilo tales como, por ejemplo, la Δ6-desaturasa de *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 9), o variantes de las mismas que tienen por lo menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos.

Tal como se usa en la presente, el término “esencialmente libre” significa que la

composición (por ejemplo lípido o aceite) comprende poco (por ejemplo, menos de aproximadamente 0,5%, menos de aproximadamente 0,25%, menos de aproximadamente 0,1%, o menos de aproximadamente 0,01%) o nada del componente definido. En una forma de realización, “esencialmente libre” significa que el componente es indetectable usando una técnica analítica de rutina, por ejemplo un ácido graso especificado (tal como ácido docosapentaenoico ω6) no se puede detectar usando cromatografía gaseosa como se describe en el Ejemplo 1.

Producción de aceites

Pueden usarse las técnicas que se practican rutinariamente en el arte para extraer, procesar, y analizar los aceites producidos por las células, plantas, semillas, etc., de la presente invención. Típicamente, las semillas de plantas se cocinan, prensan, y extraen para producir aceite crudo, el que luego se desgoma, refina, blanquea, y desodoriza. En general, las técnicas para romper las semillas se conocen en el arte. Por ejemplo, las semillas aceiteras pueden temperarse por atomizado de las mismas con agua para elevar el contenido de humedad a, por ejemplo, 8,5%, y cortarse en láminas usando un rodillo fino con un espacio de corte entre 0,23 y 0,27 mm. Dependiendo del tipo de semilla, puede no agregarse agua antes de la ruptura. La aplicación de calor desactiva enzimas, facilita la ruptura celular, reúne las gotas de aceite, y aglomera las partículas de proteínas, todos los cuales facilitan el proceso de extracción.

En una forma de realización, la mayor parte del aceite de semilla se libera por pasaje a través de prensa de tornillo. Las tortas que se obtienen en la prensa de tornillo se extraen luego con solvente, por ejemplo, con hexano, usando una columna con calor. Como alternativa, el aceite crudo que se produce por la operación de prensado puede pasarse a través de un tanque de decantación con un drenaje con manguera acanalada superior para eliminar los sólidos que se exprimen con el aceite

durante la operación de prensado. El aceite clarificado puede pasarse a través de un filtro de placa y marco para eliminar las partículas de sólido fino remanentes. Si se desea, el aceite que se recupera del proceso de extracción puede combinarse con el aceite clarificado para producir un aceite crudo mezclado.

Una vez que se elimina el solvente del aceite crudo, las porciones prensadas y extraídas se combinan y someten a procedimientos para procesamiento de aceite normal. Tal como se usa en la presente, el término "purificado" cuando se lo usa en conexión con el lípido o aceite de la invención típicamente significa que el lípido o aceite extraído se ha sometido a uno o más pasos de procesamiento para incrementar la pureza del componente de lípido/aceite. Por ejemplo, un paso de purificación puede comprender uno o más o todos los del grupo que consiste en: desgomado, desodorizado, decolorado, secado y/o fraccionado del aceite extraído. Sin embargo, tal como se usa en la presente, el término "purificado" no incluye al proceso de transesterificación u otro proceso que altere la composición de ácidos grasos del lípido o aceite de la invención de forma de incrementar el contenido de DHA como porcentaje del contenido total de ácidos grasos. En otras palabras, la composición de ácidos grasos del lípido o aceite purificado es esencialmente la misma que en el lípido o aceite sin purificar.

Desgomado

El desgomado es un paso temprano en el refinamiento de aceites y su propósito primario es la eliminación de la mayoría de los fosfolípidos del aceite, lo que puede representar entre aproximadamente 1 y 2% del lípido total extraído. El agregado de ~2% de agua, típicamente conteniendo ácido fosfórico, entre 70 y 80°C al aceite crudo resulta en la separación de la mayoría de los fosfolípidos acompañados por metales traza y pigmentos. El material insoluble que se elimina es principalmente una mezcla de fosfolípidos y triacilgliceroles y también se conoce como lecitina. El

desgomado puede llevarse a cabo por agregado de ácido fosfórico concentrado al aceite de semilla crudo para convertir los fosfátidos no hidratables a una forma hidratable, y para quelar metales minoritarios que estén presentes. La goma se separa del aceite de semilla por centrifugación.

Refinamiento con álcalis

El refinamiento con álcalis es uno de los procesos de refinamiento para tratar al aceite crudo, a veces también llamado neutralización. Usualmente sigue al desgomado y precede al blanqueo. Después del desgomado, el aceite de semilla puede tratarse por agregado de una cantidad suficiente de una solución alcalina para titular todos los ácidos grasos y ácidos fosfóricos, y eliminar los jabones que se forman. Los materiales alcalinos adecuados incluyen a hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio e hidróxido de amonio. Este proceso típicamente se lleva a cabo a temperatura ambiente y elimina la fracción de ácido graso. El jabón se elimina por centrifugación o por extracción en un solvente de jabón, y el aceite neutralizado se lava con agua. Si se requiere, el álcali de exceso en el aceite puede neutralizarse con un ácido adecuado tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

Blanqueo

El blanqueo es un proceso de refinamiento en donde el aceite se calienta entre 90 y 120°C entre 10 y 30 minutos en presencia de una tierra de blanqueo (entre 0,2 y 2,0%) y en ausencia de oxígeno mediante operación con nitrógeno o vapor o en vacío. Este paso en el procesamiento de aceite se diseña para eliminar los pigmentos no deseados (carotenoides, clorofila, gosipol, etc), y el proceso también elimina los productos de oxidación, metales traza, compuestos de azufre y trazas de jabón.

Desodorización

La desodorización es un tratamiento de aceites y grasas a una alta temperatura

(entre 200 y 260°C) y baja presión (entre 0,1 y 1 mm Hg). Esto se consigue típicamente por introducción de vapor en el aceite de semilla a una velocidad de aproximadamente 0,1 ml/minuto/100 ml de aceite de semilla. Después de aproximadamente 30 minutos de aspersión, el aceite de semilla se deja enfriar bajo vacío. El aceite de semilla típicamente se transfiere a un recipiente de vidrio y se trata con argón antes de almacenarse bajo refrigeración. Este tratamiento mejora el color del aceite de semilla y elimina la mayoría de las sustancias volátiles o compuestos odoríferos incluyendo a cualquiera de los ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y productos de oxidación.

Winterización

La winterización es un proceso que se usa a veces en la producción comercial de aceites para la separación de aceites y grasas en fracciones sólida (estearina) y líquida (oleína) por cristalización a temperaturas subambientales. El mismo se aplicó originalmente a aceite de algodón para producir a un producto libre de sólidos. Típicamente se usa para disminuir el contenido de ácidos grasos saturados de los aceites.

Transesterificación

Tal como se usa en la presente, “transesterificación” se refiere a un proceso que intercambia los ácidos grasos dentro y entre los TAG o transfiere los ácidos grasos a otro alcohol para formar un éster. Inicialmente esto puede implicar la liberación de ácidos grasos de los TAG como ácidos grasos libres o el mismo puede producir directamente ésteres de ácidos grasos, preferentemente ésteres de metilo o ésteres de etilo de ácido graso. En una reacción de transesterificación del TAG con un alcohol tal como metanol o etanol, el grupo alquilo del alcohol forma una unión éster con los grupos acilo (incluyendo el DHA) del TAG. Cuando se lo combina con un proceso de fraccionamiento, se puede usar la transesterificación para modificar la

composición de ácidos grasos de los lípidos (Marangoni y col., 1995). La transesterificación puede usar medios químicos (por ejemplo catalizado por ácido o base fuerte) o enzimáticos, en donde este último usa lipasas que pueden ser específicas de posición (específicas para *sn*-1/3 o *sn-2*) para el ácido graso del TAG, o que tienen preferencia por algunos ácidos grasos por sobre otros (Speranza y col, 2012). El fraccionamiento de ácidos grasos para incrementar la concentración de LC-PUFA en un aceite puede hacerse mediante cualquiera de los métodos conocidos en el arte, tales como, por ejemplo, cristalización por congelado, formación de complejos usando urea, destilación molecular, extracción de fluido supercrítico, cromatografía contraiónica y complejación con iones de plata. La formación de complejos con urea es un método preferido por su simplicidad y eficacia para reducir el nivel de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el aceite (Gamez y col., 2003). Inicialmente, los TAG del aceite se separan en sus ácidos grasos constituyentes, con frecuencia en la forma de ésteres de ácido graso, por hidrólisis bajo condiciones de reacción catalizada con ácido o base, mediante lo cual se hace reaccionar un mol de TAG con por lo menos 3 moles de alcohol (por ejemplo etanol para ésteres de etilo o metanol para ésteres de metilo) con exceso de alcohol usado para permitir la separación de los ésteres de alquilo formados y el glicerol que también se forma, o por lipasas. Estos ácidos grasos libres o ésteres de ácido graso, que usualmente no se alteran en la composición de ácidos grasos por el tratamiento, puede mezclarse luego con una solución etanólica de urea para formación de complejo. Los ácidos grasos saturados o monoinsaturados se complejan fácilmente con urea y se separan por cristalización con el enfriamiento, y subsiguientemente se pueden eliminar por filtración. La fracción no complejada con urea está enriquecida entonces con LC-PUFA.

Alimentos

La presente invención incluye composiciones que se pueden usar como

alimentos. Para los propósitos de la presente invención, los "alimentos" incluyen a cualquier comida o preparación para consumo humano o animal que cuando es tomada por el cuerpo (a) sirve para nutrir o construir tejidos o proveer energía; y/o (b) mantener, restituir o apoyar un estado nutricional o función metabólica adecuada. Los alimentos de la invención incluyen composiciones nutricionales para bebés y/o niños pequeños tales como, por ejemplo, fórmula para infantes, y alimento a base de semillas de la invención.

Los alimentos de la invención comprenden, por ejemplo, una célula de la invención, una planta de la invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención, un extracto de la invención, el producto del método de la invención, el producto del proceso de fermentación de la invención, o una composición junto con uno o más transportadores apropiados. El término "transportador" se usa en su sentido más amplio para abarcar cualquier componente que puede tener o no un valor nutricional. Las personas con experiencia han de apreciar que el transportador puede ser adecuado para usar (o usarse en una concentración suficientemente baja) en un alimento de forma que el mismo no tiene efectos deletéreos sobre un organismo que consume el alimento.

El alimento de la presente invención comprende un aceite, éster de ácido graso, o ácido graso producido directamente o indirectamente para usar en los métodos, células o plantas que se divulgan en la presente. La composición puede estar o bien en una forma sólida o bien líquida. Además, la composición puede incluir macronutrientes comestibles, proteína, carbohidrato, vitaminas, y/o minerales en cantidades deseadas para un uso particular. Las cantidades de estos ingredientes variarán dependiendo de si la composición está pensada para usar con individuos normales o para usar con individuos que tienen necesidades especiales, tales como individuos que sufren de trastornos metabólicos y similares.

Los ejemplos de transportadores apropiados con valor nutricional incluyen a, a título enunciativo no taxativo, macronutrientes tales como grasas, hidratos de carbono y proteínas comestibles. Los ejemplos de dichas grasas comestibles incluyen a, a título enunciativo no taxativo, aceite de coco, aceite de borraja, aceite fúngico, aceite de grosellas negras, aceite de soja, y mono y diglicéridos. Los ejemplos de dichos hidratos de carbono incluyen (a título enunciativo no taxativo): glucosa, lactosa comestible, y almidón hidrolizado. Además, los ejemplos de proteínas que se pueden utilizar en la composición nutricional de la invención incluyen (a título enunciativo no taxativo) proteínas de soja, suero electrodializado, leche descremada electrodializada, suero de leche, o los hidrolizados de estas proteínas.

Con respecto a las vitaminas y minerales, se pueden agregar los siguientes a las composiciones alimento de la presente invención: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, iodo, y Vitaminas A, E, D, C, y el complejo B. También se pueden agregar otras vitaminas y minerales.

Los componentes que se utilizan en las composiciones de alimento de la presente invención pueden ser de origen semi purificado o purificado. Como semi purificado o purificado se designa a un material que se ha preparado mediante purificación de un material natural o por síntesis *de novo*.

Una composición de alimento de la presente invención también puede agregarse a las comidas incluso cuando no se requiere una suplementación de la dieta. Por ejemplo, la composición puede agregarse a comidas de cualquier tipo, incluyendo (a título enunciativo no taxativo): margarina, manteca modificada, quesos, leche, yogurt, chocolate, caramelos, bocadillos, aceites para ensalada, aceites para cocina, grasas para cocina, carnes, pescados y bebidas.

Además, los ácidos grasos que se producen de acuerdo con la presente invención o las células huéspedes transformadas para contener y expresar los genes

de la invención pueden usarse como suplementos para alimento animal para alterar la composición de ácidos grasos de tejido, huevo o leche animal a una más deseable para el consumo humano o animal. Los ejemplos de dichos animales incluyen a oveja, ganado bovino, caballos, aves tales como pollos y similares.

Más aún, los alimentos de la invención pueden usarse en acuacultivo para incrementar los niveles de ácidos grasos en pescados o crustáceos tales como, por ejemplo, gambas para consumo humano o animal. Los pescados preferidos son los salmones.

Los alimentos preferidos de la invención son las plantas, semilla y otras partes de plantas tales como hojas y tallos que se pueden usar directamente como comida o alimento para humanos u otros animales. Por ejemplo, los animales pueden pastar directamente de dichas plantas crecidas a campo o pueden alimentarse con cantidades más medidas en alimentación controlada. La invención incluye el uso de dichas plantas y partes de plantas como alimento para incrementar los niveles de LC-PUFA en humanos y otros animales.

Composiciones

La presente invención también abarca composiciones, en partículas composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los ácidos grasos y/o aceites resultantes que se producen usando los métodos de la invención, preferentemente en la forma de ésteres de etilo de los ácidos grasos.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más de los ácidos grasos y/o aceites, en combinación con un transportador, adyuvante o vehículo estándar, bien conocido, no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como solución salina amortiguada con fosfato, agua, etanol, polioles, aceites vegetales, un agente humectante o una emulsión tal como una emulsi’on de agua/aceite. La composición puede estar en forma líquida o bien sólida. Por ejemplo, la composición puede estar en

la forma de un comprimido, cápsula, líquido o polvo digerible, inyectable, o ungüento tópico o crema. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula deseado en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saborizantes y agentes perfumantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden comprender agentes de suspensión tales como isostearil alcoholes etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

Las formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas pueden prepararse usando técnicas bien conocidas en el arte. Por ejemplo, los ácidos grasos que se producen de acuerdo con la presente invención pueden comprimirse con bases convencionales para comprimidos tales como lactosa, sacarosa, y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como acacia, almidón de maíz o gelatina, agentes desintegrantes tales como almidón de papa o ácido algínico, y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Las capsulas se pueden preparar por incorporación de estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y el o los ácidos grasos de interés.

Para administración intravenosa, los ácidos grasos que se producen de acuerdo con la presente invención o derivados de los mismos pueden incorporarse en formulaciones comerciales.

Una dosificación típica de un ácido graso particular es entre 0,1 mg y 20 g, tomado entre una y cinco veces por día (hasta 100 g por día) y preferentemente está

en el rango de entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 1, 2, 5, o 10 g por día (tomado en una o varias dosis). Como se conoce en el arte, es deseable un mínimo de aproximadamente 300 mg/día de ácido graso, en especial de LC-PUFA. Sin embargo, ha de apreciarse que cualquier cantidad de ácido graso será beneficiosa para el sujeto.

Las posibles rutas de administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, entérica (por ejemplo, oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, una preparación líquida puede administrarse por vía oral o rectal. Además, una mezcla homogénea puede dispersarse completamente en agua, mezclarse bajo condiciones estériles con diluyentes, conservantes, soluciones amortiguadoras o propelentes fisiológicamente aceptables para formar un atomizado o inhalante.

La dosificación de la composición a administrarse al paciente puede ser determinada por una persona con experiencia en el arte y depende de varios factores tales como el peso del paciente, edad del paciente, salud general del paciente, historia pasada del paciente, estado inmune del paciente, etc.

Además, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para propósitos cosméticos. Se pueden agregar a composiciones cosméticas preexistentes de manera de formar una mezcla, o se puede usar un ácido graso producido de acuerdo a la presente invención como el único ingrediente "activo" en una composición cosmética.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Expresión de genes en células vegetales en un sistema de expresión transitoria

Se expresaron construcciones genéticas exógenas en células vegetales en un sistema de expresión transitoria esencialmente como se describe en Voinnet y col.

(2003) y Wood y col. (2009).

Análisis por cromatografía gaseosa (GC) de ácidos grasos

Se analizaron los FAME por cromatografía gaseosa usando un Agilent Technologies 7890A GC (Palo Alto, California, EE.UU.) equipado con una columna SGE-BPX70 de 30 m (70 % de cianopropil polisilfenileno-siloxano, 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 mm de espesor de película), un FID, un inyector con divisor/sin divisor y un auto muestreador e inyector Agilent Technologies 7693 Series. Se usó Helio como gas transportador. Se inyectaron las muestras en modo divisor (proporción 50:1) a una temperatura de horno de 150 °C. Después de la inyección, se mantuvo la temperatura de horno a 150 °C durante 1 min luego se elevó a 210 °C a 3 °C/min, nuevamente se elevó a 240 °C a 50 °C/min y finalmente se mantuvo durante 1,4 min a 240 °C. Se cuantificaron los picos con el programa Agilent Technologies ChemStation (Rev B.04.03 (16), Palo Alto, California, EE.UU.) en base a la respuesta de la cantidad conocida del estándar externo GLC-411 (Nucheck) y del estándar interno C17:0-ME.

Análisis de lípidos por cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS)

Se extrajeron los lípidos totales de semillas en desarrollo secadas por congelación, doce días después de la floración (daf), y semillas maduras después de agregar una cantidad conocida de tri-C17:0-TAG como estándar interno de cuantificación. Los lípidos extraídos se disolvieron en 1 mL de hidroxitolueno butilado 10 mM en butanol: metanol (1:1 v/v) por cada 5 mg de material seco y se analizaron usando un LC Agilent 1200 series y un LC-MS cuadrupolar con triles ionización por electroatomizado 6410b. Se separaron cromatográficamente los lípidos usando una columna Ascentis Express RP-Amide (50 mm x 2,1 mm, 2.7 µm, Supelco) operando con gradiente binario de una velocidad de flujo de 0,2 mL/min. Las fases móviles fueron: A. formiato de amonio 10 mM en H_2O: metanol: tetrahidrofurano (50:20:30 v/v/v); B. formiato de amonio 10 mM en H_2O: metanol: tetrahidrofurano (5:20:75, v/v/v).

Las listas de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) se basaron en los siguientes ácidos grasos mayoritarios: 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6 usando una energía de colisión de 30 V y fragmentador de 60 V. Los TAG individuales de MRM se identificaron en base al ion precursor con amonio y al producto iónico a partir de la pérdida neutra de 22:6. El TAG se cuantificó usando un estándar externo de triestearina 10 µM.

Perfil lipídico por LC-MS

Se analizaron Los lípidos totales extraídos usando un Agilent 1200 series LC acoplado a un QQQ-MS de ionización por electroatomizado Agilent 6410B (Agilent, Palo Alto, California, EE.UU.). Se separó por cromatografía un volumen de inyección de 5 µL de cada extracto lipídico total con una columna de HPLC Ascentis Express RP-Amide de 50 mm x 2,1 mm, 2,7 µm (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia) usando un gradiente binario con una velocidad de flujo de 0,2 mL/min. Las fases móviles fueron: A. formiato de amonio 10 mM en H_2O: metanol: tetrahidrofurano (50:20:30, v/v/v.); B. formiato de amonio 10 mM en H_2O: metanol: tetrahidrofurano (5:20:75, v/v/v.). Se analizaron lípidos neutros seleccionados (TAG y DAG) y fosfolípidos (PL, incluyendo a PC, PE, PI, PS, PA, PG) por monitoreo de reacción múltiple (MRM) usando una energía de colisión de 30 V y una energía de fragmentación de 60 V. Se analizaron los lípidos neutros para los siguientes ácidos grasos mayoritarios: 16:0 (ácido palmítico), 18:0 (ácido esteárico), 18:1ω9 (ácido oleico, OA), 18:2ω6 (ácido linoleico, LA), 18:3ω3 (ácido α-linolénico, ALA), 18:4ω3 (ácido estearidónico, SDA), 20:1, 20:2, 20:3, 20:4ω3, 20:5ω3, 22:4ω3, 22:5ω3, 22:6ω3, mientras que se barrieron los fosfolípidos conteniendo las especies C_{16}, C_{18}, C_{20} y C_{22} con dobles enlaces de 0-3, 0-4, 0-5, 4-6 respectivamente.

Se identificó el TAG por MRM en base a ion precursor amoniatado y se cuantificó el ion producto de la pérdida neutra de 20:1, SDA, EPA y DHA. TAG y DAG

usando 50 µM de triestearina y diestearina como estándares externos. Se cuantificaron los PL con 10 µM de di-18:0-PC, di-17:0-PA, di-17:0-PE, 17:0-17:1-PG, di-18:1-PI y di-17:0-PS como estándares externos (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.). Además se confirmaron especies seleccionadas de TAG, DAG y PL por Agilent 6520 Q-TOF MS/MS.

Determinación de perfil de ácidos grasos de semilla y contenido de aceite

Para determinar el contenido de aceite de las semillas, se secaron las semillas en un desecador durante 24 h y se transfirieron aproximadamente 4 mg de semilla a un vial de vidrio de 2 ml conteniendo tapa a rosca forrada con Teflón. Se agregaron 0,05 mg de triheptadecanoina disuelta en 0,1 ml de tolueno al vial como estándar interno.

Se prepararon los FAME de semilla por agregado de 0,7 ml de HCl metanólico 1 N (Supelco) al vial conteniendo el material de semilla, se pasaron por vórtex brevemente y se incubaron a 80 °C durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 0,3 ml de NaCl al 0,9% (p/v) y 0,1 ml de hexano al vial y se mezclaron bien durante 10 min en un Heidolph Vibramax 110. Se recolectaron los FAME en inserto de vidrio de 0,3 ml y se analizaron por GC con un detector por ionización de llama (FID) como se mencionó previamente.

Primero se corrigieron las áreas de pico de los FAME individuales en base a las respuestas de área de pico de cantidades conocidas de los mismos FAME presentes en un estándar comercial GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC., EE.UU.). El GLC-411 contiene cantidades iguales de 31 ácidos grasos (% en peso), en el rango entre C8:0 y C22:6. En el caso de los ácidos grasos, que no estaban presentes en el estándar, los inventores tomaron las respuestas de área de pico del FAME más similar. Por ejemplo, se usó la respuesta de área de pico de los FAME de 16:1d9 para 16:1d7 y se usó la respuesta de los FAME de C22:6 para C22:5. Se usaron las áreas corregidas para

calcular la masa de cada FAME en la muestra por comparación con la masa del estándar interno. El aceite se almacena principalmente en la forma de TAG y se calculó su peso en base a peso del FAME. Se determinaron los moles totales de glicerol mediante el cálculo de los moles de cada FAME y dividiendo los moles totales de los FAME por tres. Se calculó el TAG como la suma de las porciones glicerol y acil graso usando una relación: % de aceite en peso= 100x ((41x moles totales de FAME/3) + (total g de FAME- (15x moles totales de FAME)))/g de semilla, en donde 41 y 15 son los pesos moleculares de la porción de glicerol y del grupo metilo, respectivamente.

Análisis del contenido de esteroles de las muestras de aceite

Se saponificaron muestras de aproximadamente 10 mg de aceite junto con una alícuota agregada de C24:0 monol como estándar interno usando 4 mL de KOH al 5% en MeOH al 80% y calentando durante 2 h a 80°C en un tubo de vidrio con tapa a rosa forrada con Teflón. Después de enfriar la mezcla de reacción, se agregaron 2 mL de agua Milli-Q y se extrajeron los esteroles en 2 mL de hexano: diclorometano (4:1 v/v) por agitación y vórtex. Se centrifugó la mezcla y se eliminaron los esteroles y se lavaron con 2 mL de Agua Milli-Q. Luego se eliminó el extracto de esteroles por agitación y centrifugación. Se evaporó el extracto usando una corriente de nitrógeno gaseoso y se sililaron los esteroles usando 200 mL de BSTFA y calentando durante 2 h a 80°C.

Para el Análisis de los esteroles por GC/GC-MS, se secaron los derivados de esterol-OTMSi bajo una corriente de nitrógeno gaseoso en un bloque de calentamiento a 40°C y luego se redisolvieron en cloroformo o hexano inmediatamente antes del análisis por GC/GC-MS. Se analizaron los derivados de esterol-OTMS por cromatografía gaseosa (GC) usando un Agilent Technologies 6890A GC (Palo Alto, California, EE.UU.) con una columna capilar de sílice fusionada Supelco Equity™-1

(15 m x 0,1 mm i.d., 0,1µm de espesor de película), un FID, un inyector con divisor/sin divisor y un automuestreador e inyector Agilent Technologies 7683B Series. El gas transportador fue Helio. Se inyectaron las muestras en modo sin divisor a una temperatura de horno de 120ºC. Después de la inyección, la temperatura de horno se elevó a 270ºC a 10ºC min^{-1} y finalmente a 300ºC a 5ºC min^{-1}. Se cuantificaron los picos con el programa Agilent Technologies ChemStation (Palo Alto, California, EE.UU.). Los resultados de GC están sometidos a un error de ±5% de las áreas de los componentes individuales.

Se llevaron a cabo análisis espectrométricos por GC-masa (GC-MS) en un Finnigan Thermoquest GCQ GC-MS y un Finnigan Thermo Electron Corporation GC-MS; embos sistemas incluyendo un inyector en columna y el programa Thermoquest Xcalibur (Austin, Texas, EE.UU.). Se colocó en cada GC una columna capilar de polaridad similar a la descrita previamente. Se identificaron los componentes individuales usando los datos espectrales de masa y por comparación de los datos de tiempo de retención con los que se obtuvieron por estándares auténticos y de laboratorio. Se llevó a cabo un análisis por blanco de procedimiento completo concurrentemente con el lote de muestras.

Condiciones de RT-PCR

La amplificación por PCR con transcripción reversa (RT-PCR) típicamente se llevó a cabo el sistema Superscript III One-Step RT-PCR (Invitrogen) en un volumen de 25 µL usando 10 pmol del cebador directo y 30 pmol del cebador reverso, $MgSO_4$ a una concentración final de 2,5 mM, 400 ng de ARN total con solución amortiguadora y componentes nucleotídicos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los regímenes típicos de temperatura fueron: 1 ciclo de 45°C durante 30 minutos para que ocurra la transcripción reversa; luego 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos seguidos por 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 70°C durante 1

minute; luego 1 ciclo de 72°C durante 2 minutos antes de enfriar las mezclas de reacción a 5°C.

Determinación de número de copias de transgenes por PCR digital

Para determinar el número de copias de transgenes en una planta transgénica, se usó un método de PCR digital como sigue. Este método también se puede usar para determinar si una planta era transgénica para las construcciones genéticas que se describen en la presente. Aproximadamente se cosechó un centímetro cuadrado de superficie de hoja de cada planta individual y se colocó en un microtubo de recolección (Qiagen). Luego se secaron por congelación las muestras entre 24 y 48 hr. Para romper las muestras para extracción de ADN, se agregaron esferas de acero inoxidable a cada muestra seca y se agitaron los tubos en un equipo de lisis Qiagen Tissue. Se agregaron 375 µL de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 0,1 M pH 8, EDTA 0,05 M a pH 8 y 1,25% de SDS) a cada tubo, se incubaron las mezclas a 65°C durante 1 hora, y luego se enfriaron antes de agregar 187 µL de acetato de amonio 6 M (4°C) a cada tubo con agitación vigorosa. Luego se centrifugaron las muestras durante 30 min a 3000 rpm. Se pasó el sobrenadante de cada tubo a nuevos microtubos conteniendo cada uno 220 µL de isopropanol para la precipitación del ADN a temperatura ambiente durante 5 min. Se recolectó el ADN centrifugando los tubos a 3000 rpm durante 30 min, se lavaron los pellets de ADN con 320 µL de etanol al 70% y se secaron antes de resuspender el ADN en 225 µL de agua. El material no disuelto se pelleteó por centrifugación a 3000 rpm durante 20 min, y se transfirieron 150 µL de cada sobrenadante a placas de 96 pocillos para almacenamiento a largo plazo.

Para la una PCR digital eficiente y cuantitativa (ddPCR) se digirió el ADN con enzimas de restricción antes de las reacciones de amplificación, para asegurar que las copias múltiples de los transgenes o las múltiples inserciones estaban físicamente separadas. Por lo tanto, se digirieron alícuotas de las preparaciones de ADN con

*Eco*RI y *Bam*HI, juntas, en volúmenes de 20 µL usando solución amortiguadora 10x para *Eco*RI, 5 µL de ADN y aproximadamente 4 unidades de cada enzima por muestra, se incubaron durante una noche a 37°C.

Los cebadores que se usaron en estas reacciones de PCR se diseñaron usando el programa Primer3 para confirmar que los cebadores de los genes de referencia y objetivo no interaccionarían, o que dicha interacción no sería un problema bajo las condiciones usadas. El gen de referencia que se usó en el ensayo fue el gen *Hmg* (grupo de alta movilidad) de canola, presente en un gen por genoma de canola (Weng y col., 2004). Debido a que la canola es un alotetraploide, se asumió que había 4 copias del gen de *Hmg*, o sea 2 alelos de cada uno de los dos genes, en *Brassica napus*. Las reacciones del gen de referencia usaron el par de cebadores y una sonda marcada dual, como sigue: Cebador directo, Can11 GCGAAGCACATCGAGTCA (SEQ ID NO:50); Cebador reverso, Can12 GGTTGAGGTGGTAGCTGAGG (SEQ ID NO:51); Sonda, Hmg-P3 5'-Hex/TCTCTAC/zen/CCGTCTCACATGACGC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:52). El tamaño del producto de amplificación fue de 73 pb.

En una reacción de amplificación de gen objetivo que detectó una región del gen marcador de selección *PPT* para cribar a todas las plantas transgénicas, el cebador directo fue Can17, ATACAAGCACGGTGGATGG (SEQ ID NO:53); el cebador reverso, Can18 TGGTCTAACAGGTCTAGGAGGA (SEQ ID NO:54); la sonda, PPT-P3 5'-/FAM/TGGCAAAGA/zen/GATTTCGAGCTTCCTGC/3IABkFQ/-3' (SEQ ID NO:55). El tamaño de este producto de amplificación de gen objetivo fue de 82 pb. En algunos casos, se llevó a cabo un ensayo para un segundo gen objetivo en paralelo para detectar inserciones parciales del ADN-T. Este segundo ensayo detectó una región del gen de la Δ6-desaturasa usando un cebador directo, Can23 CAAGCACCGTAGTAAGAGAGCA (SEQ ID NO:56), el cebador reverso, Can24 CAGACAGCCTGAGGTTAGCA (SEQ ID NO:57); la sonda, D6des-P3 5'-

/FAM/TCCCCACTT/zen/CTTAGCGAAAGGAACGA/3IABkFQ/-3’ (SEQ ID NO:58). El tamaño de este producto de amplificación de gen objetivo fue de 89 pb. Las reacciones rutinariamente usaron 2 µL de las preparaciones de ADN digerido. La composición de reacción por muestra fue: cebador directo de referencia (10 pM), 1 µL; cebador reverso de referencia (10 pM), 1 µL; sonda de gen de referencia (10 pM), 0,5 µL; cebador directo de gen objetivo (10 pM), 1 µL; cebador reverso de gen objetivo (10 pM), 1 µL; sonda de gen objetivo (10 pM), 0,5 µL; mezcla de reactivos para ddPCR, 12,5 µL; agua 5,5 µL en un volumen total de 25 µL.

Luego se colocaron las mezclas en un generador de gotas QX100, que particionó cada muestra en gotas de tamaño de 20000 nanolitros. Esto se hizo en cartuchos de 8 pocillos hasta procesar todas las muestras y se transfirieron a una placa de PCR de 96 pocillos. Luego se selló esta placa con una lámina perforable usando una maquina selladora de placas. Luego se trataron las muestras bajo las siguientes condiciones de reacción: 95°C, 10 min, con rampa de 2,5°C/s; luego 39 ciclos de 94°C, 30 s con rampa de 2,5°C/s; 61°C, 1 min, con rampa de 2,5°C/s; 98°C, 10 min, seguido por enfriamiento a 12°C. Luego de las reacciones de amplificación del ADN en las gotas, se colocó la placa en un lector de gotas QX100 que analizó cada gota en forma individual usando un sistema de detección de dos colores (configurado para detectar FAM o Hex). Los datos de la PCR digital en gotas se vieron como un gráfico 1-D con cada gota de una muestra graficada en el gráfico de intensidad de fluorescencia, o un gráfico de 2-D en donde se graficó la fluorescencia (FAM) contra la fluorescencia (Hex) para cada gota. El programa midió el número de gotas positivas y negativas para cada fluoróforo (FAM o Hex) en cada muestra. Luego el programa ajustó la fracción de gotas positivas a un algoritmo de Poisson para determinar la concentración de la molécula de ADN blanco en unidades de copias/µL de muestra. La variación en el número de copias se calculó usando la fórmula: CNV= (A/B)* Nb, en

donde A= concentración de gen blanco, B= concentración de gen de referencia, y Nb = 4, el número de copias del gen de referencia en el genoma.

Evaluación de viabilidad del polen

Se disolvió diacetato de fluoresceína (FDA) en acetona a 2 mg/ml para proveer una solución madre. Se prepararon diluciones de FDA justo antes de su uso mediante el agregado de gotas de la solución madre de FDA a 2 ml de una solución de sacarosa (0,5 M) hasta alcanzar la saturación indicado pro la aparición de una nubosidad persistente.

Se disolvió ioduro de propidio (PI) en agua destilada estéril a 1 mg/ml para proveer una solución madre. Justo antes de su uso, se agregaron 100 µL de la solución madre a 10ml de agua destilada estéril para armar una solución de trabajo. Para verificar la proporción de polen viable y no viable, se mezclaron las soluciones madres de PI y FDA en una proporción 2:3.

Se crecieron plantas transgénicas y de tipo salvaje de canola y mostaza bajo condiciones estándar en un invernadero a 22±2°C con un fotoperiodo de 16 hr por día. Los brotes de flores maduras que estaban listos para abrir al día siguiente se marcaron y recolectaron a la mañana siguiente entre 9 y las 10 am. Se tiñó el polen de las flores abiertas con la mezcla de FDA/PI y se visualizó usando un microscopio de fluorescencia Leica MZFLIII. Se usaron GFP-2, un filtro de emisión de paso largo a 510 nm (transmitiendo luz roja y verde) con un filtro de excitación a 480/40 nm para detectar polen viable y no viable. El polen no viable que tomó la tinción de PI apareció rojo bajo el microscopio de fluorescencia mientras que el polen viable apareció verde brillante cuando se tiñó con PI y FDA.

Ejemplo 2. Expresión estable de vías de DHA transgénicas en semillas de *Arabidopsis thaliana*

Construcción de vector binario

Los vectores binarios pJP3416-GA7 (también denominado en la presente como "GA7" descrito en WO 2013/185184) y pJP3404 contuvieron cada uno siete genes heterólogos para la biosíntesis de ácidos grasos, que codifican para 5 desaturasas y 2 elongasas, y un marcador de selección de plantas entre las repeticiones de borde izquierdo y derecho del ADN-T presente en cada vector (Figuras 2 y 3). La SEQ ID NO:1 provee la secuencia de nucleótidos de la región de ADN-T de pJP3416-GA7 de las secuencias borde derecha e izquierda. Ambas construcciones genéticas contuvieron genes optimizados para codines de plantas que codifican para una Δ12-desaturasa de *Lachancea kluyveri* (comprendiendo los nucleótidos 14143-16648 de la SEQ ID NO:1), una ω3-desaturasa de *Pichia pastoris* (comprendiendo los nucleótidos 7654-10156 de la SEQ ID NO:1), una Δ6-desaturasa de *Micromonas pusilla* (comprendiendo los nucleótidos 226-2309 de la SEQ ID NO:1), Δ5- y Δ4-desaturasas de *Pavlova salina* (comprendiendo los nucleótidos 4524-6485 y 10157-14142 de la SEQ ID NO:1, respectivamente) y Δ6- y Δ5-elongasas de *Pyramimonas cordata* (comprendiendo los nucleótidos 2310-4523 y 17825-19967 de la SEQ ID NO:1, respectivamente).

Las siete regiones codificantes de las construcciones estuvieron cada una bajo el control de un promotor específico de semilla – se usaron tres promotores diferentes, o sea el promotor truncado de napina de *Brassica napus* (pBnFP1), el promotor de FAE1 de *Arabidopsis thaliana* (pAtFAE1) y el promotor de conlinina 1 de *Linum usitatissimum* (pLuCnl1). Los siete genes de biosíntesis de ácidos grasos codificaron juntos para una vía completa de síntesis de DHA que se diseñó pata convertir $18:1^{\Delta 9}$ (ácido oleico) a $22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (DHA). Ambos vectores binarios contuvieron una región codificante de marcador de selección de plantas BAR ligada en forma operable a un promotor 35S de Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) con región potenciadora duplicada y el terminador de transcripción y región de poliadenilación *nos*3' de *A.*

tumefaciens. El marcador de selección de plantas se situó adyacente al borde izquierdo de la región del ADN-T, por lo tanto localizado en forma distal al ADN-T con respecto a la orientación de la transferencia de ADN-T a las células vegetales. Esto aumentó la probabilidad de que la transferencia parcial del ADN-T, que sería probable que no incluya al gen marcador de selección, no se seleccione. Cada uno de pJP3416-GA7 y pJP3404 contuvo un origen de replicación RiA4 de *Agrobacterium rhizogenes* (Hamilton, 1997).

La construcción GA7 también incluyó dos secuencias de regiones de unión a matriz Rb7 de *Nicotiana tabacum* (MAR), como se describe en Hall y col. (1991). Las secuencias MAR, a veces llamadas regiones de anclado al núcleo, se sabe que se unen específicamente a la matriz nuclear *in vitro* y que pueden mediar la unión de la cromatina a la matriz nuclear *in vivo*. Las MAR se cree que funcionan reduciendo el silenciamiento de los transgenes. En pJP3416-GA7, las MAR también se insertaron y posicionaron dentro de la región de ADN-T con el objetivo de actuar como espaciadores de ADN para aislar los casetes de expresión de transgenes. El vector pJP3416, antes de la inserción de la región GA7, contenía solo el casete del marcador de selección de plantas entre los bordes.

Transformación de *A. thaliana* y análisis de composición de ácidos grasos

Los vectores quiméricos se introdujeron en *A. tumefaciens* de cepa AGL1 y se usaron células de los cultivos de las *Agrobacterium* transformadas para tratar a plantas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia y un mutante *fad2*) usando el método de inmersión floral para su transformación (Clough y Bent, 1998). Después de la maduración, se cosecharen las semillas T_1 de las plantas tratadas y se colocaron en placas de MS conteniendo PPT para la selección de plantas conteniendo el gen marcador de selección BAR. Las plántulas supervivientes sanas T_1 se transfirieron a suelo. Después de crecer las plantas hasta madurez y permitiendo la autofertilización, se

cosecharon semillas T_2 de estas plantas y se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos de semilla por análisis por GC como se describe en el Ejemplo 1.

La construcción pJP3416-GA7 resultó en la producción de niveles de DHA levemente mayores, como porcentaje del contenido total de ácidos grasos, en promedio, en comparación con la construcción pJP3404. Las eficacias de conversión para cada paso enzimático en la producción de DHA a partir de ácido oleico se calcularon como (% de productos x 100)/(% de sustrato remanente + % de productos), expresado de esa forma como un porcentaje.

El nivel de DHA mayor observado producido en las líneas transformadas T_2 pJP3416-GA7 fue de 6,2%, además con 0,5% de EPA y 0,2% de DPA (línea #14). Estas semillas T_2 aún eran segregantes para el transgen o sea aún no eran uniformemente homocigotas. El nivel de ácidos grasos ω3 producidos como resultado de los transgenes en estas semillas (nuevos ácidos grasos ω3 totales, excluyendo el nivel de ALA que se produjo endógenamente debido al fondo genético Columbia) fue de 10,7% mientras que el nivel de ácidos grasos ω6 (nuevos ácidos grasos ω6 totales pero excluyendo a $18:2^{\Delta 9,12}$) fue de 1,5%. Esto representa una proporción extremadamente favorable de nuevos ácidos grasos ω3: nuevos ácidos grasos ω6, a saber, 7,3:1.

Las semillas T_2 de las líneas transformadas seleccionadas con pJP3416-GA7, o sea las líneas designadas como 7, 10, 14, 22 y 34 sobre fondo genético Columbia y para líneas designadas como 18, 21 y 25 en el fondo genético de *fad2* mutante, se colocaron en medio MS con PPT para la selección de plántulas transgénicas *in vitro*. Se transfirieron a suelo veinte plántulas resistentes a PPT para cada línea y se crecieron hasta madurez después de la autofertilización. Estas plantas tenían alta probabilidad de ser homocigotas para el gen marcador de selección, y por lo tanto para por lo menos una inserción de ADN-T en el genoma de las plantas. Se

cosecharon semillas T_3 de estas plantas y se analizaron para composición de ácidos grasos en su aceite de semilla por GC. Este análisis reveló que la construcción pJP3416-GA7 generó mayores niveles del ω3 LC-PUFA DHA en semillas T_3 de las plantas homocigotas que en las semillas segregantes T_2. Se observó hasta aproximadamente un 13,9% de DHA en la línea T_3 transformada con pJP3416-GA7 designada como 22.2 sobre fondo genético Columbia, mayor de aproximadamente 5,5% en la semilla hemicigota T_2, con un nivel de suma de aproximadamente 24,3% de nuevos ácidos grasos ω3 como porcentaje de los ácidos grasos totales en el contenido de lípidos de semilla. Los nuevos ácidos grasos ω6 estuvieron a un nivel de 1,1% de los ácidos grasos totales, lo que representa una proporción muy favorable de nuevos ácidos grasos ω3: nuevos ácidos grasos ω6, a saber de aproximadamente 22:1. De forma similar, los transformantes sobre el fondo genético *fad2* rindieron 20,6% como la suma de nuevos ácidos grasos ω3, incluyendo un 11,5% de DHA, como porcentaje de los ácidos grasos totales en el contenido de lípidos de semilla.

Las eficacias enzimáticas de conversión para cada paso enzimático en la vía de producción de DHA a partir de ácido oleico se muestran en la Tabla 4 para las semillas T_3 con los mayores niveles de DHA. La eficacia de conversión de Δ12-desaturasa en semillas de línea 22.2 fue de 81,6% y la eficacia de la ω3-desaturasa fue de 89,1%, ambos remarcablemente altos e indicando que estas enzimas fúngicas (levaduras) eran capaces de funcionar bien en semillas en desarrollo. Las actividades de las otras enzimas exógenas en la vía de DHA fueron similarmente altas para los sustratos ω3 con la Δ6-desaturasa actuando a 42,2% de eficacia, Δ6-elongasa a 76,8%, Δ5-desaturasa a 95,0%, Δ5-elongasa a 88,7% y Δ4-desaturasa a 93,3% de eficacia. La actividad de Δ6-desaturasa sobre el sustrato ω6 LA fue mucho menor, con la Δ6-desaturasa actuando a solo 0,7% de eficacia de conversión sobre LA. El GLA estuvo presente a un nivel de solo 0,4% y fue el único nuevo producto ω6 aparte del

20:2ω6 que se detectó en las semillas T_3 con el mayor contenido de DHA. Los datos compilados de los perfiles de lípido total de semilla de las semillas transgénicas independientes se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4. Eficacias de conversión de los pasos enzimáticos individuales para la producción de DHA a partir de ácido oleico, observadas en lípido total de semilla de semillas de Arabidopsis T3 transgénicas.

		GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2-25,10	GA7_FAD2-21.2	GA7_FAD2-18,14	T_4 Col_22.2 (media)	T_4 Col_22.2 mejor línea
	d12-des	75,4%	73,1%	75,7%	81,6%	73,4%	66,6%	78,5%	63,1%	67,6%	82,7%
	d15-des	85,3%	84,4%	86,2%	89,1%	70,2%	87,5%	82,2%	87,6%	81,0%	90,9%
Omega-6	**d6-des**	0,3%	0,3%	0,3%	0,7%	0,3%	0,6%	1,0%	0,2%	1,3%	0,7%
	(d9-elo)	1,7%	1,7%	1,2%	1,2%	2,6%	1,1%	2,0%	1,3%	1,6%	1,5%
	d6-elo										
	d5-des										
	d5-elo										
	d4-des										

Omega-3	**d6-des**	30,7%	29,3%	28,2%	42,2%	30,2%	38,5%	40,0%	29,2%	41,0%	45,7%
	(d9-elo)	2,7%	2,7%	2,3%	2,4%	3,0%	2,3%	2,7%	2,9%	2,8%	3,1%
	d6-elo	79,0%	81,1%	79,0%	76,8%	70,9%	79,2%	73,2%	79,1%	77,5%	77,7%
	d5-des	94,0%	94,6%	94,5%	95,0%	97,9%	87,8%	93,3%	91,1%	95,0%	95,8%
	d5-elo	91,9%	91,7%	93,6%	88,7%	89,5%	89,9%	92,2%	91,6%	90,8%	90,2%
	d4-des	93,2%	93,7%	94,4%	93,3%	93,7%	92,5%	95,0%	93,9%	92,2%	90,9%

Tabla 5. Datos compilados de perfiles de lípido total de semilla de semilla transgénica independiente.

Parámetro	GA7-Col_7.2	GA7-Col_34.2	GA7-Col_10.13	GA7-Col_22.2	GA7-Col_14.19	GA7-FAD2-25,10	GA7-FAD2-21.2	GA7-FAD2-18,14	T_4 Col_22.2 (media±SD)	T_4 Col_22.2 mejor línea
w3 totales (% de FA totales)	50,0	48,9	51,6	55,8	38,6	47,1	49,4	44,8	54,0	55,9
w6 totales (% de FA totales)	8,7	9,1	8,3	6,7	16,3	6,7	10,7	6,3	6,7	5,7
proporción w3 / w6	5,75	5,37	6,22	8,33	2,37	7,03	4,62	7,11	8,06	9,81
proporción w6 / w3	0,17	0,19	0,16	0,12	0,42	0,14	0,22	0,14	0,12	0,10
nuevos w3 totales (% de FA totales)	16,3	15,2	15,5	24,3	12,5	18,8	20,5	14,0	23,0	26,4
nuevos w6 totales (% de FA totales)	1,2	1,2	0,9	1,1	1,5	0,9	1,8	0,7	1,4	1,4
proporción de nuevos w3 / w6	13,58	12,67	17,22	22,09	8,33	20,89	11,39	20,00	16,43	18,86
proporción de nuevos w6	0,07	0,08	0,06	0,05	0,12	0,05	0,09	0,05	0,06	0,05

/ w3										
Eficacia de OA a EPA	14,1%	13,3%	13,4%	21,8%	10,2%	15,0%	16,8%	11,2%	20,4%	24,5%
Eficacia de OA a DHA	12,0%	11,4%	11,8%	18,0%	8,6%	12,6%	14,8%	9,6%	17,1%	20,1%
Eficacia de LA a EPA	18,9%	18,4%	17,9%	26,9%	14,2%	22,9%	21,8%	18,0%	26,2%	29,9%
Eficacia de LA a DHA	16,2%	15,9%	15,7%	22,2%	12,0%	19,1%	19,1%	15,5%	21,9%	24,5%
Eficacia de ALA a EPA	22,2%	21,9%	20,7%	30,1%	20,2%	26,1%	26,5%	20,5%	29,4%	32,9%
Eficacia de ALA a DHA	19,0%	18,8%	18,2%	24,9%	17,1%	21,9%	23,3%	17,6%	24,6%	27,0%
saturados totales	16,0	14,7	15,4	16,0	16,2	13,4	16,5	12,9	16,0	17,8
monoinsaturados totales	23,7	25,8	23,4	19,2	26,5	30,9	21,3	34,3	21,1	18,1
poliinsaturados totales	58,7	58,0	59,9	62,5	54,9	53,8	60,1	51,1	60,7	61,6
total C20	19	19,8	16,8	15,9	19,1	21,5	18,2	23,3	18	16,6
total C22	11,4	11	10,8	15,5	8,6	12,1	13,2	9,9	15,4	17,5
Proporción C20/C22	1,67	1,80	1,56	1,03	2,22	1,78	1,38	2,35	1,17	0,95

173

Se sembraron semillas T_3 de pJP3416-GA7 línea 22.2 en el fondo genético Columbia, que fueron la progenie de la línea T_2 22, directamente en suelo y se analizó por GC la composición de ácidos grasos de semillas maduras de las plantas T_3 resultantes. El nivel promedio de DHA de estas semillas fue de 13,3% $\pm$ 1,6 (n=10) como porcentaje de ácidos grasos totales en el lípido de semilla. La línea con el mayor nivel de DHA contuvo 15,1% de DHA en los ácidos grasos totales del lípido de semilla. Las eficacias enzimáticas de conversión se muestran en la Tabla 4 para cada paso de la producción de DHA a partir de ácido oleico.

Se llevó a cabo un análisis por hibridización por transferencia Southern. Los resultados mostraron que las líneas con alta acumulación de DHA tenias una copia individual o bien una copia doble del ADN-T para la construcción pJP3416-GA7 con la excepción de la línea transgénica Columbia#22, que tuvo tres inserciones de ADN-T en el genoma de la planta de *Arabidopsis*. También se analizaron las semillas de la generación T5 y se halló hasta un 13,6% de DHA en los lípidos totales de semilla. Se halló que la construcción GA7 es estable a lo largo de múltiples generaciones en términos de capacidad de producción de DHA.

Determinación de contenido de aceite en líneas transgénicas para DHA de *A. thaliana*

Se determinó el contenido de aceite de semillas transgénicas de *A. thaliana* con diversos niveles de DHA por GC como se describe en el Ejemplo 1. Los datos de muestran en la Figura 4, que grafica el contenido de aceite (% de aceite en peso of semilla) contra el contenido de DHA (como porcentaje de los ácidos grasos totales). Se observó hasta 26,5 mg de DHA por gramo de semilla (Tabla 6). Se halló que el contenido de aceite de las semillas transgénicas de *Arabidopsis* se correlacionó negativamente con el contenido de DHA. La cantidad de DHA por peso de semilla fue mayor en las semillas transformadas con un nivel de DHA de aproximadamente 9% en

relación a las semillas con aproximadamente 14% de DHA. Los datos subsiguientes de especies distintas a *Arabidopsis* han mostrado que esta correlación negativa es más pronunciada en *Arabidopsis* que en especies de *C. sativa* o *Brassica* (Ejemplo 8 más adelante).

Tabla 6. Proporción y cantidad de DHA en semillas de *Arabidopsis* transformadas con GA7.

	contenido de DHA (% de TFA)	Contenido de aceite (% de aceite por g de semillas)	contenido de DHA por peso (mg/g de semilla)
GA7/col 22.2-1	14,2	14,89	20,2
GA7/col 22.2-2	14.3	15,02	20,5
GA7/col 22.2-3	14,0	15,92	21,2
GA7/col 10.15-1	8,7	30,23	25,06
GA7/col 10.15-2	8.6	31,25	25,77
GA7/col 10.15-3	8,8	31,70	26.49

Ejemplo 3. Expresión estable de una vía transgénica de DHA en semillas de *Camelina sativa*

Se introdujo el vector binario pJP3416-GA7 como se describió previamente en *A. tumefaciens* de cepa AGL1 y se usaron las células de un cultivo de las *Agrobacterium* transformadas para tratar a plantas de *C. sativa* en floración usando un método de inmersión floral para su transformación (Lu y Kang, 2008). Después del crecimiento y maduración de las plantas, se cosecharon las semillas T_1 de las plantas tratadas, se sembraron en suelo y las plantas resultantes se trataron por atomizado con el herbicida BASTA para detectar plantas que fuesen transgénicas, y que expresen, el gen marcador de selección *bar* presente en el ADN-T de pJP3416-GA7.

Las plantas T_1 que fueron tolerantes al herbicida se crecieron hasta madurez después de dejarlas autofertilizarse, y se cosecharon los semillas T_2 resultantes. Se obtuvieron cinco plantas transgénicas, solo tres de las cuales contuvieron el ADN-T completo.

Se extrajeron los lípidos de un agrupamiento de aproximadamente veinte semillas de cada una de las tres plantas con contuvieron el ADN-T completo. Dos de las muestras agrupadas contuvieron niveles muy bajos, escasamente detectables de DHA, pero el tercer agrupamiento contuvo aproximadamente 4,7% de DHA. Por lo tanto, se extrajeron los lípidos de 10 semillas T_2 individuales de esta planta y se analizó la composición de ácidos grasos por GC. Los datos de la composición de ácidos grasos de las semillas individuales para esta línea transformada también se muestran en la Tabla 7. Los datos compilados de perfiles de lípido total de semilla (Tabla 7) se muestran en la Tabla 8.

El DHA en seis de las 10 semillas individuales. Las otras cuatro semillas no tuvieron DHA y se presumió que eran segregantes nulos que no tenían el ADN-T, en base a la hemicigocidad de la inserción del ADN-T en la planta parental. Los lípidos extraídos de las semillas individuales con el mayor nivel de DHA tuvieron 9,0% de DHA mientras que la suma de los porcentajes para EPA, DPA y DHA fue de 11,4%.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de semilla de semillas transgénicas T_2 de *Camelina sativa* transformadas con el ADN-T de pJP3416-GA7. La composición de ácidos grasos se muestra para un lote de semillas agrupadas (FD5.46) y oara 10 semillas individuales clasificadas (izquierda a derecha) de mayor a menor contenido de DHA.

Ácido graso	**FD5,46 agrupadas**	**# 2**	**# 4**	**# 8**	**# 7**	**# 9**	**# 1**	**# 3**	**# 5**	**# 6**	**# 10**
14:0	0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
16:0	11,6	12,1	12,3	12,1	13,2	12,3	12,8	11,9	11,4	11,5	11,7
16:1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2
16:3	0,3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	3,7	3,3	3,2	3,2	3,0	3,1	3,2	3,3	3,1	3,2	3,2
18:1	10,8	8,0	8,0	8,6	8,5	9,4	11,0	10,2	8,3	9,4	8,6
18:1d11	1,7	1,3	1,4	1,4	1,7	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3
18:2	24,7	18,2	19,5	19,2	18,5	20,1	23,8	32,2	30,3	29,8	31,6
18:3ω3	27,4	26,7	26,6	27,3	28,9	28,2	27,4	28,3	29,2	29,5	28,2
18:3ω6	0,2	1,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,5	0,0	0,5	0,4	0,6
20:0	1,6	1,4	1,3	1,4	1,2	1,4	1,4	1,8	2,1	1,9	2,0
18:4ω3	2,2	6,8	6,4	5,7	7,2	5,7	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0

20:1d11	5,3	4,4	4,6	4,8	3,3	4,1	3,5	4,4	6,1	5,8	5,5
20:1iso	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
20:2ω6	0,8	0,8	0,9	0,8	0,6	0,8	0,7	1,3	1,5	1,4	1,4
20:3ω3	0,6	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
22:0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
20:4ω3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	1,1	1,1	1,2	1,1	0,5	0,9	0,8	1,6	2,2	1,9	2,0
20:5ω3	0,7	1,3	1,6	1,5	1,6	1,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,1
22:2ω6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2
22:4ω6+22:3ω3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,6	0,5	0,5
24:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4
24:1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,0	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
22:5ω3	0,3	1,1	1,2	1,1	1,1	0,9	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6ω3	**4,7**	**9,0**	**8,5**	**8,3**	**8,3**	**7,1**	**4,9**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**

Tabla 8. Datos compilados de perfiles de lípido total de semilla de semilla transgénica como se muestra en la Tabla 7.

Los cálculos no incluyen los 'ácidos grasos minoritarios' de la Tabla 7.

Parámetro	**FD5,46 agrupados**	**# 2**	**# 4**	**# 8**	**# 7**	**# 9**	**# 1**	**# 3**	**# 5**	**# 6**	**# 10**

w3 totales (% de FA totales)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
w6 totales (% de FA totales)	25,8	20,4	20,7	20,3	19,5	21,1	25	33,7	32,6	31,8	33,8
proporción w3 / w6	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
proporción w6 / w3	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
nuevos w3 totales (% de FA totales)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1
nuevos w6 totales (% de FA totales)	1,1	2,2	1,2	1,1	1	1	1,2	1,5	2,3	2	2,2
proporción de nuevos w3 / w6	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
proporción de nuevos w6 / w3	0,14	0,12	0,07	0,07	0,05	0,07	0,10				22,00
Eficacia de OA a EPA	8,2%	15,6%	15,5%	15,1%	15,1%	12,8%	10,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Eficacia de OA a DHA	6,7%	12,3%	11,6%	11,5%	11,4%	10,0%	7,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Eficacia de LA a EPA	9,2%	17,2%	17,1%	16,7%	16,2%	13,9%	11,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%
Eficacia de LA a DHA	7,6%	13,6%	12,9%	12,7%	12,3%	10,9%	7,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Eficacia de ALA a EPA	15,8%	24,8%	24,9%	24,2%	22,8%	20,6%	18,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
Eficacia de ALA a DHA	13,0%	19,6%	18,7%	18,4%	17,2%	16,1%	12,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
saturados totales	17,6	17,8	17,8	17,6	18	17,8	18,1	18,2	17,7	17,8	18,1
monoinsaturados totales	19,8	15,5	16	16,6	14,3	16,6	16,8	18,7	19,3	19,6	18,6
poliinsaturados totales	62,5	66,6	66,4	65,6	67,7	65,6	65,1	63	63,1	62,5	63,2
total C20	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
total C22	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	0,9	0,7	0,7
Proporción C20/C22	1,78	0,90	0,98	1,02	0,86	1,07	1,49	14,33	12,22	14,71	14,43

Se obtuvieron semillas homocigotas de esta línea en la generación T4. Se produjo hasta 10,3% de DHA en el evento FD5-46-18-110 con un promedio de 7,3% de DHA observado a través de toda la generación T4. Se estableció una generación subsiguiente (T5) para probar nuevamente la estabilidad de la producción PUFA a lo largo de múltiples generaciones, en particular para DHA. Los niveles máximos de DHA observados se hallaron como estables en la quinta generación, incluso cuando el contenido de DHA de las semillas agrupadas o se había estabilizado hasta la generación T_4 debido a la presencia de múltiples loci transgénicos. También se germinaron lotes de semillas T_5 en medio MS *in vitro* junto con semillas parentales de *C. sativa* sin una diferencia obvia en la eficacia o en la velocidad de germinación observada. Las generaciones subsiguientes de la línea transgénica (generaciones T6, T7 etc) no mostraron ninguna reducción del nivel de DHA de las semilla. Las plantas transgénicas eran masculinos y femeninos completamente fértiles, y el polen mostró aproximadamente 100% de viabilidad para las plantas de tipo salvaje. El análisis del contenido de aceite de las semillas con diferentes niveles de DHA no identificó ninguna correlación entre el nivel de DHA y el contenido de aceite, contrariamente a la correlación vista en *Arabidopsis thaliana*.

En varias líneas transgénicas adicionales, el contenido de DHA de las semillas individuales de eventos independientes excedió el 12%. La proporción transgénico: nulo de estas líneas se halló entre aproximadamente 3:1 y 15:1. El análisis de los perfiles de ácidos grasos representativos de las muestras con mayor contenido de DHA de cada construcción halló solo entre 1,2 y 1,4% de GLA sin ningún otro nuevo PUFA ω6 detectado. Por el contrario, se hallaron nuevos PUFA ω3 (SDA) LC-PUFA ω3 (ETA, EPA, DPA, DHA) que se acumularon en un 18,5% con un nivel de DHA de 9,6% del contenido total de ácidos grasos. La Δ6-desaturación fue de 32% y el EPA fue de 0,8% del contenido total de ácidos grasos. La eficacia de la Δ5-elongación fue

de 93% y la eficacia de la Δ6-elongación fue de 60%. Se detectó DHA en la fracción polar de los lípidos de semilla de las líneas GA7.

Fue de destacar que las proporciones de segregación observadas (entre ~3:1 y ~15:1) indicaron que se requerían uno o, como máximo, dos loci transgénicos para producir niveles de DHA en *C. sativa* similares al aceite de pescado. Esto tuvo implicancias importantes por la facilidad con que se pueden aparear los rasgos transgénicos así como también por la estabilidad del transgen.

Se plantaron semillas homocigotas en varios invernaderos para generar un total de más de 600 plantas individuales. Se extrajo el aceite de semilla usando una variedad de métodos incluyendo extracciones de soxhlet, con acetona y hexano.

Se llevó a cabo un análisis de regioespecificidad por ^{13}C RMN sobre el aceite de semilla de las *C. sativa* transgénicas para determinar la distribución posicional de los LC-PUFA ω3 en los TAG. Se seleccionó un evento con aproximadamente igual cantidad de EPA y DHA para maximizar la respuesta para estos ácidos grasos y se halló una la proporción de *sn*-1,3 a *sn-2* de 0,75:0,25 para EPA y 0,86:0,14 para DHA en donde una distribución sin sesgo sería de 0,66:0,33. O sea que, el 75% del EPA y el 86% del DHA se localizaron en la posición *sn*-1,3 de los TAG. Esto indicó que ambos ácidos grasos se localizaban preferentemente en las posiciones *sn*-1,3 positions en los TAG de *C. sativa* a pesar de que la preferencia del EPA era más débil que la del DHA. El hallazgo de que el DHA se hallaba predominantemente en la posición *sn*-1,3 fue similar los resultados previamente descritos en semillas de *A. thaliana* (Petrie y col., 2012).

Debido a que se obtuvo solo un número pequeño de líneas transgénicas independientes en el experimento de transformación que se describió previamente, se llevaron a cabo transformaciones adicionales de *C. sativa* usando la construcción GA7-modB (Ejemplo 4). Se obtuvieron más transformantes y se identificaron las líneas

homocigotas que producen más de 20,1% de DHA.

Ejemplo 4. Modificaciones a los ADN-T que codifican para las vías de DHA en semillas de plantas

Con el objetivo de mejorar el nivel de producción de DHA en *B. napus* por arriba de los niveles descritos en WO2013/185184, se construyeron los vectores binarios pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE y pJP3416-GA7-modF como se describe en WO2013/185184 y se probaron en plantas transgénicas. Estos vectores binarios fueron variantes de la construcción pJP3416-GA7 que se describe en el Ejemplo 2 y se diseñaron para incrementar en forma adicional la síntesis de DHA en semillas de plantas, en particular para mejorar las funciones de Δ6-desaturasa y Δ6-elongasa. Se había observado que el SDA se acumula en algunas semillas transformadas con la construcción GA7 debido a la relativamente baja eficacia de elongación en Δ6 en comparación con la Δ5-elongasa, por lo tanto entre otras modificaciones, se intercambiaron las posiciones de los dos genes de elongasa en el ADN-T.

Se intercambiaron las posiciones de las dos secuencias codificantes de elongasa en pJP3416-GA7 en el ADN-T para dar pJP3416-GA7-modA clonando primero un nuevo casete de Δ6-elongasa de *P. cordata* entre los sitios *Sbf*I de pJP3416-GA7 para reemplazar al casete de Δ5-elongasa de *P. cordata*. Esta construcción se modificó además por intercambio del promotor FP1 que dirige a la Δ6-desaturasa *M. pusilla* por un promotor de conlinina Cnl2 (pLuCnl2) para dar el pJP3416-GA7-modB. Se hizo esta modificación como un intento por incrementar la expresión de Δ6-desaturasa y así su eficacia enzimática. Se pensó que el promotor Cnl2 podría dar una mayor expresión del transgen en *B. napus* en comparación con el promotor truncado de napina.

Se generaron ocho eventos transgénicos de *A. thaliana* con pJP3416-GA7-

modB y 15 eventos transgénicos de *A. thaliana* con pJP3416-GA7-modG. Se observó entre 3,4% y 7,2% de DHA en las semillas agrupadas de pJP3416-GA7-modB y entre 0,6 y 4,1% de DHA en las semillas T2 agrupadas de pJP3416-GA7-modG. Se sembraron varios de los mejores eventos con pJP3416-GA7-modB en medio de selección y se pasaron las plántulas supervivientes a la siguiente generación. Se están analizando las semillas para contenido de DHA. Debido a que las semillas T1 agrupadas representaron poblaciones que fueron segregantes para los transgenes e incluyeron a todos los segregantes nulos, se espera que las semillas homocigotas de las plantas de la progenie tengan niveles incrementados de DHA, hasta 30% del contenido total de ácidos grasos en el aceite de semilla. Las otras construcciones modificadas se usaron para transformar a *A. thaliana*. A pesar de que se obtuvo solo un pequeño número de líneas transformadas, ninguna rindió niveles de DHA mayores que la construcción modB.

También se usó a la construcción pJP3416-GA7-modB para generar plantas transformadas de *B. napus* de cultivar Oscar y de una serie de líneas de cría designadas como NX002, NX003, NX005, NX050, NX052 y NX054. Se obtuvo un total de 1558 plantas transformadas incluyendo 77 plantas transformadas independientes (T0) para la transformación Oscar, y 1480 plantas independientes para las líneas de cría incluyendo 189 para NX005 que es una línea que tiene un alto contenido de ácido oleico en su aceite de semilla gracias a mutaciones en los genes de FAD2. Las otras líneas de cría tuvieron mayores niveles de LA y ALA. La plantas transgénicas que exhibieron más de 4 copias del ADN-T determinado por un método de PCR digital (Ejemplo 1) se descartaron; se descartaron aproximadamente 25% de plantas T0 mediante este criterio. Aproximadamente el 53% de las plantas transgénicas T0 tuvo 1 o 2 copias del ADN-T determinado por el método de PCR digital, el 12% tuvo aproximadamente 3 copias y el 24% tuvo 4 o más copias. Se cosecharon las semillas

(semillas T1) de aproximadamente 450 de las líneas transgénicas después de la autofertilización, lo que se consiguió poniendo bolsas a las plantas durante la floración para evitar los auto cruces. Se cosechan las semillas T1 a partir del resto de las plantas transgénicas cuando están maduras. Aproximadamente entre el 1 y 2% de las líneas de plantas fueron masculinas o femeninas estériles y no produjeron semillas viables, estas plantas T0 se descartaron.

Se probaron agrupaciones de semillas (20 semillas T1 en cada agrupamiento) para niveles de DHA en el aceite de las semillas agrupadas, y se seleccionaron las líneas que mostraron los mayores niveles. En particular, se seleccionaron las líneas con un contenido de DHA de por lo menos 2% del contenido total de ácidos grasos en las semillas T1 agrupadas. Se seleccionó aproximadamente 15% de las líneas transgénicas de esta forma; el otro 85% se descartó. Algunas de estas se designaron como líneas CT132-5 (en cultivar Oscar), CT133-15, -24, -63, -77, -103, -129 y -130 (in NX005). Las líneas seleccionadas de NX050 incluyeron a CT136-4, -8, -12, -17, -19, -25, -27, -49 y -51. Se embebieron veinte semillas de las líneas seleccionadas incluyendo a CT132.5 y 11 semillas de CT133.15 y, después de dos días, se extrajo el aceite de un medio cotiledón de cada una de las semillas individuales. La otra mitad de los cotiledones con ejes embriónicos se conservó y se cultivó en medio para mantener las líneas de progenie específica. Se determinó la composición de ácidos grasos en el aceite; los datos se muestran en la Tabla 9 para CT132.5. El nivel de DHA en 10 de las 20 semillas analizadas estuvo en el rango entre 7 y 20% del contenido total de ácidos grasos según la determinación por análisis de GC. Otras semillas tuvieron menos de 7% de DHA y pueden haber contenido una copia parcial (incompleta) del ADN-T de pJP3416-GA7-modB. La línea transgénica pareció contener múltiples inserciones transgénicas que estuvieron genéticamente no ligadas. Las semillas de la línea transgénica CT133.15 exhibieron niveles de DHA en el rango entre 0 y 5%. Las

semillas sin DHA probablemente fueron segregantes nulos. Estos datos confirmaron que la construcción modB se desempeñó bien para la producción de DHA en semillas de canola.

Se probaron individualmente 20 o 40 semillas individuales (semillas T2) obtenidas de cada una de múltiples plantas T1, después de la autofertilización, a partir de las líneas transformadas seleccionadas para composición de ácidos grasos. Se identificaron las semillas con DHA a niveles mayores que 20% (Tabla 10). Dos muestras representativas, CT136-27-18-2 y CT136-27-18-19 tuvieron 21,2% y 22,7% de DHA, respectivamente. El contenido total de ácidos grasos ω3 en estas semillas fue de aproximadamente 60% como porcentaje del contenido total de ácidos grasos, y el contenido de ω6 fue menos de 10%. Se probaron otros grupos de 20 o 40 semillas T2 de cada una de las plantas T1 para composición de ácidos grasos. Los datos representativos para los niveles de DHA en el contenido total de ácidos grasos del aceite de semilla de las semillas T2 individuales se muestran en la Figura 10. Se identificaron las semillas que comprendían hasta 34,3% de DHA, por ejemplo en la semilla CT136-27-47-25 (Tabla 12). La composición de ácidos grasos para el aceite de semilla que se obtuvo de CT136-27-47-25 se muestra en la Tabla 12. La composición de ácidos grasos incluyó 34,3% de DHA junto con aproximadamente 1,5% de DPA, 0,6% de EPA y 0,5% de ETA. El nivel de SDA fue de aproximadamente 7,5%, de ALA aproximadamente 21,9% y de LA aproximadamente 6,9%. Los nuevos PUFA ω6 exhibieron 1,1% de GLA pero nada de LC-PUFA ω6-C20 o C22. Los ácidos grasos saturados totales fueron: 9,6%; los ácidos grasos monoinsaturados, 12,5%; los PUFA totales, 75,2%; los ω6-PUFA totales (incluyendo a LA), 7,2%; los ω3-PUFA totales, 66,9%; la proporción de ácidos grasos totales ω6:ω3, 9.3:1; nuevos ácidos grasos ω6: nuevos ω3, 37:1. Las eficacias de cada paso enzimático de ácido oleico a DHA fueron como sigue: Δ12-desaturasa, 90%; Δ15/ω3-desaturasa, 89%; Δ6-desaturasa, 67%;

Δ6-elongasa, 83%; Δ5-desaturasa, 99%; Δ5-elongasa, 98%; Δ4-desaturasa, 96%. La eficacia de conversión global de ácido oleico a DHA fue de aproximadamente 50%. Por lo tanto fue claro que las semillas que producen DHA en el rango entre 20,1 y 35% del contenido total de ácidos grasos del aceite de semilla pudieron identificarse y seleccionarse, incluyendo a las semillas con entre 20,1% y 30% de DHA o entre 30% y 35% de DHA en el contenido total de ácidos grasos.

El contenido de aceite en algunas semillas disminuyó de aproximadamente 44% en las semillas de tipo salvaje a aproximadamente entre 31 y 39% en algunas de las semillas que producen DHA, pero fue similar a los niveles de tipo salvaje en otras semillas que producen DHA.

Se cruzan varias líneas de plantas transformadas que producían DHA a niveles de por lo menos 10% en la semilla T2 y se autopoliniza la progenie F1 con el objetivo de producir una progenie F2 que es homocigota para múltiples inserciones de ADN-T. Se analiza el aceite de semilla de las semillas homocigotas y contiene hasta 30% o 35% del contenido total de ácidos grasos de aceite de semilla en la forma de DHA.

El TAG en el aceite que se obtuvo de CT136-27-18-2 y CT136-27-18-19 se analizó por ensayo de regioespecificidad por ^{13}C RMN para la distribución posicional del DHA en el esqueleto de glicerol de las moléculas de TAG. El DHA se unió preferentemente a la posición *sn*-1,3. Más de 70%, de hecho más de 90% del DHA estuvo en la posición *sn*-1,3.

En otras varias líneas transgénicas, el contenido de DHA de las semillas individuales de eventos independientes excedió el 12%. La proporción de transgénicas: nulas de estas líneas se halló en aproximadamente 3:1, lo que corresponde a un locus transgénico individual, o 15:1, lo que corresponde a dos loci transgénicos. El análisis de perfiles representativos de ácidos grasos de las muestras de cada construcción con los mayores niveles de DHA halló solo entre 1,2 y 1,4% de

GLA sin otros nuevos PUFA ω6 detectados. Por el contrario, loa nuevos PFA ω3 (SDA) y LC-PUFA ω3 (ETA, EPA, DPA, DHA) se acumularon a una suma de 25,8% para la construcción modF y 21,9% para la construcción modG en comparación con 18,5% para las semillas transformadas con GA7. Los niveles de DHA en el aceite de estas semillas fueron 9,6%, 12,4% y 11,5%, respectivamente. La Δ6-desaturación se halló como menor en las semillas transformadas con GA7 en comparación con las semillas transformadas con modF y modG (32% vs 47% y 43%) y esto resultó en una reducción del ALA en las semillas modF y modG en relación a las GA7. Otra diferencia importante fue la acumulación del EPA de las semillas modF (3,3% vs 0,8% en las otras dos semillas transgénicas) y esto se reflejó en una menor Δ5-elongación observada en las semillas modF (80%) en relación a las semillas GA7 y modG (93% y 94%). Hubo un leve incremento de Δ6-elongación en estas semillas (66% vs 60% y 61%) a pesar de que la cantidad de SDA se incrementó realmente debido a la Δ6-desaturación levemente más activa. se detectó DHA en la fracción polar de lípidos de semilla de las líneas GA7.

Se analizó la composición de ácidos grasos del lípido en las semillas T1 de 70 plantas transgénicas independientes de la línea de cría *B. napus* NX54 transformada con el ADN-T de la construcción modB. Se observó que una de estas plantas transgénicas produjo semillas con DPA pero sin DHA en el aceite de semilla. La semilla T1 de esta línea (CT-137-2) produjo aproximadamente 4% de DPA sin nada de DHA detectable en las semillas T1 agrupadas. Los inventores concluyeron que esto fue causado por la inactivación del gen de Δ4-desaturasa en ese ADN-T particular insertado, tal vez a través de una mutación espontanea. Se germinaron alrededor de 50 semillas T1 de esta línea transgénica y se analizó un cotiledón emergido de cada una para composición de ácidos grasos en el aceite remanente. Luego se crecieron las plántulas seleccionadas que exhibían más de 5% de DPA hasta madurez y se

cosecharon las semillas T2. Las composiciones de ácidos grasos de semillas agrupadas se muestran en la Tabla 11, se observó más de 7% de DPA en estas líneas.

Mientras que el foco de este experimento fue la demostración de producción de DHA en especies de cultivo de semillas aceiteras, las diferencias notabas previamente también fueron interesantes desde una perspectiva de diseño de construcción. Primero, el intercambio de las localizaciones de la región codificante de Δ6- y Δ5-elongasa en la construcción modF resultó en el cambio de perfil esperado con más EPA acumulado debido a una baja Δ5-elongación. Se observó un incremento concomitante de la Δ6-elongación pero esto no fue el resultado de los menores niveles de SDA. Esto fue debido a un incremento de Δ6-desaturación en la semilla transformada con modF, causado por el agregado de un casete de expresión extra de Δ6-desaturasa de *M. pusilla* así como también por el reemplazo del promotor truncado de napina (FP1) por un promotor más altamente activo de conlinina 2 de lino. El incremento algo inferior de Δ6-desaturación que se observa con la construcción modG fue causado por la capitalización del casete altamente expresado de Δ5-elongasa en GA7. El intercambio de las posiciones de las regiones codificantes de Δ6-desaturasa y Δ5-elongasa resultó en una mayor Δ6-desaturación. La actividad de Δ5-elongasa no se redujo en este caso debido al reemplazo del promotor FP1 por el promotor Cnl2.

Estos datos confirmaron que las construcciones modB, modF y modG se desempeñaron bien para a producción DHA en semillas de *Camelina*, como para *Arabidopsis* y canola.

Los inventores consideraron que, en general, las eficacias de las actividades enzimáticas limitantes de reacción en la vía de DHA pueden ser mayores en los transformantes de multicopias de ADN-T en comparación con los transformantes de ADN-T de copia única, o se pueden incrementar por la inserción en el ADN-T de

múltiples genes que codifican para la enzima que podría ser la limitante de la vía. La evidencia de la posible importancia de los transformantes de copias múltiples se vio en las semillas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción GA7 (Ejemplo 2), en donde el evento de mayor rendimiento de DHA tuvo tres ADN-T insertados en el genoma del huésped. Los múltiples genes pueden ser idénticos, o preferentemente son variantes diferentes que codifican para el mismo polipéptido, o están bajo el control de promotores diferentes que tienen patrones de expresión solapados. Por ejemplo, una mayor expresión puede conseguirme mediante la expresión de múltiples regiones codificantes de Δ6-desaturasa, incluso aunque se produzca la misma proteína. En pJP3416-GA7-modF y pJP3416-GA7-modC, por ejemplo, estuvieron presentes dos versiones de la Δ6-desaturasa de *M. pusilla* y se expresaron mediante promotores diferentes. Las secuencias codificantes tuvieron diferente uso de codones y por lo tanto diferentes secuencias de nucleótidos, para reducir el silenciamiento potencial o los efectos de cosupresión, pero resultando en la producción de la misma proteína.

Tabla 9. Perfiles de ácido graso of medios cotiledones de semillas transgénicas T1 de *B. napus* en germinación conteniendo la construcción modB. Se observó hasta 18,1% de DHA con numerosas muestras conteniendo más de 10% de DHA.

Semilla	14:0	16:0	16:1d3?	16:1	16:3	18:0	18:1	18:1d11	18:2	18:3n6	18:3n3	20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
1	0,1	4,2	0,1	0,1	0,2	1,8	29,9	2,5	9,9	0,1	38,4	0,5	0,8	1,0	0,0	0,1	2,1	0,3	2,8	0,3	0,1	0,2	0,2	0,5	3,9
2	0,1	4,7	0,1	0,1	0,2	4,0	23,0	2,3	7,4	0,3	29,3	1,0	4,3	1,1	0,0	0,1	1,9	0,4	6,9	1,0	0,0	0,3	0,1	1,7	9,5
3	0,1	3,7	0,2	0,1	0,2	1,8	55,1	1,9	4,7	0,2	15,2	0,8	1,8	1,4	0,0	0,1	0,3	0,5	11,3	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0
4	0,1	4,6	0,2	0,2	0,2	2,9	22,1	1,8	6,6	0,4	26,5	1,0	7,2	1,0	0,0	0,1	0,8	0,5	11,2	1,9	0,0	0,2	0,2	1,7	8,7
5	0,1	4,0	0,1	0,1	0,2	1,7	27,4	2,1	8,1	0,3	26,4	0,6	2,8	1,0	0,0	0,1	1,5	0,3	7,6	1,5	0,0	0,1	0,1	1,8	**12,2**
6	0,1	3,5	0,1	0,1	0,2	1,6	59,	2,0	4,3	0,1	18,	0,6	0,5	1,3	0,0	0,0	0,7	0,3	6,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0

							8				5													
7	0,1	6,0	0,3	0,3	0,3	1,7	16,6	2,6	23,9	1,0	23,2	0,6	5,4	0,8	0,0	0,2	0,6	0,4	2,6	1,1	0,0	0,3	0,3	1,7	9,9
8	0,1	4,9	0,1	0,1	0,2	2,7	12,9	1,4	11,7	0,3	34,3	0,9	5,0	0,9	0,0	0,2	2,4	0,5	4,1	1,3	0,0	0,2	0,2	1,8	**13,8**
9	0,1	3,9	0,1	0,1	0,1	2,4	41,6	1,7	21,5	0,0	23,4	0,7	0,0	1,2	0,0	0,1	2,2	0,4	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,0	0,0
10	0,1	3,7	0,2	0,1	0,1	2,1	30,9	1,7	19,2	0,4	23,6	0,7	2,1	1,1	0,0	0,1	1,5	0,4	3,6	0,6	0,0	0,2	0,1	0,7	6,9
11	0,1	5,7	0,4	0,3	0,2	3,8	41,2	2,4	26,7	2,1	7,2	1,3	0,3	1,2	0,0	0,2	0,3	0,8	4,8	0,0	0,0	0,6	0,3	0,0	0,0
12	0,1	4,6	0,0	0,1	0,2	2,4	25,5	1,7	16,1	0,3	28,9	0,8	3,9	1,1	0,0	0,1	1,9	0,4	3,9	0,6	0,0	0,2	0,0	1,1	6,2
13	0,1	4,3	0,1	0,1	0,1	4,2	19,4	1,6	9,2	0,1	45,5	1,0	0,2	1,1	0,0	0,1	5,2	0,4	2,6	0,3	0,2	0,2	0,1	0,4	3,4
14	0,1	6,3	0,2	0,2	0,2	4,0	10,5	2,3	8,4	0,3	31,1	1,3	3,9	0,8	0,0	0,1	2,3	0,6	4,6	1,8	0,1	0,3	0,2	2,5	**18,1**
15	0,1	5,1	0,1	0,2	0,2	3,3	16,	2,4	11,	0,3	28,	1,0	4,5	0,9	0,0	0,1	2,1	0,6	3,2	1,5	0,1	0,3	0,1	1,8	**15,**

							8		2		8													**1**
16	0,1	4,4	0,1	0,1	0,2	4,0	16,2	1,5	11,6	0,2	33,5	0,9	2,8	1,1	0,0	0,2	3,7	0,4	4,6	0,7	0,1	0,3	0,1	1,3	**12,1**
17	0,2	7,2	0,2	0,2	0,2	4,9	15,0	2,1	8,9	0,3	25,9	1,4	5,1	0,9	0,0	0,0	1,6	0,8	4,9	2,1	0,0	0,6	0,3	2,2	**15,0**
18	0,1	4,0	0,1	0,1	0,2	2,3	64,8	1,2	7,2	0,1	12,5	1,0	3,5	1,5	0,0	0,1	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,0
19	0,1	3,9	0,1	0,1	0,2	4,6	36,9	1,7	7,1	0,2	28,6	1,2	1,8	1,2	0,0	0,1	1,4	0,5	4,3	0,4	0,0	0,4	0,1	0,8	4,3
20	0,1	4,8	0,1	0,1	0,2	6,0	18,5	1,2	12,8	0,2	34,8	1,4	2,4	1,1	0,0	0,1	3,4	0,6	3,2	0,4	0,1	0,3	0,1	0,7	7,6

Tabla 10. Perfiles de ácido graso de semillas transgénicas T2 de *B. napus* conteniendo la construcción modB.

Muestra (T2 semilla)	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3	Total ω3 (%)	Total ω6 (%)	Proporción ω6 a ω3	Cont. total de PUFA (%)
CT136-27-18-1	0,1	5,0	2.6	25.4	3.6	6,7	0,2	37,5	1.4	1,0	0,1	2,1	0,8	0.4	0,9	10,2	53.4	7,1	0,13	60,5
CT136-27-18-2	0,2	7,1	2,8	16,9	4.3	5,5	0.4	29,1	5.4	0,8	0,1	1,2	0,5	0,5	1,9	21,2	59,8	6,1	0,10	66,0
CT136-27-18-3	0,1	5.4	2,5	26,5	3,8	6.4	0.4	26.4	4,7	1,0	0,1	0,7	1,1	0.6	1,2	17.3	52,0	6,9	0,13	58,9
CT136-27-18-4	0,1	5.3	2.4	34,7	4,0	5,9	0.3	30.3	1.3	1,1	0,1	1,1	1,5	0.3	0.4	9.3	44.4	6.3	0,14	50,7
CT136-27-18-5	0,1	4,8	2,7	34,5	3,8	5.6	0.3	23,5	3,9	1,2	0,1	0,7	1,1	0,5	1,1	14,2	45,1	6,0	0,13	51,1
CT136-27-18-6	0,1	5,0	2,1	54.3	3,8	5,7	0,2	18,2	0.6	1,5	0,1	1,1	0,7	0,1	0,2	4.4	25,5	6,1	0,24	31,5
CT136-27-18-7	0,1	5.3	2,1	43,8	4,2	5.6	0.4	18.3	2,2	1.3	0,2	0.6	1,5	0.4	0,5	11.6	35,2	6,2	0,18	41.4
CT136-27-18-8	0,1	5.4	2,7	25,8	4,1	6,7	0.4	26.6	5,7	1,0	0,1	0.6	1.3	0.6	1,2	15,8	51,9	7,1	0,14	59,0
CT136-27-18-9	0,1	4.6	1.6	53,8	3,7	17,5	0,5	9,2	0,5	1.6	0.3	0.6	0.4	0,1	0,1	3,7	14,5	18.3	1,26	32,8
CT136-27-18-10	0,1	4,8	2.4	44,1	3,7	5.4	0.4	19,1	2.3	1,1	0,1	0.6	1,5	0,5	0,8	11.4	36,1	5,9	0,16	42,0
CT136-27-18-11	0,1	5,1	2,2	48.3	4,1	10,9	0,7	12,5	1,2	1.3	0,2	0,5	1,5	0.3	0.3	9,1	25.3	11,8	0.47	37,1
CT136-	0,1	5.3	2,7	23.3	3,7	6,0	0.4	27,9	4,9	0,9	0,1	0,7	1.3	0,8	1,5	18,5	55,7	6.6	0,12	62,2

27-18-12																				
CT136-27-18-13	0,1	5,5	3.4	30,7	5.6	5,1	0.4	23,1	3,5	1,1	0,1	1,2	1,1	0.6	1,2	14,9	45,8	5,5	0,12	51.3
CT136-27-18-14	0,1	5.4	2.3	23,9	3,5	6,0	0.4	30,1	3,7	1,0	0,1	1,0	0,7	0.6	1,2	18,2	55,5	6.6	0,12	62,1
CT136-27-18-15	0,1	5,0	2.3	45.4	4,0	5.3	0.4	16,2	2.3	1,2	0,1	0,5	1,9	0.6	0,7	12.3	34.4	5,8	0,17	40.3
CT136-27-18-16	0,1	4,8	2,7	37,9	4,1	6,2	0.4	22,0	2.4	1,0	0,1	0,7	1.4	0,5	0,8	13,1	41,0	6,7	0,16	47,7
CT136-27-18-17	0,1	4,5	2.3	38,8	3.3	7.6	0.3	26,8	0,9	1.4	0,2	1.6	0,9	0,2	0,7	8.6	39,9	8,0	0,20	47,9
CT136-27-18-18	0,1	5,1	2.3	29,0	3.6	5,7	0.4	26,5	3,8	1,1	0,2	0,8	0,8	0.6	1,0	17.4	50,8	6.3	0,12	57,1
CT136-27-18-19	0,1	5,8	2.3	19,7	4,2	6,7	0,7	23,7	7,7	0,9	0,1	0.4	0,7	0.6	1,7	22,7	57.6	7,5	0,13	65,1
CT136-27-18-20	0,1	5,7	2,9	23,2	4,0	5.6	0.3	35,8	2.4	1,0	0,1	1.3	1,1	0,5	1,0	13,0	55,1	6,1	0,11	61,2

No se detectó ARA (C20:4ω6) en ninguna de las muestras. Las muestras también contuvieron aproximadamente 0,2% o 0,3% de C16:1, aproximadamente entre 0,1 y 0,3% de C16:3, entre aproximadamente 0,7% y 1,0% de C20:0, aproximadamente 0,3% de C22:0, y algunas muestras contuvieron niveles traza (<0,1%) de C20:1Δ13, C22:3ω3, C24:0 y C24:1.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos del lípido en semillas transgénicas T2 de *B. napus* transformadas con el ADN-T de la construcción modB, con una presunta mutación en el gen de la Δ4-desaturasa. Los lípidos también contuvieron aproximadamente 0,1% de 14:0, 0,2% de 16:3, entre 0,2 y 0,4% de GLA, 0,1% de 20:1Δ13, entre 0,3 y 0,4% de 22:0, y no se detectaron 16:2 y 22:1.

	16:0	**16:1ω13t**	**16:1**	**18:0**	**18:1**	**18:1d11**	**18:2**	**18:3n3**	**20:0**	**18:4n3**	**20:1d11**	**20:2n6**	**20:3n6**	**20:4n6**	**20:3n3**	**20:4n3**	**20:5n3**	**22:2n6**	**22:3n3**	**24:0**	**24:1**	**22:5n3**	**22:6n3**
CT-137-2-34	5,3	0,0	0,2	3,7	26,8	3,1	12,4	29,1	0,8	2,5	0,8	0,1	0,0	0,0	1,1	1,7	0,8	0,0	0,1	0,1	0,1	**10,0**	0,0
CT-137-2-38	5,3	0,0	0,2	4,2	24,4	3,0	12,6	29,4	0,9	2,5	0,8	0,1	0,0	0,0	1,3	2,2	0,9	0,0	0,1	0,2	0,1	**10,8**	0,0
CT-137-2-48	5,0	0,0	0,2	4,2	24,1	3,1	11,9	31,0	0,9	2,4	0,9	0,1	0,0	0,0	1,5	2,0	1,0	0,0	0,1	0,1	0,1	**10,5**	0,0

CT-137-2-51	5,7	0,0	0,2	4,6	22,3	3,4	12,3	34,5	1,0	2,0	0,8	0,1	0,0	0,0	1,9	1,2	0,5	0,0	0,1	0,2	0,2	**7,9**	0,0
CT-137-2-59	5,4	0,0	0,2	3,9	25,7	3,4	12,9	27,8	0,9	2,6	0,8	0,1	0,0	0,0	1,0	1,9	0,9	0,0	0,1	0,2	0,1	**11,0**	0,0

Tabla 12. Composición de ácidos grasos de aceite de semillas T2 de semillas de *B. napus* transformadas con el ADN-T de GA7-modB.

C16:0	**C18:0**	**C18:1n9**	**C18:1n7**	**C18:2n6**	**C18:3n6**	**C18:3n3**	**C20:0**	**C18:4n3**	**C20:1n9c**	**C20:2n6 + C21:0**	**C20:3n3**	**C20:4n3**	**C20:5n3**	**C22:5n6**	**C22:5n3**	**C22:6n3**
6,3	2,4	8,4	3,1	6,9	1,1	21,9	0,7	7,5	0,7	0,1	0,5	0,5	0,6	0,2	1,5	34,3

Las muestras de aceite de semilla también contuvieron 0,1% de C14:0; 0,2% de C16:1; 0,1% de C20:3ω6; nada de C22:1 y C22:2ω6; 0,1% de C24:0 y 0,2% de C24:1, 2,6% de otros ácidos grasos.

Ejemplo 5. Análisis de TAG de semillas transgénicas de *A. thaliana* que producen DHA

Se determinó la distribución posicional del DHA en los TAG de las semillas transformadas de *A. thaliana* por RMN. Se extrajeron los lípidos totales de aproximadamente 200 mg de semilla rompiéndolas primero bajo hexano antes de transferir las semillas rotas a un tubo de vidrio con 10 mL de hexano. Se entibió el tubo a aproximadamente 55°C en un baño de agua y luego se pasó por vórtex y se centrifugó. Se separó la solución de hexano y se repitió el procedimiento otras 4 veces con 10 mL. Se combinaron los extractos, se concentraron por evaporación rotatoria y se purificaron los TAG del lípido extraído separándolos de los lípidos polares por pasaje por una columna corta de sílice usando 20 mL de éter dietílico al 7% en hexano. Se determinaron las distribuciones posicionales de los grupos acilo en los TAG purificados en forma cuantitativa como se describió previamente (Petrie y col., 2010a y b).

El análisis mostró que la mayor parte del DHA en el aceite total de semilla se localizó en las posiciones *sn*-1/3 de los TAG con un poco hallado en la posición *sn-2* (Figura 5). Esto fue contrario a los TAG de las semillas que producen ARA que demostraron que el 50% del ARA ($20:4^{\Delta 5,8,11,14}$) se localizaba en la posición *sn-2* del aceite de canola transgénica mientras que solo se esperaría un 33% en una distribución al azar (Petrie y col., 2012).

Los lípidos totales de las semillas transgénicas de *A. thaliana* se analizaron también por LC-MS triple cuadrupolar para determinar las especies mayoritarias que contienen DHA (TAG) (Figura 6). La especie de TAG más abundante que contiene DHA fue el DHA-18:3-18:3 (TAG 58:12; nomenclatura no descriptiva de la distribución posicional) en donde la segunda especie más abundante fue el DHA-18:3-18:2 (TAG 58:11). Se observó Tri-DHA TAG (TAG 66:18) en aceite total de semilla, aunque a

niveles navajos pero detectables. Otras especies mayoritarias de TAG que contuvieron DHA incluyeron a DHA-34:3 (TAG 56:9), DHA-36:3 (TAG 58:9), DHA-36:4 (TAG 58:10), DHA-36:7 (TAG 58:13) y DHA-38:4 (TAG 60:10). Las identidades de los dos TAG mayoritarios que contienen DHA se confirmaron además por Q-TOF MS/MS.

Ejemplo 6. Ensayo del contenido y composición de esteroles de los aceites

Se caracterizaron los fitoesteroles de 12 muestras vegetales de aceite comprados de fuentes comerciales de Australia por análisis por GC y GC-MS como derivados de éter de O-trimetilsililo (éter de OTMSi) como se describe en el Ejemplo 1. Los esteroles se identificaron por tiempo de retención, interpretación de los espectros de masa y comparación con datos espectrales de masa de la literatura y de laboratorio. Se cuantificaron los esteroles mediante el uso de un estándar interno de 5β(H)-Colan-24-ol. La estructura básica de los fitoesteroles y las estructuras químicas de algunos de los esteroles identificados se muestran en la Figura 7 y en la Tabla 13.

Los aceites vegetales que se analizaron fueron de: sésamo (*Sesamum indicum*), oliva (*Olea europaea*), girasol (*Helianthus annus*), castor (*Ricinus communis*), canola (*Brassica napus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), maní (*Arachis hypogaea*), lino (*Linum usitatissimum*) y soja (*Glycine max*). En abundancia relativa decreciente a través de todas las muestras de aceite, los fitoesteroles mayoritarios fueron: β-sitosterol (rango entre 28 y 55% de contenido total de esteroles), Δ5-avenasterol (isofucosterol) (entre 3 y 24%), campesterol (entre 2 y 33%), Δ5-stigmasterol (entre 0,7 y 18%), Δ7-stigmasterol (entre 1 y 18%) y Δ7-avenasterol (entre 0,1 y 5%). Se identificaron varios otros esteroles minoritarios, estos fueron: colesterol, brasicasterol, calinasterol, campestanol y eburicol. También se detectaron otros cuatro esteroles C29:2 y dos C30:2, pero se requiere una investigación adicional para completar la identificación de estos componentes minoritarios. Además, hubieron

presentes otros varios esteroles no identificados en algunos de los aceites pero debido a su abundancia muy baja, los espectros de masa no fueron lo suficientemente intensos para permitir la identificación de sus estructuras.

Tabla 13. Nombres sistemáticos por IUPAC de los estroles identificados.

Esterol No.	**Nombres comunes**	**IUPAC / Nombre sistemático**
1	colesterol	colest-5-en-3β-ol
2	brassicasterol	24-metilcolesta-5,22E-dien-3β-ol
3	chalinasterol / 24-metilen colesterol	24-metilcolesta-5,24(28)E-dien-3β-ol
4	campesterol / 24-metilcolesterol	24-metilcolest-5-en-3β-ol
5	campestanol / 24-metilcolestanol	24-metilcolestan-3β-ol
7	Δ5-estigmasterol	24-etilcolesta-5,22E-dien-3β-ol
9	ergost-7-en-3β-ol	24-metilcolest-7-en-3β-ol
11	eburicol	4,4,14-trimetilergosta-8,24(28)-dien-3β-ol
12	β-sitosterol / 24-etilcolesterol	24-etilcolest-5-en-3β-ol
13	D5-avenasterol / isofucosterol	24-etilcolesta-5,24(28)Z-dien-3β-ol
19	D7-estigmasterol / estigmast-7-en-3b-ol	24-etilcolest-7-en-3β-ol
20	D7-avenasterol	24-etilcolesta 7,24(28)-dien-3β-ol

Los contenidos de esteroles en mg/g de aceite en cantidad decreciente fueron: aceite de canola (6,8 mg/g), aceite de sésamo (5,8 mg/g), aceite de lino (entre 4,8 y 5,2 mg/g), aceite de girasol (entre 3,7 y 4,1 mg/g), aceite de maní (3,2 mg/g), aceite de cártamo (3,0 mg/g), aceite de soja (3,0 mg/g), aceite de oliva (2,4 mg/g), aceite de castor (1,9 mg/g). Las composiciones % de esteroles y el contenido total de esteroles

se presentan en la Tabla 14.

Entre todas las muestras de aceite de semilla, el fitoesteol mayoritario fue en general el β-sitosterol (rango entre 30 y 57% de contenido total de esteroles). Hubo un amplio rango entre los aceites en las proporciones de los otros esteroles mayoritarios: campesterol (entre 2 y 17%), Δ5-stigmasterol (entre 0,7 y 18%), Δ5-avenasterol (entre 4 y 23%), Δ7-stigmasterol (entre 1 y 18%). Los aceites de las diferentes especies tuvieron un diferente perfil de esteroles con algunos teniendo perfiles algo distintivos. En el caso del aceite de canola, el mismo tuvo la mayor proporción de campesterol (33,6%), mientras que las muestras de las otras especies en general tuvieron menores niveles, por ejemplo hasta 17% en aceite de maní. El aceite de cártamo tuvo una proporción relativamente alta de Δ7-stigmasterol (18%), mientras que este esterol estuvo usualmente bajo en las muestras de los otros aceites, hasta 9% en aceite de girasol. Debido a que fueron distintivos para cada especie, los perfiles de esteroles pueden usarse por lo tanto para ayudar a la identificación de aceites de plantas o vegetales específicos y para verificar si son genuinos o si están adulterados con otros aceites.

Se compararon dos muestras de cada uno de girasol y cártamo, produciendo en cada caso una por prensado en frío de semillas y sin refinar, mientras que otro no fue prensado en frío y refinado. A pesar de que se observaron algunas diferencias, las dos fuentes de aceites tuvieron similares composiciones de esteroles y contenidos de esteroles totales, lo que sugiere que el procesamiento y refinado tuvieron poco efecto sobre estos dos parámetros. El contenido de esteroles entre las muestras varió en tres veces y estuvo en el rango entre 1,9 mg/g y 6,8 mg/g. El aceite de canola aceite tuvo el mayor contenido de esteroles y el aceite de castor el menor.

Ejemplo 7. Acumulación incrementada de DHA en la posición *sn-2* de los TAG

Los inventores de la presente consideraron que la acumulación del DHA y/o el DPA en la posición *sn-2* de los TAG podía incrementarse por coexpresión de una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT) junto con la vía de biosíntesis de DHA o DPA conferido por la construcción GA7 o sus variantes. Las LPAAT preferidas son las que pueden actuar sobre acil-graso poliinsaturado-CoA C22 como sustrato, preferentemente DHA-CoA y/o DPA-CoA, resultando en una mayor inserción de la cadena poliinsaturada C22 en la posición *sn-2* del LPA para formar PA, en relación a la LPAAT endógena. Las enzimas LPAAT citoplasmáticas con frecuencia muestran preferencias variadas de sustrato, en particular cuando sintetiza y acumula ácidos grasos inusuales en los TAG. Una LPAAT2 de *Limnanthes douglasii* demostró el uso de erucoil-CoA (C22:1-CoA) como sustrato para la síntesis de PA, contrariamente a una LPAAT1 de esta misma especie que no pudo utilizar el C22 como sustrato (Brown y col., 2002).

Tabla 14. Contenido de esteroles y composición aceites aceites vegetales ensayados.

Número de esterol*	**Nombre común de esterol**	**Sésamo**	**Oliva**	**Girasol**	**Girasol** cold-pressed	**Castor**	**Canola**	**Cártamo**	**Cártamo** cold-pressed	**Maní**	**Lino (semilla)**	**Lino (semilla)**	**Soja**
1	colesterol	0,2	0,8	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2
2	brasicasterol	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
3	chalinasterol /24-metilen colesterol	1,5	0,1	0,3	0,1	1,1	2,4	0,2	0,1	0,9	1,5	1,4	0,8
4	campesterol /24-metilcolesterol	16,2	2,4	7,4	7,9	8,4	33,6	12,1	8,5	17,4	15,7	14,4	16,9
5	campestanol /24-metilcolestanol	0,7	0,3	0,3	0,1	0,9	0,2	0,8	0,8	0,3	0,2	0,2	0,7
6	C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,5	0,5	0,0	1,2	1,3	0,1

7	Δ5-estigmasterol	6,4	1,2	7,4	7,2	18,6	0,7	7,0	4,6	6,9	5,1	5,8	17,6
8	desconocido	0,5	1,3	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	1,3	0,4	0,7	0,6	1,3
9	ergost-7-en-3β-ol	0,1	0,1	1,9	1,8	0,2	0,4	2,7	4,0	1,4	1,4	1,4	1,0
10	desconocido	0,0	1,3	0,9	0,8	1,2	0,9	1,8	0,7	1,2	0,7	0,5	0,7
11	eburicol	1,6	1,8	4,1	4,4	1,5	1,0	1,9	2,9	1,2	3,5	3,3	0,9
12	β-sitosterol / 24-etilcolesterol	55,3	45,6	43,9	43,6	37,7	50,8	40,2	35,1	57,2	29,9	28,4	40,2

13	Δ5-avenasterol / isofucosterol	8,6	16,9	7,2	4,1	19,3	4,4	7,3	6,3	5,3	23,0	24,2	3,3
14	triterpenoide alcohol	0,0	2,4	0,9	1,1	0,0	0,0	1,6	1,9	0,0	0,0	0,0	0,9
15	triterpenoide alcohol	0,0	0,0	0,7	0,6	0,0	0,0	2,8	1,8	0,0	0,0	0,3	0,0
16	C29:2*	0,0	0,5	0,7	0,7	1,5	1,2	2,8	1,9	2,0	1,0	0,7	0,5
17	C29:2*	1,0	0,9	2,3	2,4	0,6	0,4	1,3	1,9	0,9	1,0	1,0	1,0
18	C30:2*	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	Δ7-stigmasterol / stigmast-7-en-3β-ol	2,2	7,1	9,3	10,9	2,3	0,9	10,5	18,3	1,1	7,9	8,7	5,6
20	Δ7-avenasterol	1,3	0,1	4,0	3,6	0,6	0,2	2,0	4,7	0,7	0,4	0,4	0,6
21	desconocido	0,7	7,1	0,9	0,8	0,0	0,4	0,3	0,4	0,0	3,0	3,6	0,0
22	desconocido	0,3	0,0	0,3	0,9	0,0	0,0	1,2	1,3	0,2	0,1	0,0	0,3
23	desconocido	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
24	desconocido	0,0	3,1	0,9	1,3	0,6	0,4	0,2	0,4	0,7	1,7	1,9	0,8
25	desconocido	0,9	0,4	0,3	0,5	0,3	0,1	0,5	0,7	0,3	0,1	0,1	0,6

26	C30:2	2,2	6,0	4,6	5,7	1,4	0,6	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	5,2
27	desconocido	0,0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,0	0,3
	Suma	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	esteroles totales (mg/g de aceite)	5,8	2,4	4,1	3,7	1,9	6,8	3,2	3,0	3,2	4,8	5,2	3,0

C29:2* y y C30:2* indican un esterol de C29 con dos enlaces dobles y un esterol de C30 con dos enlaces dobles, respectivamente

Se consideraron las LPAAT conocidas y se seleccionaron varias para probar, incluso algunas que no se esperaba que aumenten la incorporación de DHA en la posición *sn-2*, como controles. Las LPAAT conocidas incluyeron a: LPAAT2 de *Arabidopsis thaliana*: (SEQ ID NO: 40, No. de Acceso ABG48392, Kim y col., 2005), LPAAT de *Limnanthes alba* (SEQ ID NO: 41, No. de Acceso AAC49185, Lassner y col., 1995), Slc1p de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 42, No. de Acceso NP_010231, Zou y col., 1997), LPAAT1 de *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 44, No. de Acceso AED33305; US 7879591) y LPAAT de *Brassica napus* (SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO:46, Nos. de Acceso ADC97479 y ADC97478, respectivamente).

La LPAAT2 de *Arabidopsis* (también llamada LPAT2) es una enzima que se localiza en el retículo endoplásmico que muestra tener actividad sobre sustratos C16 y C18, sin embargo la actividad sobre los sustratos C20 o C22 no se probó (Kim y col., 2005). La LPAAT2 de *Limnanthes alba* demostró insertar una cadena acil-C22:1 en la posición *sn-2* del PA, a pesar de que su capacidad para usar al DHA o DPA como sustrato no se probó (Lassner y col., 1995). La LPAAT seleccionada de *S. cerevisiae* Slc1p demostró tener actividad usando 22:1-CoA además de 18:1-CoA como sustratos, lo que indica una amplia especificidad de sustrato con respecto a la longitud de la cadena (Zou y col., 1997). Otra vez, no se probó a DHA-CoA, DPA-CoA y otros LC-PUFA como sustratos. Se había demostrado previamente que la LPAAT de *Mortierella* tiene actividad sobre los ácidos grasos EPA y DHA como sustratos en *Yarrowia lipolitica* transgénica (US 7879591) pero su actividad en células vegetales era desconocida.

Se identificaron otras LPAAT por parte de los inventores. *Micromonas pusilla* es una microalga que produce y acumula DHA en su aceite, a pesar de que la distribución posicional del DHA en los TAG de esta especie no se ha confirmado. La LPAAT de *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 43, No. de Acceso XP_002501997) se identificó por

búsqueda de secuencia genómica de *Micromonas pusilla* usando a la LPAAT2 de *Arabidopsis* como secuencia de entrada en BLAST. Surgieron varias secuencias candidatas y se sintetizó la secuencia de XP_002501997 para probar en LC-PUFA de C22. Se anotó a la LPAAT *Ricinus communis* como LPAAT putativa en la secuencia genómica de castor (Chan y col., 2010). Se sintetizaron cuatro LPAAT candidatas del genoma de castor y se probaron en lisados de hoja crudos de tejido de hoja infiltrado de *N. benthamiana*. La secuencia candidato que se describe en la presente mostró actividad como LPAAT.

Se alinearon varias LPAAT candidatas con LPAAT conocidas en un árbol filogenético (Figura 8). Ha de notarse que la LPAAT putativa de *Micromonas* no se agrupa con las LPAAT putativas de C22, sino que fue una secuencia divergente.

Como una prueba inicial para las diversas LPAAT para estudiar su capacidad para usar a DHA-CoA como sustrato, se hicieron construcciones genéticas quiméricas para expresión constitutiva de LPAAT exógenas en hojas de *N. benthamiana*, cada una bajo el control del promotor 35S, como sigue: 35S:Arath-LPAAT2 (LPAAT *de Arabidopsis* ER); 35S:Limal-LPAAT (LPAAT de *Limnanthes alba*); 35S:Sacce-Slc1p (LPAAT de *S. cerevisiae*); 35S:Micpu-LPAAT (LPAAT de *Micromonas pusilla*); 35S:Moral-LPAAT1 (LPAAT de *Mortierella alpina*); 35S:Brana-LPAAT1.13 (LPAAT1.13 de *Brassica napus*); 35S:Brana-LPAAT1.5 (LPAAT1,5 de *Brassica napus*). Se usó una construcción 35S:p19 que carece de una LPAAT exógena como control en el experimento. Se introdujo cada una de estas construcciones mediante *Agrobacterium* en hojas de *N. benthamiana* como se describe en el Ejemplo 1, y 5 después de la infiltración, se cortaron las zonas de hojas tratadas y molieron para hacer lisados de hoja. Cada lisado incluyó la LPAAT exógena así como también las enzimas endógenas para la síntesis de LPA. Las reacciones *in vitro* se configuraron para agregar por separado OA y DHA marcados con ^{14}C a los lisados. Se incubaron las

reacciones a 25°C y se determinó el nivel de incorporación de los ácidos grasos marcados con ^{14}C en el PA por TLC. Se evaluó la capacidad de cada LPAAT para usar DHA en relación a ARA y los ácidos grasos de C18. Se halló que las LPAAT de hierba de la pradera (*Limnanthes alba*), *Mortierella* y *Saccharomyces* tienen actividad sobre el sustrato de DHA, con PA radiomarcado apareciendo para estas pero no para las otras LPAAT. Todas las LPAAT se confirmaron como activas mediante el uso del control de ácido oleico.

Para probar la actividad de LPAAT en semillas, se insertaron varias de las secuencias codificantes de proteínas o LPAAT en un vector binario bajo el control de un promotor de conlinina (pLuCnl1). Las construcciones genéticas resultantes, conteniendo los genes quiméricos, Cnl1:Arath-LPAAT (control negativo), Cnl1:Limal-LPAAT, Cnl:Sacce-Slc1p, y Cnl1:Moral-LPAAT, respectivamente, se usan luego para transformar plantas de *A. thaliana* que producen DHA en su semilla para generar transformantes estables que expresen las LPAAT y la vía transgénica de DHA en una forma específica de semilla para probar si es posible una incorporación incrementada de DHA en la posición *sn-2* de los TAG. También se usan las construcciones para transformar plantas de *B. napus* y *C. sativa* que ya contienen la construcción GA7 y variantes de la misma (Ejemplos 2 a 4) para generar una progenie que porta tanto la LPAAT parental como las construcciones genéticas. Se prueba la mayor incorporación de DHA en la posición *sn-2* de los TAG en relación a la incorporación en plantas que carecen de las LPAAT que codifican para los transgenes. También mejora el contenido de aceite en las semillas, en particular para las semillas que producen mayores niveles de DHA, en contra de la tendencia vista en semillas de *Arabidopsis* como se describe en el Ejemplo 2.

Se usó la construcción 35S:Moral-LPAAT1 para transformar una línea ya transgénica de *Arabidopsis thaliana* que era homocigota para el ADN-T de la

construcción GA7 y cuyas semillas contenían aproximadamente 15% de DHA en los lípidos de semilla (Petrie y col., 2012). Para esto, se hizo uso del gen marcador de selección kanamicina en la construcción 35S:Moral-LPAAT1 que era diferente al gen marcador de selección *bar* ya presente en la línea transgénica. Se seleccionaron las plántulas transgénicas que eran resistentes a kanamicina y se crecieron hasta madurez en un invernadero. Se cosecharon las semillas T2 y se analizó la composición de ácidos grasos de sus lípidos totales de semilla por GC (Tabla 15). Se observaron tres fenotipos entre las 33 líneas transformadas independientes. En un primer grupo (6/33 líneas), el DPA se incrementó significativamente a un nivel sustancialmente mayor que el nivel de DHA, hasta aproximadamente 10,6% de los lípidos totales de semilla. Esto se produjo a expensas del DHA que estuvo fuertemente disminuido en este grupo de líneas. En dos de las líneas de este primer grupo, la suma de DPA + DHA se redujo, pero no en las otras 4 líneas. E un segundo grupo (5/33), los niveles de DPA y DHA fueron aproximadamente iguales, en donde la suma de DPA + DHA fue aproximadamente igual que en la semilla parental. En el tercer grupo, los niveles de DPA y DHA fueron similares a los de las semillas parentales. Una posible explicación para el mayor nivel de DPA en el primer y segundo grupo es que la LPAAT compite con la Δ4-desaturasa por el sustrato de DPA-CoA e incorpora preferentemente el DPA en PA y por lo tanto en los TAG, en relación a la Δ4-desaturación. Una segunda posible explicación es que la Δ4-desaturación está parcialmente inhibida.

Se cosecharon las semillas de las plantas de *Arabidopsis* transformadas con el ADN-T de la construcción GA7 que se habían transformado además con el vector Cnl1::Moral-LPAAT y se extrajo el aceite de las semillas. Luego se aisló la fracción de TAG del aceite extraído por métodos de TLC y se recuperó de la placa de TLC. Se analizaron estas muestras de TAG y las muestras de aceite de semilla antes del

fraccionamiento por digestión con lipasa de *Rhizopus* para determinar la distribución posicional del DHA. La lipasa es específica para grupos acilo esterificados en la posición sn-1 o sn-3 de los TAG. Esto se llevó a cabo emulsionando cada muestra de lípidos en 5% de goma arábiga usando un ultrasonicador, agregando la solución de lipasa de *Rhizopus* en 0,1 M de Tris-HCl a pH 7,7 conteniendo $CaCl_2$ 5 mM e incubando las mezclas a 30°C con agitación continua. Se detuvo cada reacción por agregado de cloroformo: metanol (2/1, v/v) y un volumen de KCl 0,1 M a cada mezcla. Se extrajeron los lípidos en la fracción de cloroformo y se determinaron las cantidades relativas de los componentes *sn-2* MAG, *sn*-1/3 FFA, DAG y TAG de los lípidos resultantes por separación en TLC impregnada con ácido bórico al 2,3% usando hexano/dietiléter/ácido acético (50/50/1, v/v). Las bandas de lípidos se visualizaron por atomizado de 0,01% de primulina en acetona/agua (80/20, v/v) sobre la placa de TLC y con visualización bajo luz UV. Se identificaron las bandas lipídicas individuales en base a las manchas de lípidos estándares que se resolvieron en la misma placa de TLC. Las bandas de lípidos de la TLC se recolectaron en viales de vidrio y se prepararon sus ésteres de metilo de ácido graso usando metanol-HCl 1 N (Supelco) e incubado a 80°C durante 2 h. Se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos individuales por GC.

Este ensayo demostró que el DHA en las semillas parentales transformadas con GA7 (líneas 22-2-1-1 y 22-2-38-7) se esterificó preferentemente en la posición *sn*-1 o *sn*-3 de los TAG. Por el contrario, el DHA de las semillas NY11 y NY15 transformadas con ambas con la construcción GA7s y el transgen que codifica para LPAAT se enriqueció en la posición *sn-2*, con 35% del DHA en una de las líneas y 48% del DHA en la otra línea esterificado en la posición *sn-2* de los TAG, o sea después de la digestión con lipasa el DHA estuvo presente como *sn-2*-MAG (Tabla 16). Se obtienen resultados análogos para semillas de *B. napus* y *B. juncea*

transformadas con el ADN-T de la construcción GA7-modB como con el ADN-T que codifica para el gen de LPAAT y que produce DHA.

Con el objetivo de determinar si la LPAAT de *Mortierella* u otra LPAAT tenía preferencia para DPA-CoA o para DHA-CoA, se arman reacciones *in vitro* por agregado en forma separada de DPA-CoA o DHA-CoA marcados con ^{14}C a los lisados de hojas de *N. benthamiana* que expresan transitoriamente la LPAAT candidata bajo el control de un promotor constitutivo como se describió previamente. Las reacciones se incuban a 25°C y se determina el nivel de incorporación de los ácidos grasos marcados con ^{14}C en el PA por análisis de los lípidos por TLC. Se evalúa la capacidad de cada LPAAT para usar DHA-CoA en relación al DPA-CoA. Se usan genes que codifican para LPAAT que se confirmó que tienen buena actividad de LPAAT para incorporación de DHA para producir plantas y semillas de canola transformadas que producen DHA.

Se usan genes que codifican para las LPAAT que tienen alta actividad usando DPA-CoA para transformar plantas y semillas que producen DPA, para incrementar la cantidad de DPA que se esterifica en la posición *sn-2* de los TAG.

Tabla 15. Composición de ácidos grasos (% de los ácidos grasos totales) de semillas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con una construcción de LPAAT1 así como también con la construcción GA7 para producción de DHA.

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
NY-1	9,3	3,2	9,1	6,8	9,4	0,5	23,8	1,6	4,1	7,9	5,1	0,6	0,0	0,9	0,4	0,6	0,6	1,2	**7,9**	**4,5**
NY-2	10,7	3,3	6,5	4,4	7,6	0,3	28,1	1,9	4,3	8,5	3,7	0,7	0,0	1,1	0,5	1,1	0,8	1,4	**1,1**	**11,6**
NY-3	9,3	2,8	6,3	3,4	10,3	0,2	32,8	2,2	2,7	6,2	3,6	1,1	0,0	1,9	0,5	1,4	0,9	0,7	**1,0**	**10,7**
NY-4	11,4	3,5	4,5	3,1	7,0	0,3	32,5	2,1	4,7	5,5	2,3	1,0	0,0	1,9	0,6	0,8	0,6	1,1	**0,9**	**14,3**
NY-5	14,6	4,5	7,0	7,7	6,7	0,3	20,7	2,2	5,7	5,4	4,8	0,4	0,0	0,9	0,9	0,8	0,4	1,2	**1,0**	**11,7**
NY-6	7,8	2,7	12,5	2,2	18,0	0,1	24,9	1,8	0,7	15,5	3,1	1,4	0,0	1,2	0,3	0,5	1,5	0,3	**3,0**	**0,8**
NY-7	9,3	2,9	6,7	3,8	9,2	0,2	31,5	2,1	3,2	7,5	3,7	0,9	0,0	1,6	0,5	1,3	0,8	0,8	**1,1**	**10,9**
NY-8	8,8	3,2	8,2	5,5	11,0	0,3	25,3	1,9	3,0	8,3	5,4	1,0	0,0	1,2	0,5	0,8	0,8	0,8	**6,1**	**6,0**
NY-9	12,3	3,7	5,0	4,6	7,1	0,2	28,3	2,3	4,2	5,6	3,8	0,8	0,0	1,6	0,7	0,7	0,6	1,1	**1,2**	**13,8**
NY-10	8,6	3,2	8,5	3,1	9,7	0,3	31,5	1,6	3,4	8,7	2,8	1,0	0,0	1,3	0,3	0,9	0,6	1,1	**10,6**	**1,0**

NY-11	11,5	3,2	4,5	2,5	7,1	0,3	33,3	2,1	3,9	5,7	1,9	0,9	0,0	2,0	0,5	0,7	0,7	0,8	**1,0**	**15,6**
NY-12	8,7	3,2	7,5	5,1	8,5	0,2	26,8	2,0	3,7	8,7	5,1	0,9	0,0	1,2	0,5	1,1	0,8	1,2	**10,0**	**2,6**
NY-13	11,5	3,4	5,2	3,4	8,3	0,3	30,0	2,2	5,0	6,2	3,2	0,9	0,0	1,7	0,6	1,5	0,8	1,1	**1,0**	**11,6**
NY-14	9,2	2,9	6,6	2,0	10,3	0,2	34,7	1,9	3,3	7,7	1,6	1,2	0,0	1,8	0,4	1,2	0,8	0,9	**0,8**	**11,1**
NY-15	10,9	3,3	4,6	2,7	7,0	0,3	34,1	1,9	5,1	5,5	2,0	0,9	0,0	1,8	0,5	0,8	0,5	1,0	**1,0**	**14,7**
NY-16	10,5	3,4	6,0	4,6	7,8	0,3	30,3	1,8	4,4	5,4	2,9	0,7	0,0	1,5	0,5	0,9	0,5	1,1	**1,3**	**14,2**
NY-17	9,1	2,4	5,9	2,5	10,4	0,2	35,4	1,6	3,6	6,4	2,1	1,1	0,0	1,9	0,4	1,2	0,7	1,0	**0,9**	**11,7**
NY-18	9,7	3,6	8,8	6,2	12,1	0,3	21,0	1,9	4,0	8,3	5,9	0,8	0,0	0,9	0,5	0,6	0,9	1,0	**5,7**	**5,1**
NY-19	8,4	3,1	12,0	3,1	14,6	0,2	28,8	1,7	1,6	11,3	3,2	1,0	0,0	1,4	0,4	0,6	1,0	0,6	**3,9**	**1,2**
NY-20	10,1	3,2	5,4	3,3	8,9	0,3	32,8	2,1	4,1	5,5	2,8	1,0	0,0	1,9	0,5	1,1	0,7	0,9	**1,1**	**12,1**
NY-21	10,5	3,6	5,6	3,8	8,2	0,3	31,9	2,0	4,6	5,9	2,8	0,9	0,0	1,7	0,5	0,8	0,6	1,0	**0,9**	**12,5**
NY-22	8,4	3,3	7,4	2,3	9,4	0,2	33,5	1,8	3,4	8,8	2,2	1,2	0,0	1,7	0,4	1,3	0,7	1,0	**5,5**	**6,1**
NY-23	8,3	2,8	7,0	1,9	11,0	0,2	34,6	1,9	2,6	9,3	1,7	1,4	0,0	2,0	0,4	1,2	1,0	0,7	**0,7**	**9,9**
NY-24	9,0	3,3	7,0	4,3	9,9	0,2	30,0	1,8	3,2	7,7	4,3	1,0	0,0	1,6	0,4	0,6	0,8	0,8	**3,4**	**8,8**
NY-25	9,4	3,3	6,0	3,6	8,2	0,2	32,6	1,8	4,0	6,8	3,6	1,0	0,0	1,7	0,4	0,6	0,7	0,9	**4,8**	**8,7**

NY-26	10,4	4,2	8,0	3,8	16,0	0,4	18,7	2,5	2,5	10,1	4,0	1,0	0,0	0,8	0,8	1,9	1,0	1,4	**1,4**	**8,4**
NY-27	9,4	3,2	7,5	5,3	11,4	0,2	28,6	2,0	2,3	7,5	5,5	1,0	0,0	1,8	0,5	0,6	0,9	0,6	**1,5**	**7,6**
NY-28	9,4	3,4	6,5	3,6	8,8	0,3	32,4	1,8	3,9	6,7	3,3	0,9	0,0	1,6	0,4	0,7	0,6	1,0	**10,1**	**2,7**
NY-29	10,2	3,7	7,6	4,3	8,0	0,4	28,8	1,7	4,8	7,6	2,9	0,7	0,0	1,1	0,4	0,7	0,5	1,4	**1,9**	**11,6**
NY-30	11,1	3,5	5,4	4,1	7,3	0,3	30,2	2,0	4,7	6,0	3,0	0,8	0,0	1,7	0,5	0,7	0,7	1,1	**1,0**	**13,7**
NY-31	9,6	3,0	5,6	2,1	8,5	0,2	35,4	2,0	3,9	7,1	1,7	1,2	0,0	2,1	0,4	0,9	0,8	0,8	**0,8**	**12,3**
NY-32	8,5	3,1	8,0	1,9	9,5	0,3	31,7	1,5	3,3	12,9	1,4	1,0	0,1	1,1	0,3	1,2	0,8	1,2	**0,8**	**9,8**
NY-33	10,3	3,8	7,7	6,3	8,1	0,3	24,4	2,0	4,4	7,5	4,8	0,7	0,0	1,1	0,5	0,6	0,6	1,1	**2,8**	**10,7**

Tabla 16. Presencia de DHA en la posición *sn-2* de los TAG en el lípido de semillas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con el vector Cnl1::Moral-LPAAT así como también el ADN-T de la construcción GA7, en relación a la presencia de DHA en los TAG. Las composiciones de ácido graso de los TAG y *sn-2* MAG también contuvieron entre 0 y 0,4% de cada uno de 14:0, 16:1w13t, 16:2, 16:3, 22:0, y 24:0.

Muestra	**C16:0**	**16:1d9**	**C18:0**	**C18:1**	**C18:1d11**	**C18:2**	**C18:3n6**	**C18:3n3**	**C20:0**	**18:4**	**C20:1d1**	**20:1d13**	**C20:2n6**	**C20:3n6**	**C20:4n6**	**C20:3n3**	**20:4n3**	**C22:1**	**20:5n3**	**C22:4n6**	**22:5n6**	**22:4n3**	**22:5n3**	**C22:6n3**
22-2-1-1 TAG	12,	0,	4,	6,	3,	7,2	0,	28,	1,	4,	9,7	2,	0,	0,	0,	1,	1,	0,	2,			0,	0,	10,

	2	4	4	4	9		8	8	6	3		3	7	1	1	3	0	6	1			0	7	1
2-MAG	0,6	0,1	0,3	8,3	2,5	10,1	0,7	53,9	0,2	6,5	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	3,8			0,0	2,3	9,1
DHA en *sn-2* = 30%																								
22-2-38-7 aceite	10,0	0,2	3,7	6,0	2,7	6,4	0,4	33,8	1,6	3,7	11,3	1,8	0,8			1,3	0,9	0,6	1,2	0,1			0,7	11,6
2-MAG	0,5	0,1	0,3	9,7	2,4	11,1	0,6	60,0	0,1	3,6	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,2	0,0	2,1			0,1	1,3	6,7
DHA en *sn-2* = 19%																								
Transformación adicional con transgen que codifica para LPAAT de *Mortierella alpina*																								
NY11-TAG	11,0	0,2	3,4	6,0	2,8	9,2	0,3	34,8	1,6	3,6	6,3	1,8	1,0	0,0	0,0	1,8	0,7	0,6	0,9		0,0	0,1	0,6	12,2
2-MAG	0,7	0,1	0,2	6,7	1,1	11,8	0,3	49,8	0,2	3,7	0,5	1,5	0,3	0,0	0,0	1,6	0,6	0,1	0,8		0,1	0,2	1,6	17,8
DHA en *sn-2* = 48%																								
NY-15-aceite	11,0	0,0	3,3	4,6	2,8	6,9	0,3	33,6	2,0	5,1	5,5	2,1	0,9	0,0	0,0	1,9	0,7	0,6	0,9	0,1	0,4		0,9	14,9
2-MAG	0,8	0,1	0,3	6,4	1,3	11,4	0,3	50,2	0,2	4,9	0,4	1,4	0,2	0,0	0,0	1,5	0,6	0,1	0,9	0,0	0,0	0,2	1,6	16,7
DHA en *sn-2* = 37%																								

Ejemplo 8. Análisis adicional de semillas transgénicas de *Camelina sativa*

Contenido total de lípidos

Se analizaron semillas de *C. sativa* que eran homocigotas para el ADN-T de la construcción GA7 y que contenían DHA en su contenido total de ácidos grasos para su contenido total y composición de lípidos como sigue. Se llevaron a cabo dos pasos consecutivos de extracción con solvente sobre las semillas, primero usando hexano y luego usando cloroformo/metanol. No se agregaron antioxidantes durante las extracciones o el análisis. Aquí no se usó el método de extracción de Soxhlet que se usa comúnmente para extraer lípidos de semilla mediante calentamiento prolongado y reflujo de la mezcla lípidos/solvente, debido a la potencial degradación u oxidación de los PUFA ω3 tales como el DHA.

Se usó hexano como solvente en la primera extracción debido a que el mismo es el estándar en la industria de las semillas aceiteras. También, el mismo preferentemente extraer aceite que contiene TAG debido a sus propiedades de solvatación y su relativamente baja solubilización de lípidos polares, en particular a temperatura ambiente. Se humedecieron semillas transformadas y control de *Camelina* (130 g y 30 g, respectivamente) con hexano y se rompieron usando un mortero eléctrico y pestillo de ágata (Retsch Muhle, Alemania). Se transfirieron las mezclas a recipientes de separación y se extrajeron cuatro veces usando un total de 800 mL de hexano, incluyendo una extracción estática durante una noche para la tercera extracción. Para cada extracción, se filtraron los extractos para eliminar las partículas finas a través de filtro de fibra de vidrio de GFC bajo vacío, y luego se evaporaron rotatoriamente a 40°C bajo vacío. Se agruparon los extractos y estos constituyeron los extractos de hexano ricos en TAG.

Después de la extracción con hexano, el resto de la harina de semilla se extrajo adicionalmente usando cloroformo-metanol (CM, 1:1 v/v) usando el procedimiento de

la extracción con hexano. Luego se eliminó la harina por filtración y los extractos combinados se evaporaron por rotación. Luego se disolvieron los extractos lipídicos crudos agrupados de CM total usando una mezcla de una fase de metanol-cloroformo-agua (2:1:0,8 v/v/v). Se separaron las fases por agregado de cloroformo-agua (proporción final de solventes, 1:1:0,9 v/v/v metanol-cloroformo-agua). Se particionó el lípido purificado de cada extracto en la fase inferior de cloroformo, se concentró usando evaporación por rotavapor y estos constituyeron los extractos de CM ricos en lípidos polares. Se determinó por gravimetría el contenido de lípidos en cada uno de estos extractos.

Para el análisis de composición de ácidos grasos, los extractos de hexano y CM se *trans*-metilaron de acuerdo al método de Christie y col. (1982) para producir ésteres de metilo de ácido graso (FAME) usando metanol–cloroformo–ácido clorhídrico concentrado (3 mL, 10:1:1, 80°C, 2 h). Se extrajeron los FAME en hexano - cloroformo (4:1, 3 × 1,8mL). También se transmetilaron las muestras del harina de semilla remanente (entre 1 y 2 g) después de las extracciones con hexano y CM para medir los lípidos residuales como FAME por gravimetría. Se calculó el contenido total de lípidos de las semillas mediante la suma de los contenidos de lípidos de los extractos de hexano y CM y el contenido de FAME de la harina transmetilada después de la extracción con solvente.

Las semillas transgénicas contuvieron lípidos totales levemente inferiores a 36,2% del peso de la semilla en comparación con las semillas de *Camelina sativa* de tipo salvaje a 40,9% de peso de semilla. Para las semillas incluyendo a las semillas aceiteras, se determinaron los lípidos totales como la suma de los lípidos extraíbles por solvente mediante extracciones consecutivas con hexano, luego cloroformo-metanol, más el lípido residual liberado por la transmetilación de la harina extraída después de las extracciones con solvente, como se ejemplifica en la presente. Este

lípido total consistió principalmente en lípidos que contienen ácido graso tales como triacilgliceroles y lípidos polares y pequeñas cantidades de lípidos sin ácidos grasos, por ejemplo fitoesteroles y alcoholes grasos que pueden estar presentes en forma libre no esterificada o esterificada con ácidos grasos. Además, también se incluyeron en el lípido extraíble con solvente los ésteres de esteroles o ésteres de ceras y los hidrocarburos tales como carotenoides, por ejemplo β-caroteno, si estaban presentes. Estos se incluyeron en la determinación gravimétrica global y se indicaron en el análisis por TLC-FID (Tabla 17).

De los lípidos totales, entre 31% y 38% de los lípidos por peso de semilla se extrajeron con hexano, para las semillas transgénicas y control, respectivamente, lo que dio cuenta de 86% y 92% de los lípidos totales en las semillas. La extracción con CM recuperó otro 4,8% y 2,4% (del peso de semilla) mayormente como extracto rico en lípidos polares a partir de las semillas transgénicas y control, respectivamente. El lípido residual que se liberó por la transmetilación del resto de la harina de semilla aceitera extraída con solvente fue de 0,3% y 0,4% del peso de semilla, respectivamente. O sea que, la primera y segunda extracción con solvente extrajeron juntas 99% del contenido total de lípidos de las semillas (o sea de los 36,2% o 40,9% del peso de semilla, lo cual es mayoritariamente lípido que contiene ácidos grasos tales como triglicéridos y lípidos polares que consisten en glico y fosfolípidos (véase la siguiente sección – Análisis de las clases de lípidos)).

Análisis de las clases de lípidos

Se analizaron las clases lipídicas de los extractos de hexano y CM por cromatografía de capa delgada con detección por ionización de llama (TLC-FID; Iatroscan Mark V, Iatron Laboratories, Tokyo, Japón) usando hexano/dietil éter/ácido acético glacial (70:10:0,1, v/v/v) como sistema de solventes de desarrollo en combinación con varillas de sílice y cuarzo Chromarod S-III. Se prepararon curvas de

calibración adecuadas usando estándares representativos obtenidos de Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, MN, EE.UU.). Los datos se procesaron usando el programa SIC-480II (SISC Versión: 7.0-E). Se separaron las especies de fosfolípidos mediante aplicación de la fracción de fosfolípidos purificada que se obtuvo de la cromatografía en columna de sílice y desarrollando las varillas en cloroformo/metanol/ácido acético glacial/agua (85:17:5:2, v/v/v) antes de la detección por FID.

Para separar las fracciones de TAG, glicolípidos y fosfolípidos de los extractos de CM, se usó gel de sílice 60 (de malla entre 100 y 200) (entre 0,3 y 1 g) en una columna de vidrio corta o pipeta Pasteur tapada con lana de vidrio para purificar 10 mg del extracto lipídico de CM purificado. La fracción residual de TAG en el extracto de CM se eluyó usando 20 mL de éter dietílico al 10% en hexano, los glicolípidos se eluyeron con 20 mL de acetona y los fosfolípidos se eluyeron en dos pasos, primero con 10 mL de metanol luego con 10 mL de metanol-cloroformo-agua (5:3:2). Esta segunda elusión incrementó la recuperación de fosfolípidos. Se determinó el rendimiento de cada fracción por gravimetría y se verificó la pureza por TLC-FID. Todos los extractos y fracciones se almacenaron en diclorometano a −20°C hasta su análisis posterior por GC y GC-MS.

Los extractos de hexano ricos en TAG de cada una se las semillas transgénicas y control contuvieron aproximadamente 96% de TAG. Los extractos de CM contuvieron cantidades residuales de TAG de 44% y 13% en peso de los extractos de CM, respectivamente, para las semillas transgénicas y de tipo salvaje. Contrariamente a los extractos de hexano, los extractos de CM fueron ricos en lípidos polares, a saber, fosfolípidos y glicolípidos, con una cantidad de 50% y 76% en peso de los extractos de CM, respectivamente, para las semillas transgénicas y control (Tabla 17). El fosfolípido principal fue la fosfatidilcolina (PC) y con una cantidad de entre 70% y 79% de los fosfolípidos totales seguida por la fosfatidiletanolamina (PE,

entre 7% y 13%) con niveles relativamente bajos de ácido fosfatídico (PA, entre 2% y 5%) y fosfatidilserina (PS, <2%).

Composición de ácidos grasos

En general, para las semillas que producen DHA y/o DPA, los inventores observaron que la composición de ácidos grasos de los lípidos totales en las semillas, determinado por transmetilación directa de todos los lípidos en la semilla, fue similar a la de la fracción de TAG. Esto fue porque más del 90% de los lípidos totales presentes en la semilla estaban en la forma de TAG.

La composición de ácidos grasos de las diferentes clases de lípidos en los extractos de hexano y CM se determinó por análisis por cromatografía gaseosa (GC) y GC-MS usando un instrumento Agilent Technologies 6890A GC (Palo Alto, CA, EE.UU.) provisto con una columna capilar de sílice fundida Supelco Equity™-1 (15 m × 0,1 mm de i.d., 0,1 µm de espesor de película, Bellefont, PA, EE.UU.), un FID, un inyector con divisor/sin divisor y un automuestreador e inyector Agilent Technologies 7683B Series. El gas transportador fue Helio. Se inyectaron las muestras en modo sin divisor a una temperatura de horno de 120°C. Después de la inyección, la temperatura de horno se elevó a 270°C a 10°C min^{-1} y finalmente a 300°C a 5°C min^{-1}. Los compuestos eluidos se cuantificaron con el programa Agilent Technologies ChemStation (Palo Alto, CA, EE.UU.). Los resultados de GC contuvieron a un error de más de ±5% de las áreas de los componentes individuales.

Tabla 17. Composición de las clases lipídicas (% de los lípidos totales que se obtuvieron para cada paso de extracción) de los extractos de hexano y CM a partir de semillas transgénicas y control de *Camelina sativa*. SE, WE y HC no se separaron entre sí.

Clase de lípido	**Semillas transgénicas**		**Semillas control**	
	Hexano	**CM**	**Hexano**	**CM**

SE/WE/HC*	1,0	1,4	1,0	1,4
TAG	95,6	44,2	96,0	13,1
FFA	0,9	1,3	0,8	1,4
UN**	0,9	1,1	0,8	1,2
ST	0,5	0,7	0,4	0,4
MAG	0,7	1,1	0,8	6,2
PL	0,3	50,3	0,3	76,3
Total	100,0	100,0	100,0	100,0

Abreviaturas: ésteres de esterol (SE), ésteres de cera (WE). Hidrocarburos (HC), triacilgliceroles (TAG), ácidos grasos libres (FFA), desconocido (UN), esteroles (ST), monoacilgliceroles (MAG), lípidos polares (PL) que consisten en glicolípidos y fosfolípidos; * SE, WE y HC coeluyen con el uso de ese sistema; ** Pueden contener alcoholes grasos y diacilgliceroles (DAG).

Se llevaron a cabo análisis por GC-espectrometría de masa (GC-MS) rn un Finnigan Trace ultra Quadrupole GC-MS (modelo: ThermoQuest Trace DSQ, Thermo Electron Corporation). Los datos se procesaron con el programa ThermoQuest Xcalibur (Austin, TX, EE.UU.). El GC tuvo un inyector en columna y una columna capilar HP-5 Ultra Agilient J & W (50m × 0,32mm de i.d., 0,17 µm de espesor de película, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) de polaridad similar a la que se describió previamente. Se identificaron los componentes individuales usando datos espectrales de masa y por comparación de los datos de tiempo de retención con los que se obtuvieron por estándares auténticos y de laboratorio. Se llevó a cabo un análisis por blanco de procedimiento completo concurrentemente con el lote de muestras.

Los datos para la composición de ácidos grasos en las diferentes clases de lípidos en los extractos se muestran en la Tabla 18. En las semillas de *Camelina* que

producen DHA, el DHA se distribuyó en las fracciones lipídicas mayoritarias (TAG, fosfolípidos y glicolípidos) en una proporción en el rango entre 1,6% y 6,8% con una relación inversa entre las proporciones de DHA y ALA. El extracto de hexano rico en TAG de las semillas transgénicas contuvo 6,8% de DHA y 41% de ALA (Tabla 18). El extracto de CM rico en lípidos polares contuvo 4,2% de DHA y 50% de ALA o sea relativamente menor DHA y más ALA. Los TAG residuales del extracto de CM rico en lípidos polares contuvo 6% de DHA y 40% de ALA. La fracción de glicolípidos aislada del extracto de CM contuvo 3% de DHA y 39% de ALA y la fracción de fosfolípidos contuvo el menor nivel de DHA (1,6%) y los mayores niveles de ALA (54%). Las semillas transgénicas de *Camelina* contuvieron mayores niveles de ALA y menores niveles de LA (ácido linoleico, 18:2ω6) en comparación con las semillas control en las clases mayoritarias de lípidos (TAG, glicolípidos y fosfolípidos). Las proporciones de ALA y LA fueron: ALA entre 39% y 54% y LA entre 4% y 9% para las semillas transgénicas y ALA entre 12% y 32% y LA entre 20% y 29% para las semillas control. El nivel relativo de ácido erúcico (22:1ω9) fue menor en todas las fracciones en las semillas transgénicas que en las semillas control, por ejemplo, en los extractos de hexano 1,3% versus 2,7% (Tabla 18).

Composición de esteroles en las semillas

Para determinar el contenido de esteroles y la composición en los lípidos extraídos, se saponificaron muestras de aproximadamente 10 mg de lípidos totales del extracto de hexano rico en TAG y el extracto de CM rico en lípidos polares usando 4 mL de KOH al 5% en MeOH al 80% y se calentaron durante 2 h a 80°C en un tubo de prueba con tapa a rosca forrada de Teflón. Después de enfriar las mezclas de reacción, se agregaron 2 mL de agua Milli-Q y se extrajeron los esteroles y los alcoholes tres veces en 2 mL de hexano:diclorometano (4:1, v/v) por agitación y vórtex. Se centrifugaron las mezclas y se lavó cada extracto en la fase orgánica con 2

mL de agua Milli-Q por agitación y centrifugación. Después de separar la fase orgánica superior que contiene esterol, se evaporó el solvente usando una corriente de nitrógeno gaseoso y se sililaron los esteroles y los alcoholes usando 200 µL de Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA, Sigma-Aldrich) calentando durante 2 h a 80°C en un vial de GC sellado. Mediante este método, los grupos hidroxilo libres se convirtieron a sus ésteres de trimetilsililo. Se secaron los derivados de OTMSi de esterol y alcohol bajo una corriente de nitrógeno gaseoso en un bloque de calentamiento (40°C) y se redisolvieron en diclorometano (DCM) inmediatamente antes del análisis por GC/GC-MS como se describió previamente.

Tabla 18. Composición de ácidos grasos (% de los ácidos grasos totales) de extractos lipídicos y fracciones de semillas transgénicas y control de *C. sativa*.

Semillas transgénicas							**Semillas control**					
Ácido	**Hexano**	**CM**				**Harina**	**Hexano**	**CM**				**Harina**
	TAG	**Total**	**TAG**	**GL**	**PL**	**Residuo**	**TAG**	**Total**	**TAG**	**GL**	**PL**	**Residuo**
16:1ω7	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	-	-	0,3
16:0	6,2	12,8	6,8	21,3	19,4	10,4	6,7	12,8	7,8	29,6	13,7	10,3
18:4ω3	3,7	3,3	3,4	2,1	2,9	3,6	-	-	-	-	-	-
18:2ω6	7,1	3,9	8,8	7,2	3,7	8,8	22,2	28,4	29,4	20,8	29,3	27,9
18:3ω3	41,9	50,3	39,9	38,6	54,1	38,9	32,0	20,6	19,7	13,0	12,3	20,0
18:1ω9	11,1	4,7	9,6	7,2	2,8	8,1	14,0	25,4	13,3	14,7	35,7	14,3
18:1ω7	1,4	2,3	2,1	3,7	3,4	2,8	1,0	1,5	2,2	4,0	2,8	2,2

18:0	3,2	4,0	3,0	4,5	5,7	3,1	3,0	2,7	2,9	5,7	3,6	2,7
20:5ω3	0,4	0,2	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
20:4ω3	0,4	0,4	0,4	-	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-
20:2ω6	0,7	0,7	0,8	0,6	0,4	0,7	1,8	0,8	2,1	1,2	-	1,8
20:3ω3	0,8	1,2	0,9	0,6	1,3	0,5	0,9	0,3	-	-	-	0,4
20:1ω9/1	11,6	6,1	10,9	5,1	1,3	8,4	12,5	3,0	11,1	4,2	1,7	9,4
20:1ω7	0,6	0,8	1,4	0,6	0,2	1,1	0,6	0,6	2,0	1,3	-	1,8
20:0	1,3	0,8	1,4	0,6	0,1	1,4	1,5	0,7	2,0	1,4	-	1,8
22:6ω3	6,8	4,2	6,1	3,0	1,6	5,4	-	-	-	-	-	-
22:5ω3	0,3	1,1	0,4	0,6	1,4	0,3	-	-	-	-	-	-
22:1ω9	1,3	1,0	1,8	0,6	0,1	1,5	2,7	0,7	3,6	0,9	-	2,9
22:0	0,3	0,2	0,3	0,6	0,1	0,7	0,3	0,2	0,7	0,8	-	0,8

24:1ω9	0,3	0,4	0,4	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,7	0,9	0,5	1,0
24:0	0,1	0,4	0,2	0,9	0,4	1,1	0,1	0,4	0,5	1,4	0,4	1,3
otros *	0,4	1,0	1,0	1,4	0,5	1,8	0,3	1,1	0,9	0,1	-	1,1
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Abreviaturas: triacilgliceroles (TAG), glicolípidos (GL), fosfolípidos (PL); Total: extracto rico en lípidos polares que contienen GL y PL de extracción con CM; se separaron los TAG, GL y PL por cromatografía en columna de sílice de los extractos de CM; * Suma de ácidos grasos minoritarios

Los esteroles mayoritarios tanto en las semillas transgénicas y control fueron 24-etilcolesterol (sitosterol, entre 43% y 54% de los esteroles totales), 24-metilcolesterol (campesterol, entre 20% y 26%) con menores niveles de colesterol (entre 5% y 8%), brasicasterol (entre 2% y 7%), isofucosterol (Δ5-avenasterol, entre 4% y 6%), estigmasterol (entre 0,5% y 3%), colest-7-en-3β-ol, (entre 0,2% y 0,5%), 24-metilcolestanol (campestanol, entre 0,4% y 1%) y 24-dehidrocolesterol (entre 0,5% y 2%) (Tabla 19). Estos nueve esteroles constituyeron entre 86% y 95% de los esteroles totales, en donde los componentes restantes fueron esteroles solo identificados parcialmente por los números de carbonos y dobles enlaces. Los perfiles de esteroles globales fueron similares entre las semillas transgénicas y las controles para los extractos tanto de hexano como CM.

Análisis de alcoholes grasos

Los alcoholes grasos de los extractos se derivatizaron y se analizaron como para los esteroles. Se identificó una serie de alcoholes grasos a partir de C_{16}–C_{22}, con alcoholes grasos acompañantes isoramificados, tanto en los extractos de hexano hexano como de CM. Se observaron perfiles similares para las semillas transgénicas y semillas controles, con alguna variación de las proporciones de los componentes individuales observados. El fitol, derivado de la clorofila, fue el alcohol alifático mayoritario y constituyó el 47% y el 37% de los alcoholes grasos totales en las fracciones de hexano en las semillas transgénicas y controles, respectivamente. Los alcoholes de cadena impar estuvieron presentes en mayores niveles en el extracto de CM (entre 37% y 38% del contenido total de alcoholes grasos) en comparación con el extracto de hexano (entre 16% y 23%). El iso-17:0 (entre 16% y 38%) predominó por sobre el 17:0 (entre 0,3% y 5,7%). Otro alcohol de cadena impar presente fue el 19:0 (entre 4,5% y 6,5%). Otros alcoholes detectados incluyeron a iso-16:0, 16:0, iso-18:0, 18:1, 18:0, con menores niveles de iso-20:0, 20:1, 20:0, iso-22:0, 22:1 y 22:0 también

presentes.

Discusión

Los resultados indicaron que la ruptura con el uso de un mortero y pestillo motorizado con múltiples extracciones con hexano a temperatura ambiente fue eficaz para recuperar la mayor parte del aceite que contiene TAG de las semillas transgénicas. Además del aceite de las semillas transgénicas que contienen moderados niveles de DHA, las semillas transgénicas también tuvieron niveles marcadamente mayores de ALA en las clases mayoritarias de lípidos (triacilgliceroles, glicolípidos y fosfolípidos) en comparación con las semillas controles. Esto demostró que la actividad de Δ15-desaturasa estuvo considerablemente aumentada en las semillas transgénicas durante el desarrollo de la semilla. Interesantemente, hubo algunas leves diferencias en la composición de ácidos grasos y la proporción de DHA en los diversos extractos y fracciones con los niveles de DHA siendo mayores en el extracto de hexano rico en TAG y TAG de la extracción con CM (entre 6% y 6,8%) y menores en las fracciones de lípidos polares (3% en los glicolípidos y 1,6% en los fosfolípidos). El nivel de 16:0 fue mayor en las fracciones de lípidos polares de glicolípidos y fosfolípidos en los extractos de CM (entre 19% y 21%) en comparación con el extracto de hexano rico en TAG y TAG de la extracción con CM (entre 6% y 7%).

Tabla 19. Composición de esteroles (% de esteroles totales) de semillas transgénicas y control de *Camelina*.

	Semillas transgénicas		**Semillas control**	
Esteroles	**Hexano**	**CM**	**Hexano**	**CM**
24-dehidrocolesterol	0,8	1,8	0,5	1,4

Colesterol	5,7	7,6	4,7	7,2
brasicasterol	4,4	6,5	1,9	4,2
colest-7-en-3β-ol	0,2	0,5	0,3	0,4
campesterol	24,5	20,8	25,7	21,7
campestanol	0,4	1,1	0,4	0,9
estigmasterol	1,0	2,6	0,5	1,6
sitosterol	54,3	43,7	53,8	42,9
Δ5-avenasterol	4,2	5,2	4,7	5,5
Suma	95,5	89,6	92,6	85,9
Otros				
UN1 C28 1db	0,6	1,2	0,7	1,2
UN2 C29 1db	1,2	2,0	1,2	2,4
UN3 C29 2db	0,9	1,8	1,3	2,4
UN4 C28 1db	0,3	0,9	0,6	1,1
UN5 C30 2db	1,2	1,8	1,4	1,8
UN6 C29 1db + C30 2db	0,3	2,7	2,2	5,2
Suma de otros	4,5	10,4	7,4	14,1
Total	100	100	100	100

Abreviaturas: UN designa a un esterol desconocido, el número después de la C indica el número de átomos de carbono y db designa al número de enlaces dobles

La composición de esteroles de las semillas transgénicas y semillas control fue similar al que se halló en aceite refinado de Camelina (Shukla y col., 2002) con los

mismos esteroles mayoritarios presentes, lo que indica que los genes agregados no afectaron la síntesis de esteroles en las semillas. El nivel de colesterol en el aceite de Camelina fue mayor que el de la mayoría de los aceites vegetales. Hubo presente brasicasterol, el cual es un esterol característico que se halla en la familia Brassicaceae que incluye a *Camelina sativa*.

Ejemplo 9. Producción de LC-PUFA en semillas de *Brassica juncea*

Se produjeron plantas transgénicas de *Brassica juncea* usando la construcción GA7-modB (Ejemplo 4) para la producción of DHA, como sigue. Se esterilizaron semillas de *B. juncea* de una variedad sensible a la longitud del día usando cloro gaseoso como se describe en Kereszt y col. (2007). Las semillas esterilizadas se germinaron en medio MS de fuerza 1/2 (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con 0,8% de agar, ajustando el pH a 5,8 y se crecieron a 24°C bajo luz fluorescente (50 $\mu E/m^2s$) con un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) entre 6 y 7 días. Se aislaron los pecíolos de cotiledón con entre 2 y 4 mm de caña en forma aséptica a partir de estas plántulas y se usaron como explantes. Se transformó a *Agrobacterium tumefaciens* de cepa AGL1 con la construcción binaria GA7. Se inició el cultivo de *Agrobacterium* y se procesó para infección como se describe en Belide y col. (2013). Para todas las transformaciones, se infectaron aproximadamente 50 pecíolos de cotiledón recién aislados con 10 ml de cultivo de *A. tumefaciens* durante 6 minutos. Los pecíolos infectados se transfirieron a papel de filtro estéril para eliminar el exceso de *A. tumefaciens* y se transfirieron a medio de cocultivo (MS con 1,5 mg/L de BA, 0,01 mg/L de NAA y 100 µM de acetosiringona, también suplementado con L-cisteína (50 mg/L), ácido ascórbico (15 mg/L) y MES (250 mg/L). Se sellaron todas las placas con cinta microporosa y se incubaron en oscuridad a 24°C durante 48 horas de cocultivo. Luego se transfirieron los explantes a medio de preselección (MS-agar con 1,5 mg/L de BA, 0,01 mg/L de NAA, 3 mg/L de $AgNO_3$, 250 mg/L de cefotaxima y 50

mg/L de timentina) y se cultivaron entre 4 y 5 días a 24°C con un fotoperiodo de 16/8 horas antes de transferir los explantes a medio de selección (MS-agar con 1,5 mg/L de BA, 0,01 mg/L de NAA, 3 mg/L de $AgNO_3$, 250 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de timentina y 5 mg/L de PPT) y se cultivaron durante 4 semanas a 24°C con un fotoperiodo de 16/8 horas. Se transfirieron los explantes con callos verdes a medio de regeneración de brotes (MS-agar con 2,0 mg/L de BA, 3 mg/L de $AgNO_3$, 250 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de timentina y 5 mg/L de PPT) y se cultivaron por otras 2 semanas. Los bulbos de brotes pequeños en regeneración se transfirieron a medio MS libre de hormonas (MS-agar con 3 mg/L de $AgNO_3$, 250 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de timentina y 5 mg/L de PPT) y se cultivaron por otras 2 a 3 semanas.

Se aislaron los brotes transgénicos potenciales de por lo menos 1,5 cm de tamaño y se transfirieron a medio de inducción de raíz (MS-agar con 0,5 mg/L de NAA, 3 mg/L de $AgNO_3$, 250 mg/L de cefotaxima y 50 mg/L de timentina) y se cultivaron entre 2 y 3 semanas. Los brotes transgénicos confirmados por PCR y con raíces prolíficas se transfirieron a suelo en un invernadero y se crecieron bajo un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a 22°C. Se obtuvieron tres plantas transgénicas confirmadas. Las plantas transformadas se crecieron en el invernadero, se dejaron autofertilizar, y se cosecharon las semillas T1. Se analizó la composición de ácidos grasos del lípido de agrupamientos de semillas T1 de cada planta transformada T0, las que mostraron la presencia de 2,8% de DPA y 7,2% de DHA en una línea designada como JT1-4, mientras que otra línea designada como JT1-6 exhibió 2,6% de DPA.

Se analizó el aceite de semilla de semillas T1 individuales para composición de ácidos grasos; algunos de los datos se muestran en la Tabla 20. Varias semillas T1 produjeron DHA a un nivel de entre 10% y aproximadamente 21% del contenido total de ácidos grasos, incluyendo a JT1-4-A-13, JT1-4-A -5, y JT1-4-B-13. Sorprendentemente e inesperadamente, algunas de las semillas T1 contuvieron DPA a

niveles de entre 10% y aproximadamente 18% del contenido total de ácidos grasos y sin DHA detectable (< 0,1%). Una explicación posible para estas semillas es que el gen de la Δ4-desaturasa en el ADN-T que se insertó en estas plantas estaba inactivo, tal vez por una mutación espontanea. Se germinaron las semillas T1 y una vez aparecidos, se analizaron los cotiledones de cada una para composición de ácidos grasos en el aceite remanente. El resto de cada plántula se mantuvo y se creció hasta madurez para proveer semillas T2.

Las plantas transgénicas que eran homocigotas para inserciones individuales de ADN-T se identificaron y seleccionaron. Las plantas de una línea seleccionada designada como JT1-4-17 tuvieron una inserción individual de ADN-T y produjeron DHA solo con bajos niveles de DPA, mientras que las de una segunda línea seleccionada designada como JT1-4-34 también tuvieron una inserción individual del ADN-T pero produjeron DPA sin producir DHA. Los inventores concluyeron que el transformante original contuvo dos ADN-T separados, uno de los cuales confirió producción de DHA y el otro confirió producción de DPA sin DHA. Las plantas *B. juncea* que producen DHA en sus semillas se cruzaron con las plantas que producen DPA en sus semillas. La progenie F1 incluyó plantas que eran heterocigotas para ambas inserciones del ADN-T. Se observó que las semillas de estas plantas de la progenie producían aproximadamente 20% de DHA y aproximadamente 6% de DPA, para un contenido total de DHA + DPA de 26%. Las plantas F1 se autofertilizan y se espera que la progenie que es homocigota para ambas inserciones de ADN-T produzca hasta 35% de DHA y DPA.

Se observó aproximadamente un 18% de DPA en el lípido de las semillas agrupadas de la progenie T3 designada como JT1-4-34-11. De forma similar, se observó aproximadamente un 17,5% de DHA en el lípido de las semillas agrupadas de la progenie de T3 JT1-4-17-20. Las composiciones de ácidos grasos de las semillas

T1 agrupadas de JT1-4, semillas T1 individuales, semillas T2 agrupadas, semillas T2 individuales, y semillas T3 agrupadas, semillas T3 individuales están en las Tablas 21 a 24. El segregante T3 de JT1-4, JT-1-4-34-11, tuvo un contenido de DPA de las semillas T3 agrupadas de 18% y las semillas individuales de este segregante particular tuvieron un contenido de DPA de aproximadamente 26%, cada uno como porcentaje del contenido total de ácidos grasos.

Se calcularon los siguientes parámetros para el aceite de una semilla con 17,9% de DPA: ácidos grasos saturados totales, 6,8%; ácidos grasos monoinsaturados totales, 36,7%; ácidos grasos poliinsaturados totales, 56,6%, ácidos grasos totales ω6, 7,1%; nuevos ácidos grasos ω6, 0,4% de los cuales todos fueron GLA; ácidos grasos totales ω3, 46,5%; nuevos ácidos grasos ω3, 24,0%; proporción de ácidos grasos totales ω6: totales ω3, 6,5; proporción de nuevos ácidos grasos ω6: nuevos ω3, 60; eficacia de conversión de ácido oleico a LA por Δ12-desaturasa, 61%; eficacia de conversión de ALA a SDA por parte de la Δ6-desaturasa, 51%; eficacia de conversión de SDA a ácido ETA por parte de la Δ6-elongasa, 90%; eficacia de conversión de ETA a EPA por parte de la Δ5-desaturasa, 87%; eficacia de conversión de EPA a DPA por parte de la Δ5-elongasa, 98%.

Con el objetivo de producir más plantas transgénicas en *B. juncea* con la construcción modB, se repitió la transformación cinco veces y se regeneraron 35 brotes/plántulas transgénicas presuntas. Se lleva a cabo el análisis de semillas T1 para determinar el contenido de DPA y DHA.

Con el objetivo de producir más semillas con DPA y sin DHA, se eliminó en gen de la Δ4-desaturasa de la construcción modB y se usó la construcción resultante para transformar a *B. juncea* y *B. napus*. Se producen semillas de progenie con hasta 35% de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido de semilla.

Cuando se examinó por RMN el aceite extraído de las semillas de una planta

que produce DHA, se observó que por lo menos el 95% del DHA estaba presente en la posición *sn*-1,3 de las moléculas de TAG.

Tabla 20. Composición de ácidos grasos de aceite de semilla de semillas T1 de *B. juncea* transformadas con el ADN-T de GA7.

semilla T1 No,	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
JT1-4-A-1	5,0	0,2	2,7	23,5	3,4	17,0	0,7	24,8	0,7	2,0	1,1	0,2	0,8	4,0	0,6	2,4	9,9
JT1-4-A-2	4,3	0,3	2,6	37,2	3,2	11,0	0,3	22,1	0,7	0,9	1,3	0,2	1,4	3,2	0,3	9,4	0,0
JT1-4-A-3	5,6	0,3	2,7	20,8	3,7	16,0	0,6	24,4	0,7	2,0	0,9	0,2	1,1	4,5	0,7	3,1	11,4
JT1-4-A-4	4,6	0,4	2,8	36,2	3,4	10,6	0,3	24,5	0,8	9,9	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	2,5	0,0
JT1-4-A-5	5,0	0,2	3,2	20,3	3,6	13,7	0,7	25,9	0,7	2,0	0,9	0,2	1,3	4,4	1,5	1,6	13,5
JT1-4-A-6	4,8	0,4	3,4	37,9	3,7	7,4	0,4	19,9	0,9	1,4	1,4	0,1	0,8	1,9	0,4	13,9	0,0
JT1-4-A-7	5,6	0,3	3,0	26,2	4,0	8,9	0,3	26,6	0,6	1,8	1,0	0,1	1,8	3,7	1,3	2,2	11,3
JT1-4-A-8	4,8	0,4	2,9	40,3	3,4	7,8	0,3	22,2	0,8	1,4	1,3	0,1	0,8	2,4	0,4	9,6	0,0
JT1-4-A-9	7,1	0,3	3,6	17,7	4,3	17,9	0,7	23,1	1,0	2,1	0,8	0,2	1,5	3,6	0,8	2,0	11,9
JT1-4-A-10	5,1	0,2	4,2	22,3	3,4	19,5	0,7	21,7	0,8	1,5	0,9	0,2	1,7	7,8	0,9	1,0	6,5
JT1-4-A-11	5,0	0,5	2,8	37,6	4,0	7,1	0,4	19,2	0,7	1,9	1,4	0,2	0,5	1,6	0,3	15,5	0,0

JT1-4-A-12	5,2	0,3	3,0	28,2	4,0	9,2	0,3	27,4	0,6	1,9	0,9	0,1	1,5	3,2	1,1	1,8	10,2
JT1-4-A-13	5,4	0,2	3,0	16,7	4,1	9,9	0,6	29,9	0,7	2,2	1,0	0,2	1,7	2,0	1,1	2,0	17,9
JT1-4-A-14	5,1	0,4	3,1	30,0	4,0	11,5	0,3	27,7	0,7	2,2	1,0	0,1	0,6	2,4	0,8	1,3	7,8
JT1-4-A-15	5,1	0,4	2,5	34,2	3,6	6,9	0,6	20,4	0,7	1,6	1,1	0,2	0,6	4,7	0,9	15,2	0,0
JT1-4-B-1	5,5	0,2	2,7	18,9	4,0	17,6	0,8	24,1	0,8	2,2	1,0	0,2	1,2	4,6	0,9	2,2	11,5
JT1-4-B-2	5,5	0,2	2,7	20,2	4,0	14,3	0,5	25,5	0,7	1,7	0,9	0,2	1,6	8,7	1,3	2,2	8,5
JT1-4-B-3	5,3	0,3	3,6	34,1	3,5	35,0	0,6	9,3	0,8	0,2	1,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,3	2,1
JT1-4-B-4	5,3	0,3	3,1	25,2	3,6	17,0	0,7	24,1	0,7	1,9	1,0	0,2	0,8	4,3	0,5	2,3	7,8
JT1-4-B-5	5,5	0,5	2,2	30,1	4,6	10,2	0,5	21,7	0,6	1,4	1,1	0,2	0,9	2,4	0,5	16,1	0,0
JT1-4-B-6	5,6	0,3	2,5	19,5	3,8	15,2	0,5	27,7	0,6	2,1	0,9	0,2	1,1	3,7	0,6	3,3	11,1
JT1-4-B-7	5,9	0,5	2,0	29,9	4,0	11,2	0,3	26,2	0,6	11,5	1,4	0,2	0,3	0,4	0,0	4,1	0,1
JT1-4-B-8	6,2	0,5	1,9	33,1	4,0	30,0	0,5	12,7	0,6	0,3	1,3	0,4	1,4	0,9	0,1	4,4	0,0
JT1-4-B-9	4,9	0,2	3,4	24,6	3,0	18,5	0,3	26,2	0,8	1,3	1,1	0,2	2,0	5,5	0,6	0,8	5,2
JT1-4-B-10	5,2	0,3	2,7	19,0	4,0	12,0	0,6	30,5	0,7	1,6	1,0	0,2	1,7	4,9	1,1	3,0	10,2
JT1-4-B-11	4,8	0,2	3,0	23,7	3,1	18,1	0,6	23,5	0,7	1,6	1,2	0,2	1,5	4,5	0,8	1,6	9,6

JT1-4-B-12	5,0	0,2	2,6	19,6	3,4	12,5	0,6	26,9	0,8	3,1	1,1	0,2	0,9	5,6	0,9	3,5	11,7
JT1-4-B-13	5,6	0,3	2,8	20,9	3,9	11,9	0,4	27,0	0,7	2,0	1,0	0,2	1,7	2,3	0,7	4,1	13,5
JT1-4-B-14	5,1	0,3	3,1	25,5	3,3	16,7	0,7	23,9	0,8	1,8	1,2	0,2	0,9	2,6	0,4	2,9	9,2
JT1-4-B-15	5,6	0,3	2,7	19,5	4,1	14,0	0,8	24,6	0,7	2,7	0,9	0,2	0,7	9,4	1,3	2,5	8,5

El aceite de las muestras de semilla también contuvo 0,1% de C14:0; entre 0,1 y 0,2% de C16:3; entre 0,0 y 0,1% de cada uno de C20:1Δ13, C20:3ω6 y C20:4ω6; entre 0,3 y 0,4% de C22:0; nada de C22:1 y C22:2ω6; 0,2% de C24:0 y entre 0,2 y 0,4% de C24:1.

Tabla 21. Composición de ácidos grasos de lípidos de semillas T1 (agrupadas) de *B. juncea* transformada con el ADN-T de GA7-modB. Los lípidos también contuvieron aproximadamente 0,1% de cada uno de 14:0, 16:3, 20:1d13, y no se detectaron 16:2, 22:1.

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT1-2	4,2	0,3	2,5	42,4	3,2	27,7	0,1	16,4	0,6	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-3	4,5	0,3	2,7	44,6	3,1	26,8	0,1	14,8	0,7	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-4	5,1	0,3	3,2	26,8	3,5	17,4	0,5	22,8	0,7	2,5	1,1	0,2	0,0	0,0	1,2	0,3	2,9	0,7	0,0	0,1	0,2	0,3	**2,8**	**7,2**
JT1-5	4,7	0,4	2,4	41,6	3,4	28,4	0,1	15,8	0,7	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0
JT1-6	4,8	0,4	2,3	37,3	3,3	30,2	0,4	13,2	0,7	0,2	1,4	0,3	0,0	0,0	0,7	0,3	0,6	0,1	0,0	0,3	0,2	0,5	**2,6**	0,0

Tabla 22. Composición de ácidos grasos de aceite de semilla de semillas T1 (individuales) de *B. juncea* transformada con el ADN-T de GA7-modB.

semilla T1 No,	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
JT1-4-A-1	5,0	0,2	2,7	23,5	3,4	17,0	0,7	24,8	0,7	2,0	1,1	0,2	0,8	4,0	0,6	2,4	9,9
JT1-4-A-2	4,3	0,3	2,6	37,2	3,2	11,0	0,3	22,1	0,7	0,9	1,3	0,2	1,4	3,2	0,3	9,4	0,0
JT1-4-A-3	5,6	0,3	2,7	20,8	3,7	16,0	0,6	24,4	0,7	2,0	0,9	0,2	1,1	4,5	0,7	3,1	11,4
JT1-4-A-4	4,6	0,4	2,8	36,2	3,4	10,6	0,3	24,5	0,8	9,9	1,7	0,2	0,3	0,5	0,0	2,5	0,0
JT1-4-A-5	5,0	0,2	3,2	20,3	3,6	13,7	0,7	25,9	0,7	2,0	0,9	0,2	1,3	4,4	1,5	1,6	13,5
JT1-4-A-6	4,8	0,4	3,4	37,9	3,7	7,4	0,4	19,9	0,9	1,4	1,4	0,1	0,8	1,9	0,4	13,9	0,0
JT1-4-A-7	5,6	0,3	3,0	26,2	4,0	8,9	0,3	26,6	0,6	1,8	1,0	0,1	1,8	3,7	1,3	2,2	11,3
JT1-4-A-8	4,8	0,4	2,9	40,3	3,4	7,8	0,3	22,2	0,8	1,4	1,3	0,1	0,8	2,4	0,4	9,6	0,0
JT1-4-A-9	7,1	0,3	3,6	17,7	4,3	17,9	0,7	23,1	1,0	2,1	0,8	0,2	1,5	3,6	0,8	2,0	11,9
JT1-4-A-10	5,1	0,2	4,2	22,3	3,4	19,5	0,7	21,7	0,8	1,5	0,9	0,2	1,7	7,8	0,9	1,0	6,5
JT1-4-A-11	5,0	0,5	2,8	37,6	4,0	7,1	0,4	19,2	0,7	1,9	1,4	0,2	0,5	1,6	0,3	15,5	0,0
JT1-4-A-12	5,2	0,3	3,0	28,2	4,0	9,2	0,3	27,4	0,6	1,9	0,9	0,1	1,5	3,2	1,1	1,8	10,2

JT1-4-A-13	5,4	0,2	3,0	16,7	4,1	9,9	0,6	29,9	0,7	2,2	1,0	0,2	1,7	2,0	1,1	2,0	17,9
JT1-4-A-14	5,1	0,4	3,1	30,0	4,0	11,5	0,3	27,7	0,7	2,2	1,0	0,1	0,6	2,4	0,8	1,3	7,8
JT1-4-A-15	5,1	0,4	2,5	34,2	3,6	6,9	0,6	20,4	0,7	1,6	1,1	0,2	0,6	4,7	0,9	15,2	0,0
JT1-4-B-1	5,5	0,2	2,7	18,9	4,0	17,6	0,8	24,1	0,8	2,2	1,0	0,2	1,2	4,6	0,9	2,2	11,5
JT1-4-B-2	5,5	0,2	2,7	20,2	4,0	14,3	0,5	25,5	0,7	1,7	0,9	0,2	1,6	8,7	1,3	2,2	8,5
JT1-4-B-3	5,3	0,3	3,6	34,1	3,5	35,0	0,6	9,3	0,8	0,2	1,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,3	2,1
JT1-4-B-4	5,3	0,3	3,1	25,2	3,6	17,0	0,7	24,1	0,7	1,9	1,0	0,2	0,8	4,3	0,5	2,3	7,8
JT1-4-B-5	5,5	0,5	2,2	30,1	4,6	10,2	0,5	21,7	0,6	1,4	1,1	0,2	0,9	2,4	0,5	16,1	0,0
JT1-4-B-6	5,6	0,3	2,5	19,5	3,8	15,2	0,5	27,7	0,6	2,1	0,9	0,2	1,1	3,7	0,6	3,3	11,1
JT1-4-B-7	5,9	0,5	2,0	29,9	4,0	11,2	0,3	26,2	0,6	11,5	1,4	0,2	0,3	0,4	0,0	4,1	0,1
JT1-4-B-8	6,2	0,5	1,9	33,1	4,0	30,0	0,5	12,7	0,6	0,3	1,3	0,4	1,4	0,9	0,1	4,4	0,0
JT1-4-B-9	4,9	0,2	3,4	24,6	3,0	18,5	0,3	26,2	0,8	1,3	1,1	0,2	2,0	5,5	0,6	0,8	5,2
JT1-4-B-10	5,2	0,3	2,7	19,0	4,0	12,0	0,6	30,5	0,7	1,6	1,0	0,2	1,7	4,9	1,1	3,0	10,2
JT1-4-B-11	4,8	0,2	3,0	23,7	3,1	18,1	0,6	23,5	0,7	1,6	1,2	0,2	1,5	4,5	0,8	1,6	9,6
JT1-4-B-12	5,0	0,2	2,6	19,6	3,4	12,5	0,6	26,9	0,8	3,1	1,1	0,2	0,9	5,6	0,9	3,5	11,7

JT1-4-B-13	5,6	0,3	2,8	20,9	3,9	11,9	0,4	27,0	0,7	2,0	1,0	0,2	1,7	2,3	0,7	4,1	13,5
JT1-4-B-14	5,1	0,3	3,1	25,5	3,3	16,7	0,7	23,9	0,8	1,8	1,2	0,2	0,9	2,6	0,4	2,9	9,2
JT1-4-B-15	5,6	0,3	2,7	19,5	4,1	14,0	0,8	24,6	0,7	2,7	0,9	0,2	0,7	9,4	1,3	2,5	8,5

El aceite de las muestras de semilla también contuvo 0,1% de C14:0; entre 0,1 y 0,2% de C16:3; entre 0,0 y 0,1% de cada uno de C20:1Δ13, C20:3ω6 y C20:4ω6; entre 0,3 y 0,4% de C22:0; nada de C22:1 y C22:2ω6; 0,2% de C24:0 y entre 0,2 y 0,4% de C24:1.

Tabla 23. Composición de ácidos grasos de aceite de semilla de semillas T2 individuales de *B. juncea* transformada con el ADN-T de GA7-modB.

Código	C16:0	16:1d9	16:3	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	C22:3n3	C24:0	22:5n6	22:4n3?	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT-1-4-19	4,4	0,3	0,2	1,7	36,3	2,9	8,3	0,5	22,0	0,5	**1,4**	1,2	0,1	0,0	0,0	0,4	0,3	**4,2**	**0,6**	0,0	0,1	0,1	0,0	1,8	0,3	**12,1**	0,0
JT-1-4-19	5,6	0,4	0,1	1,9	39,1	3,1	8,4	0,4	18,9	0,6	**1,2**	1,3	0,1	0,0	0,0	0,5	0,3	**2,5**	**0,4**	0,0	0,1	0,2	0,0	1,5	0,4	**12,6**	0,0
JT-1-4-19	5,5	0,4	0,2	1,8	42,3	3,2	9,9	0,3	24,0	0,6	**5,9**	1,5	0,2	0,0	0,0	0,2	0,4	**0,5**	**0,0**	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,4	**1,5**	0,0
JT-1-4-19	4,7	0,3	0,1	2,3	42,1	2,8	10,0	0,2	27,1	0,6	**4,1**	1,6	0,2	0,0	0,0	0,2	0,3	**0,5**	**0,0**	0,0	0,1	0,2	0,0	0,6	0,3	**1,4**	0,0
JT-1-4-19	5,6	0,4	0,1	1,5	36,8	3,7	9,4	0,3	19,6	0,5	**0,6**	1,4	0,2	0,0	0,0	1,4	0,3	**1,9**	**0,3**	0,0	0,2	0,2	0,0	1,6	0,4	**13,1**	0,0
JT-1-4-19	4,6	0,3	0,1	1,7	36,3	2,7	7,2	0,3	22,6	0,5	**1,0**	1,5	0,1	0,0	0,0	0,7	0,3	**2,1**	**0,3**	0,0	0,1	0,2	0,0	2,2	0,3	**14,4**	0,0

JT-1-4-19	4,9	0,3	0,1	1,8	38,3	3,1	7,4	0,3	20,2	0,5	**0,8**	1,3	0,1	0,0	0,0	0,8	0,3	**2,7**	**0,5**	0,0	0,2	0,2	0,0	1,7	0,3	**13,7**	0,0
JT-1-4-19	4,7	0,3	0,1	1,7	36,2	3,0	8,2	0,4	20,9	0,5	**0,7**	1,3	0,2	0,0	0,0	0,9	0,3	**2,9**	**0,5**	0,0	0,2	0,2	0,0	2,0	0,3	**14,2**	0,0
JT-1-4-19	4,8	0,3	0,1	2,2	41,0	3,0	9,8	0,2	27,0	0,5	**4,2**	1,8	0,2	0,0	0,0	0,3	0,3	**0,5**	**0,0**	0,0	0,1	0,2	0,0	0,7	0,3	**2,2**	0,0
JT-1-4-19	5,8	0,5	0,1	1,7	36,6	3,7	9,1	0,3	21,3	0,6	**0,9**	1,4	0,2	0,0	0,0	0,8	0,3	**1,5**	**0,3**	0,0	0,1	0,2	0,0	1,2	0,4	**12,7**	0,0
JT-1-4-19	4,8	0,4	0,1	2,1	47,1	2,9	7,4	0,2	23,9	0,6	**4,8**	1,7	0,1	0,0	0,0	0,2	0,3	**0,5**	**0,0**	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,3	**1,5**	0,0
JT-1-4-19	5,1	0,4	0,1	1,7	37,4	3,3	7,7	0,3	20,7	0,6	**0,9**	1,4	0,1	0,0	0,0	0,8	0,3	**2,5**	**0,4**	0,0	0,1	0,2	0,0	1,6	0,4	**13,6**	0,0
JT-1-4-19	4,7	0,3	0,1	1,8	37,3	2,7	7,9	0,4	20,6	0,5	**1,1**	1,3	0,1	0,0	0,0	0,5	0,3	**4,3**	**0,6**	0,0	0,1	0,1	0,0	2,2	0,3	**12,3**	0,0
JT-1-4-19	4,9	0,3	0,2	2,0	37,9	3,0	7,1	0,4	20,1	0,5	**1,1**	1,3	0,1	0,0	0,0	0,6	0,3	**4,1**	**0,5**	0,0	0,1	0,1	0,0	2,1	0,3	**12,6**	0,0
JT-1-4-19	4,7	0,3	0,1	1,6	35,7	3,2	6,9	0,3	22,4	0,5	**0,7**	1,4	0,1	0,0	0,0	1,3	0,3	**3,0**	**0,5**	0,0	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	**14,0**	0,0
JT-1-4-34	4,7	0,4	0,1	1,8	37,6	3,4	7,8	0,3	23,7	0,5	**0,6**	1,5	0,2	0,0	0,0	1,2	0,2	**1,7**	**0,3**	0,0	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	**11,4**	0,0
JT-1-4-34	5,3	0,4	0,1	1,6	35,3	3,5	8,1	0,5	21,1	0,5	**0,8**	1,2	0,1	0,0	0,0	0,7	0,3	**3,1**	**0,5**	0,0	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	**13,9**	0,0
JT-1-4-34	4,9	0,3	0,1	1,7	39,4	3,3	7,7	0,3	21,1	0,5	**0,7**	1,4	0,2	0,0	0,0	0,8	0,3	**2,0**	**0,3**	0,0	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	**12,3**	0,0
JT-1-4-34	5,0	0,3	0,1	1,8	38,5	3,1	7,8	0,4	20,5	0,5	**0,8**	1,3	0,2	0,0	0,0	0,8	0,2	**2,3**	**0,3**	0,0	0,2	0,1	0,0	2,0	0,3	**13,1**	0,0
JT-1-4-34	5,1	0,3	0,1	1,8	39,5	2,9	9,0	0,2	22,2	0,6	**0,6**	1,5	0,2	0,0	0,0	1,0	0,3	**1,7**	**0,2**	0,0	0,1	0,2	0,0	1,6	0,3	**10,2**	0,0
JT-1-4-34	4,8	0,3	0,1	1,8	38,2	3,2	7,8	0,4	21,1	0,5	**0,7**	1,4	0,2	0,0	0,0	0,7	0,3	**2,1**	**0,4**	0,0	0,2	0,1	0,0	1,7	0,3	**13,3**	0,0
JT-1-4-34	5,0	0,3	0,1	2,0	39,7	2,9	7,9	0,4	20,2	0,5	**0,7**	1,3	0,1	0,0	0,0	0,7	0,3	**2,3**	**0,3**	0,0	0,2	0,1	0,0	1,9	0,3	**12,2**	0,0
JT-1-4-34	4,7	0,3	0,1	1,6	36,0	3,3	8,3	0,3	23,7	0,5	**0,6**	1,5	0,2	0,0	0,0	1,2	0,3	**1,7**	**0,3**	0,0	0,2	0,1	0,0	1,8	0,3	**12,7**	0,0
JT-1-4-34	6,2	0,5	0,2	2,1	32,0	4,4	7,2	0,6	19,4	0,6	**1,2**	1,2	0,2	0,0	0,0	0,6	0,4	**2,2**	**0,5**	0,0	0,3	0,2	0,0	1,6	0,4	**17,6**	0,0

Tabla 24. Composición de ácidos grasos de aceite de semilla de semillas T3 individuales de *B. juncea* transformada con el ADN-T de GA7-modB.

	C16:0	16:1d9	16:3	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	C22:3n3	22:5n6	22:4n3	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT-1-4-34-11	4,8	0,4	0,1	2,8	38,4	3,7	5,7	0,4	18,0	0,7	1,0	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,4	0,4	0,0	0,3	0,0	1,4	0,5	16,3	0,0
JT-1-4-34-11	4,3	0,4	0,1	3,0	43,3	3,6	5,2	0,2	18,5	0,7	0,8	1,7	0,1	0,1	0,0	0,0	1,4	0,3	1,2	0,3	0,0	0,2	0,0	1,2	0,3	12,4	0,0
JT-1-4-34-11	4,6	0,4	0,1	2,8	33,1	4,1	5,1	0,4	18,5	0,7	1,2	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,6	0,5	0,0	0,3	0,0	1,4	0,4	20,8	0,0
JT-1-4-34-11	4,5	0,4	0,1	2,9	39,5	3,3	6,3	0,4	18,5	0,8	1,2	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,0	0,3	1,7	0,3	0,0	0,2	0,0	1,8	0,3	14,2	0,0
JT-1-4-34-11	4,9	0,5	0,2	2,8	32,2	3,9	4,7	0,3	20,7	0,8	1,2	1,4	0,1	0,2	0,0	0,0	2,0	0,3	1,4	0,5	0,0	0,3	0,0	1,2	0,4	19,4	0,0
JT-1-4-34-11	4,3	0,3	0,1	3,0	38,1	3,2	5,8	0,3	19,4	0,7	1,1	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,2	0,3	1,5	0,4	0,0	0,2	0,0	1,3	0,4	16,0	0,0
JT-1-4-34-11	5,4	0,5	0,2	3,2	29,3	4,0	4,6	0,4	18,6	0,9	1,7	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,2	0,4	1,6	0,7	0,0	0,3	0,0	1,4	0,5	22,9	0,0
JT-1-4-34-11	5,2	0,5	0,2	3,7	34,5	4,1	4,5	0,3	17,2	1,0	1,4	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,5	0,4	1,4	0,6	0,0	0,3	0,0	1,2	0,5	19,4	0,0
JT-1-4-34-11	5,3	0,5	0,1	3,4	33,4	3,7	4,6	0,3	17,6	0,9	1,7	1,2	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,4	1,5	0,6	0,0	0,2	0,0	1,2	0,5	20,7	0,0
JT-1-4-34-11	4,6	0,4	0,1	3,0	39,5	3,5	5,1	0,3	17,8	0,8	0,8	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,4	0,4	1,3	0,4	0,0	0,3	0,0	1,3	0,4	16,1	0,0
JT-1-4-34-11	4,3	0,4	0,1	3,1	41,7	3,5	5,6	0,2	19,0	0,7	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,3	0,3	1,4	0,3	0,0	0,2	0,0	1,5	0,3	12,7	0,0
JT-1-4-34-11	4,8	0,5	0,2	2,8	33,8	4,0	5,3	0,4	18,2	0,7	1,4	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,2	0,3	1,6	0,6	0,0	0,3	0,0	1,3	0,4	20,1	0,0
JT-1-4-34-11	4,4	0,4	0,1	3,5	40,3	3,5	5,2	0,2	19,1	0,7	1,0	1,5	0,1	0,1	0,0	0,0	1,6	0,3	1,4	0,4	0,0	0,2	0,0	1,4	0,3	13,8	0,0

JT-1-4-34-11	4,8	0,4	0,1	3,2	36,1	3,7	5,9	0,3	19,9	0,7	1,4	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,9	0,5	0,0	0,2	0,0	1,7	0,3	15,4	0,0
JT-1-4-34-11	4,0	0,3	0,1	2,8	37,2	3,2	4,9	0,3	19,6	0,8	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,5	0,4	1,3	0,5	0,0	0,3	0,0	1,1	0,4	17,9	0,0
JT-1-4-34-11	4,5	0,4	0,1	3,8	36,7	3,2	4,5	0,2	19,0	0,9	1,1	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,8	0,4	1,2	0,5	0,0	0,2	0,0	1,0	0,5	17,8	0,0
JT-1-4-34-11	5,2	0,4	0,2	2,8	27,8	3,7	5,3	0,5	18,3	0,8	1,7	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,0	0,4	1,9	0,7	0,0	0,3	0,0	1,7	0,5	24,7	0,0
JT-1-4-34-11	5,4	0,6	0,2	2,8	31,7	4,1	4,6	0,3	18,5	0,8	1,3	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	1,4	0,4	1,4	0,6	0,0	0,2	0,0	1,3	0,4	21,8	0,0
JT-1-4-34-11	6,4	0,6	0,1	2,7	30,3	3,5	4,1	0,4	16,1	0,8	2,1	1,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,9	0,4	1,4	0,7	0,0	0,2	0,0	1,1	0,5	25,8	0,0
JT-1-4-34-11	4,3	0,3	0,1	3,2	39,2	3,3	5,7	0,2	20,1	0,7	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,7	0,3	1,3	0,3	0,0	0,2	0,0	1,3	0,3	14,1	0,0
JT-1-4-34-21	4,2	0,4	0,1	2,3	39,9	3,9	5,9	0,3	20,2	0,6	0,9	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	1,1	0,3	1,5	0,3	0,0	0,3	0,0	1,8	0,4	13,3	0,0
JT-1-4-34-21	4,4	0,4	0,1	2,7	38,8	3,9	5,7	0,4	18,5	0,6	1,3	1,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,8	0,3	1,8	0,4	0,0	0,3	0,0	1,7	0,3	15,6	0,0
JT-1-4-34-21	4,2	0,4	0,1	2,0	42,4	3,6	6,0	0,4	19,1	0,5	1,0	1,6	0,1	0,1	0,0	0,0	0,9	0,2	1,5	0,3	0,0	0,3	0,0	1,6	0,3	12,9	0,0

Ejemplo 10. Análisis adicional de plantas transformadas y ensayos a campo

Se llevaron a cabo análisis por hibridización de transferencia Southern en plantas seleccionadas T2 de *B. napus* con el ADN-T de la construcción GA7-modB. El ADN extraído de las muestras del tejido vegetal se digirió con varias enzimas de restricción para el análisis por hibridización por transferencia Southern. Se hibridizó una sonda radioactiva correspondiente a parte del ADN-T con las membranas, las que se lavaron bajo condiciones severas, y se expusieron las membranas a una película para detectar las bandas de hibridización. Algunas de las muestras exhibieron bandas de hibridización individuales para cada una de las digestiones de restricción, correspondiendo a inserciones individuales de ADN-T en las plantas, mientras que otras mostraron dos bandas y otras nuevamente mostraron múltiples bandas de ADN-T, correspondiendo a entre 4 y 6 inserciones. El número de bandas hibridizantes observadas en el análisis por transferencia Southern se correlacionó bien con el número de copias de ADN-T en las plantas transgénicas determinado por el método de PCR digital, hasta un número de copias de aproximadamente 3 o 4. A mayor número de copias de aproximadamente 5, el método de PCR digital fue menos confiable.

Se usaron algunas de las líneas seleccionadas como donantes de polen en cruces con una serie de aproximadamente 30 variedades diferentes de *B. napus* con diferentes fondos genéticos. Se llevan a cabo cruces adicionales para demostrar si las múltiples inserciones de ADN-T están genéticamente ligadas o no, y permitiendo la segregación de loci transgénicos genéticamente no ligados. De esa forma, se seleccionan las líneas que contienen loci transgénicos individuales.

Se llevan a cabo reacciones de PCR de cebador único sobre las líneas transgénicas, usando cebadores adyacentes a los bordes izquierdo y derecho del

ADN-T, y se descarta cualquier línea que muestre la presencia de repeticiones invertidas de los ADN-T.

Varias de las líneas transgénicas mostraron una floración retrasada, mientras que otras tuvieron menor número de semillas y por lo tanto menor rendimiento de semilla por planta después de crecimiento en el invernadero, en consistencia con una menor fertilidad masculina o femenina. Se examinó la morfología de las flores en estas plantas y se observó que en algunos casos, estaba retrasada la dehiscencia y la liberación de polen de las anteras de forma que los estilos se habían elognado antes de que ocurra la dehiscencia, distanciando a las anteras de los estigmas. Pudo restituirse la fertilidad completa mediante polinización artificial. Más aún, se determinó la viabilidad del polen a la dehiscencia por tinción con las tinciones vitales FDA y PI (Ejemplo 1) y la misma se demostró como reducida en algunas de las líneas, mientras que en la mayoría de las líneas transgénicas, la viabilidad del polen fue de aproximadamente 100% comparado con los controles de tipo salvaje. Como otra prueba para otra posible causa del menor rendimiento de semillas en algunas plantas, se probó el contenido de ácidos grasos y la composición de los bulbos de las flores incluyendo las anteras y los estigmas/estilos de algunas plantas T3 y T4. No se detectó DHA en los lípidos extraídos, lo que indica que los genes de la construcción genética no se expresaron en los bulbos de las flores durante el desarrollo de la planta, y descartando a esto como una causa del menor rendimiento de semillas.

Se midió el contenido de aceite por RMN y se determinó el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos para semillas T2. Las líneas transgénicas con menos de 6% de DHA se descartaron. Se determinó el número de copias de ADN-T en muestras de hojas de plantas de las generaciones T1, T2 y T3 mediante el método de PCR digital (Ejemplo 1).

Se sembraron lotes de semillas seleccionadas T3 y T4 en el campo en dos

sitios de Victoria, Australia, cada uno con líneas de 10 m a una densidad de siembra de aproximadamente 10 semillas/m. Los lotes de semillas seleccionadas incluyeron una línea derivada B003-5-14 que mostró niveles de DHA en semillas agrupadas de entre aproximadamente 8 y 11% y niveles de DHA de semillas T2 individuales de hasta aproximadamente 19%, con un número de copias de ADN-T en la planta T0 de 3. Los lotes de semillas seleccionadas también incluyeron líneas derivadas de B0050-27 que habían mostrado niveles de DHA de semilla T2 de más de 20%, y un número de copias de ADN-T de planta T2 de 1 o 2. Las semillas sembradas en el campo germinaron y emergieron plántulas con una misma tasa que las semillas de tipo salvaje. Las plantas que crecieron a partir de la mayor parte, pero no de todas, los lotes de semillas sembrados fueron fenotípicamente normales, por ejemplo tuvieron morfología, velocidad de crecimiento, altura de planta, fertilidad masculina y femenina, viabilidad del polen (100%), puesta de semillas, tamaño de silicua y morfología que fueron esencialmente iguales a las de las plantas controles de tipo salvaje que se crecieron bajo las mismas condiciones. El rendimiento de semillas por planta fue similar a los controles de tipo salvaje que se crecieron bajo las mismas condiciones. Se sembraron otras muestras de semilla en áreas mayores para acumular las líneas transgénicas seleccionadas. El contenido de DHA total en las semillas cosechadas fue de por lo menos 30 mg/g de semilla.

Las personas con experiencia en el arte han de apreciar que se pueden hacer numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se la muestra en las formas de realización específicas sin alejarse del espíritu y alcance de la invención en su forma ampliamente descrita. Las presentes formas de realización, por lo tanto, deben considerarse a todos los respectos como ilustrativas y no restrictivas.

La presente solicitud invoca la prioridad de AU 2013905033 presentada el 18 de diciembre de 2013, y AU 2014902471 presentada el 27 de junio de 2014, los

contenidos completos de las cuales se incorporan a la presente como referencia. Todas las publicaciones que se describen y/o referencian en la presente se incorporan a la presente en su totalidad.

Cualquier discusión de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similar que se halla incluido en la presente memoria descriptiva tiene solamente el propósito de proveer un contexto para la presente invención. No debe ser tomado como una admisión de que cualquiera o todos estos puntos formen parte de la base del arte previo que fueron parte del conocimiento general común en el campo de interés para la presente invención tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

REFERENCIAS

Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16: 2734-2748.

Abbott et al. (1998) Science 282:2012-2018.

Agaba et al. (2004) Marine Biotechnol. (NY) 6:251-261.

Alvarez et al. (2000) Theor Appl Genet 100:319-327.

Armbrust et al. (2004) Science 306:79-86.

Baumlein et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.

Baumlein et al. (1992) Plant J. 2:233-239.

Beaudoin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6421-6426.

Belide et al. (2013) Plant Cell Tiss Organ Cult. 113:543–553.

Berberich. et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:297-306.

Broun et al. (1998) Plant J. 13:201-210.

Brown et al. (2002) Biochem J. 364:795-805.

Chan et al. (2006) Nature Biotechnology 28:951-956.

Chapman et al. (2004) Gen. Dev. 18:1179-1186.

Chen et al. (2004) The Plant Cell 16:1302-1313.

Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep. 15:653-657.

Cheng et al. (2010) Transgenic Res 19: 221-229.

Cho et al. (1999a) J. Biol. Chem. 274:471-477.

Cho et al. (1999b) J. Biol. Chem. 274:37335-37339.

Christie (1982) J. Lipid Res. 23:1072-1075.

Clough and Bent (1998) Plant J. 16:735-43.

Damude et al. (2006). Proc Natl Acad Sci USA 103: 9446-9451.

Denic and Weissman (2007) Cell 130:663-677.

Domergue et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.

Domergue et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 35115-35126.

Domergue et al. (2005) Biochem. J. l 389: 483-490.

Dunoyer et al. (2004) The Plant Cell 16:1235-1250.

Ellerstrom et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.

Gamez et al. (2003) Food Res International 36: 721-727.

Garcia-Maroto et al. (2002) Lipids 37:417-426.

Girke et al. (1998) Plant J. 15:39-48.

Hall et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9320–9324

Hamilton et al. (1997) Gene 200:107-16.

Harayama (1998). Trends Biotechnol. 16: 76-82.

Hastings et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14304-14309.

Hinchee et al. (1988) Biotechnology 6:915-922.

Hoffmann et al. (2008) J Biol. Chem. 283:22352-22362.

Hong et al. (2002a) Lipids 37:863-868.

Horiguchi et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39:540-544.

Huang et al. (1999) Lipids 34:649-659.

Inagaki et al. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:613-621.

Kajikawa et al. (2004) Plant Mol. Biol. 54:335-52.

Kajikawa et al. (2006) FEBS Lett 580:149-154.

Kereszt et al. (2007) Nature Protoc 2:948-952.

Kim et al. (2005) Plant Cell. 2005 1073-89.

Knutzon et al. (1998) J. Biol Chem. 273:29360-6.

Koziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405.

Lassner (1995) Plant Physiol. 109:1389-94.

Leonard et al. (2000) Biochem. J. 347:719-724.

Leonard et al. (2000b) Biochem. J. 350:765-770.

Leonard et al. (2002) Lipids 37:733-740.

Lewsey et al. (2007) Plant J. 50:240-252.

Lo et al. (2003) Genome Res. 13:455-466.

Lu and Kang (2008) Plant Cell Rep. 27:273-8.

Mallory et al. (2002) Nat. Biotech. 20:622-625.

Marangoni et al. (1995) Trends in Food Sci. Technol. 6: 329-335.

Meesapyodsuk et al. (2007) J Biol Chem 282: 20191-20199.

Meng et al. (2008) J. Gen. Virol. 89:2349-2358.

Meyer et al. (2003) Biochem. 42:9779-9788.

Meyer et al. (2004) Lipid Res 45:1899-1909.

Michaelson et al. (1998a) J. Biol. Chem. 273:19055-19059.

Michaelson et al. (1998b) FEBS Lett. 439:215-218.

Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15:473-497.

Napier et al. (1998) Biochem. J. 330:611-614.

Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453.

Parker-Barnes et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8284-8289.

Pereira et al. (2004a) Biochem. J. 378:665-671.

Pereira et al. (2004b) Biochem. J. 384:357-366.

Perrin et al. (2000) Mol Breed 6:345-352.

Petrie et al. (2010a) Metab. Eng. 12:233-240.

Petrie et al. (2010b) Plant Methods 11:6:8.

Petrie et al. (2012) Transgenic Res. 21:139-147.

Potenza et al. (2004) In Vitro Cell Dev Biol – Plant 40:1-22.

Qi et al. (2002) FEBS Lett. 510:159-165.

Qi et al. (2004) Nat. Biotech. 22: 739-745.

Qiu et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:31561-31566.

Reddy and Thomas (1996) Nat. Biotech. 14:639-642.

Reddy et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:293-300.

Robert et al. (2005) Func. Plant Biol. 32:473-479.

Robert et al. (2009) Marine Biotech 11:410-418.

Ruiz-Lopez et al. (2012) Transgenic Res. 21:139-147.

Saha et al. (2006) Plant Physiol. 141:1533-1543.

Saito et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:1813-1818.

Sakuradani et al. (1999) Gene 238:445-453.

Sato et al. (2004) Crop Sci. 44: 646-652.

Sakuradani et al. (2005) Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:648-654.

Sayanova et al. (2006) J Biol Chem 281: 36533-36541.

Sayanova et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4211-4216.

Sayanova et al. (2003) FEBS Lett. 542:100-104.

Sayanova et al. (2006) Planta 224:1269-1277.

Sayanova et al. (2007) Plant Physiol 144:455-467.

Shukla et al. (2002) J. Amer. Oil Chem. Soc. 79:965-969.

Singh et al. (2005) Curr. Opin. in Plant Biol. 8:197-203.

Speranza et al. (2012) Process Biochemistry (In Press).

Sperling et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:3801-3811.

Sperling et al. (2001) Arch. Biochm. Biophys. 388:293-8.

Sprecher et al. (1995) J. Lipid Res. 36:2471-2477.

Spychalla et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:1142-1147.

Tonon et al. (2003) FEBS Lett. 553:440-444.

Trautwein (2001) European J. Lipid Sci. and Tech. 103:45-55.

Tvrdik (2000) J. Cell Biol. 149:707-718.

Venegas-Caleron et al. (2010) Prog. Lipid Res. 49:108-119.

Voinnet et al. (2003) Plant J. 33:949-956.

Wallis and Browse (1999) Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316.

Watts and Browse (1999b) Arch. Biochem. Biophys. 362:175-182.

Weiss et al. (2003) Int. J. Med. Microbiol. 293:95:106.

Weng et al., (2004) Plant Molecular Biology Reporter 22:289-300.

Whitney et al. (2003) Planta 217:983-992.

Wood (2009) Plant Biotechnol J. 7:914-24.

Wu et al. (2005) Nat. Biotech. 23:1013-1017.

Yang et al. (2003) Planta 216:597-603.

Zank et al. (2002) Plant J. 31:255-268.

Zank et al. (2005) WO 2005/012316

Zhang et al. (2004) FEBS Lett. 556:81-85.

Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.

Zhang et al. (2007) FEBS Letters 581: 315-319.

Zhang et al. (2008) Yeast 25: 21-27.

Zhou et al. (2007) Phytochem. 68:785-796.

Zhou et al. (2008) Insect Mol Biol 17: 667-676.

Zou et al. (1997) Plant Cell. 9:909-23.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nuseed Pty Ltd
Grain Research and Development Corporation
Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> LÍPIDO QUE COMPRENDE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA

<130> 516028

<150> AU 2013905033
<151> 2013-12-18

<150> AU 2014902471
<151> 2014-06-27

<160> 58

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21527
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia nucleotídica de pJP3416-GA7.

<400> 1
tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcccgat ctagtaacat 240
agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgcgcgc tatattttgt tttctatcgc 300
gtattaaatg tataattgcg ggactctaat cataaaaacc catctcataa ataacgtcat 360
gcattacatg ttaattatta cgtgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat 420
cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgatc 480
ggcgcgcctc attagtgagc cttctcagcc tttccgttaa cgtagtagtg ctgtcccacc 540
ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt aagagagcac cttgtagttg 600
agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa cctcaggctg tctgaattga 660
ggcatatcag ggaagaggtg gtggataacc tgacagttaa ggtatcccat aagccagttc 720
acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa cagcgtagtt aacccaagaa 780
aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag aagtagagaa gtgagcgaaa 840
aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc agtaagcaac aggccaagag 900
tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat gagaaacgag catccaagaa 960
gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt ggagaacgta gatccagaaa 1020
gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc aagcttgaag tctagcccaa 1080
gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag tgttgaagaa agccacagca 1140
ggagtggtat caagatccat atcgtgtcta acctttgag gggtagcatg gtgcttgtta 1200
tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga atccacaagt catagcctga 1260
agtctcttgt ccacgtaaac agatccggta agagagttat gtccaccctc atgttgaacc 1320
catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag aagcaatgat agggtatcca 1380
gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa gctcgagaag tctgtaagcc 1440

```
acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa gctcagcacg ccatctagcg     1500
aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct tgatctcagc aggtctagaa     1560
ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca tgtggaattc tttgaaagcc     1620
tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga tcacagatcc accagggtgc     1680
ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa cccatctagt ctcgaaagta     1740
gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag gagcagtaga agcatcctta     1800
gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg gagatctagg agaagatctt     1860
ccatcagtct taggagggca catggtatgg taattgtaaa tgtaattgta atgttgtttg     1920
ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa agatcctcgt gtatgttttt aatcttgttt     1980
gtatcgatga gttttggttt gagtaaagag tgaagcggat gagttaattt ataggctata     2040
aaggagattt gcatggcgat cacgtgtaat aatgcatgca cgcatgtgat tgtatgtgtg     2100
tgctgtgaga gagaagctct taggtgtttg aagggagtga caagtggcga agaaaaacaa     2160
ttctccgcgg ctgcatgcta tgtgtaacgt gtagctaatg ttctggcatg gcatcttatg     2220
aacgattctt tttaaaaaca aggtaaaaac ttaacttcat aaaattaaaa aaaaaaacgt     2280
ttactaagtt ggtttaaaag gggatgagac tagtagattg gttggttggt ttccatgtac     2340
cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa ttcctagttg     2400
tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact aggagtggtt     2460
cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta agaacgaatt     2520
tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat agtggcgatt     2580
ttgaaccaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca aatagaaagt     2640
ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg     2700
tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat     2760
tatttactga ggttagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa atactcatga     2820
tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt     2880
taatgcacat gtaatcatag tttagcacaa ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa     2940
atttgtagac tttttttgg cgttaaaaga agactaagtt tatacgtaca ttttatttta     3000
agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg     3060
tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacaa tgtgtatgga     3120
tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta acggaccaca     3180
aaagaggatc catacaaata catctcatag cttcctccat tattttccga cacaaacaga     3240
gcattttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca acattacaat tacatttaca     3300
attaccatac catggaattc gcccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgctg     3360
ctatcgatgc tgttgttgct cctgctatct tctctgctac tgattctatc ggatggggac     3420
ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgcctcttgt tgagtctcct acacctctca     3480
tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt     3540
tccctagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg cttgctcaca     3600
acgtgttcct tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac gaggcttacg     3660
ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag atggctaagg     3720
ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc     3780
tcaagggaaa tgttaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga tctatctctg     3840
gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc tctgctgctc     3900
ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc gtgcttccta     3960
aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga     4020
tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctcctt     4080
accctaagtt tatcgctcag ctcctcgtgg tgtacatggt tactcttctc atgcttttcg     4140
gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg ggccgccgcc     4200
atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg     4260
attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac     4320
tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca     4380
atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat tcaatcactc     4440
ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc     4500
tgaatagaat aattagattc tagtctcatc ccctttttaaa ccaacttagt aaacgttttt     4560
ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgttttta aaaagaatcg ttcataagat     4620
gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt     4680
```

```
cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag cacacacata     4740
caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaatctcc tttatagcct     4800
ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaaacaaga     4860
ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac     4920
attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac tcttatgctg     4980
ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc     5040
ttgttatcgg agatagggct tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac cctggtggaa     5100
agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgtta     5160
gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctgtt cacaagggat     5220
actctccaag aagggctgat cttatcgctg atttccaaga gttcaccaag caacttgagg     5280
ctgagggaat gttcgagcct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg     5340
ctatgcatgt tgctggtgct gctcttatct ggcatggata cactttcgct ggaatcgcta     5400
tgcttggagt tgttcaggga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc     5460
tcactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg     5520
gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc     5580
ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag agaatcgctg     5640
ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag cttttcgctc     5700
ctgttaccac tcttcttgtt gctcttggat ggcagcttta ccttcatcct agacacatgc     5760
tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacgga cttgttggat     5820
accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttaccttctt tacgttcagc     5880
ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc cctgttgttg     5940
agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact aactgttctc     6000
catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccacctttt     6060
acccttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagcttttcg     6120
agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcga ggctatggct gatactttcg     6180
ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa     6240
acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg atgattatca     6300
tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc atgacgttat     6360
ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa     6420
acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag     6480
atcggtcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac     6540
aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt     6600
ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat     6660
ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact     6720
ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa     6780
aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa     6840
attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat     6900
ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa     6960
tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta     7020
aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat     7080
taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg     7140
aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg     7200
gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt     7260
tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt     7320
aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag     7380
tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa     7440
agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaaata     7500
cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttttgt tcttaaacaa gcatcccctc     7560
taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt     7620
ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag catgtgcttt     7680
ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct     7740
ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac acctagcagt     7800
gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgcccctgg     7860
agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccggaa ggtccctagc gacttgttta     7920
```

```
gattgatggg accacctctc aacttcctgc tgctgtccct gctgctggat gtcctgcctc     7980
atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcact cgctcctcaa ttgcttaaga     8040
tcatcgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc ttggttgtag     8100
tagtagctgc cgccgccctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat aattcgatag     8160
aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaaccaa gaaacataca taacatttca     8220
tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcttta     8280
ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatctcatt attattatta ttatccatcc     8340
ttaacaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat caccccttca tcaggtatcc     8400
ttaggcttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc atggttctca     8460
acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaaccc acatgttctc atcggtgtgt     8520
ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat     8580
gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg gaagatgatt     8640
ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct     8700
tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc     8760
cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa     8820
accttgtaag cggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg     8880
atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag     8940
aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgttag tagcaaggta aagagaaagt     9000
cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc ctcagcgata     9060
tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcggtgta aggaacgaaa     9120
accatatctc tggtcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga gaacttccag     9180
ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaacccatc caacggtatc gttaacccat     9240
ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg     9300
aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcgttaggg     9360
agaagaggga tgtaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac gatatctctc     9420
accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgtca     9480
aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt atcgatagcg     9540
gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacggtctt agtagatccc     9600
tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggtaatt gtaaatgtaa     9660
ttgtaatgtt gtttgttgtt tgttgttgtt ggtaattgtt gtaaaatttt tggtggtgat     9720
tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt gagattgggg     9780
atggtgggtt tatatagtgg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac tttgcatggg     9840
ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaataca     9900
tatacggtat tttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac taattttggc     9960
aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt    10020
tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg    10080
gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa    10140
ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc accagaacat    10200
aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt caggttcata    10260
ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catccttcct cctgctctag ttgagaggcc    10320
ttgggactaa cgagaggtca gttgggatag cagatcctta tcctggacta gcctttctgg    10380
tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct    10440
tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggcttgcaa    10500
tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt gctgatttag    10560
agctcccggt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt    10620
tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg atcgaatact    10680
cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat ttttttcaa     10740
cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac ttatactgac    10800
aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga    10860
catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt    10920
catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgcaaaat    10980
attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt    11040
gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat gaccgaaatc    11100
catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatctttcag    11160
```

```
agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag    11220
agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctcgtacaat tacgagagtt gtttttttg     11280
tgattttcct agtttctcgt tgatggtgag ctcatattct acatcgtatg gtctctcaac    11340
gtcgtttcct gtcatctgat atcccgtcat ttgcatccac gtgcgccgcc tcccgtgcca    11400
agtccctagg tgtcatgcac gccaaattgg tggtggtgcg ggctgccctg tgcttcttac    11460
cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggtttgg    11520
tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc agaaaacaat    11580
tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag    11640
ttacatctct taagaaataa tgtaacccct ttagacttta tatatttgca attaaaaaaa    11700
taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt    11760
tatatcgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggtattgtg tttacagaac    11820
ctataatcaa ataatcaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg    11880
ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat    11940
atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgcact    12000
tcattgtcct tattacgtgt tacaaaatga aacccatgca tccatgcaaa ctgaagaatg    12060
gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctcccgc    12120
tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa    12180
gatacccact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca    12240
tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg    12300
ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct gatagacctg    12360
atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct gagcatcctg    12420
gtggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct ttcatggaat    12480
accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga tctcttgctt    12540
ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct aggatcgcta    12600
agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctcctgcttc ttactgggtt aaggctggac    12660
ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga aagagacttc    12720
tcccttctat cgttcttgga tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg    12780
ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttgga ctttgtcagg    12840
attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg caccacctcc    12900
acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cggtgctctt agactcaagc    12960
ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttacctttg cctggtgaga     13020
ctatgtacgc tttcaagctt ttgttcctcg acatctctga gcttgttatg tggcgttggg    13080
agggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg cttctcaagc    13140
ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct gttcatactg    13200
ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgctttc ttcttcttca    13260
tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc acttctatga    13320
ctagaggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacgtt ggaggacctc    13380
ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg ttccctagag    13440
ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgttaa ggctgagctt gaggctagag    13500
gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc ctcagacata    13560
tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt    13620
gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg    13680
aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg tatcgtattg    13740
tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgttttttt aaatcatgaa ttttaaattt    13800
tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatatc catgcatgga tgtttcttta    13860
cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac tatccctcaa    13920
aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa acgaaacata    13980
ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat ccctgaatga    14040
ttcctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc gagaagcagc    14100
ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag tattttcctt    14160
cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt ttggccacca    14220
ttcaattctg tcttgccttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag agaataaaaa    14280
taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac ttgtcattgc    14340
caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat accgtatatg    14400
```

```
tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc acgtgtagcc    14460
catgcaaagt taacactcac gaccccattc ctcagtctcc actatataaa cccaccatcc    14520
ccaatctcac caaacccacc acacaactca caactcactc tcacacctta aagaaccaat    14580
caccaccaaa aatttttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaaacaa cattacaatt    14640
acatttacaa ttaccatacc atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca    14700
gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa    14760
acgtgttctc tgttcctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt    14820
gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc    14880
ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta    14940
acagcatcat caagttcact ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa    15000
ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg    15060
tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga    15120
agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg    15180
ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt    15240
actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat    15300
ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga    15360
aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct    15420
tcctttctga tcttggaatc ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat    15480
tcggaggatg gtccctttc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc    15540
tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg    15600
aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac    15660
ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc    15720
cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca    15780
ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg    15840
ttgacggtga taacggtgtt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg    15900
ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtac aaagacactg ctaggtgtta    15960
aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt aacagctgta    16020
ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggctg    16080
atgaaatgtt atgtatgttt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg ctcgtgtggt    16140
tctatcgaat tattcggcgg ttcctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc cgcagctact    16200
actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc tgctgcgatg    16260
atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca atcggccaga    16320
tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat    16380
ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc    16440
tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtggtga tcgatgagat cgtataaaga    16500
cactgctagg tgttaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa    16560
aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaaatg    16620
gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata tttggtctaa    16680
tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat atatagtttt    16740
tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct agaaatattt    16800
gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt    16860
aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt caatctcttt    16920
gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg    16980
aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg tatcatattg    17040
atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta    17100
gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc tataagaata    17160
ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata tatttactta    17220
tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa aaaccagaaa    17280
atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt tggtttgatt    17340
ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccccta atcataatag ctttaatatt    17400
tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc    17460
ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat gtaatttact    17520
tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga    17580
tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag    17640
```

```
gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg atatattttt    17700
tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg taactattat    17760
gctccccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg    17820
caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa    17880
agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg    17940
tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc    18000
agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct    18060
attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa    18120
atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat tgtaatttta    18180
gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt    18240
ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta gagaatagac    18300
ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc    18360
caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag    18420
cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgtta    18480
aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg    18540
aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt    18600
tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt    18660
ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct    18720
catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac    18780
aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc    18840
tatccctgct gctcttgctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga    18900
tatcccagct tctgagaaag ttcctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac    18960
tatcggaact attggatacc tcctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag    19020
atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt    19080
caacagctac tgcatctacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg    19140
gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggtta tctggcttca    19200
ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt    19260
cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt    19320
tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttcgt    19380
gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa    19440
gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta    19500
caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttccttac cttcaactct gggttatggt    19560
gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa    19620
gaagcagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg    19680
actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac    19740
aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac    19800
tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa    19860
aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa    19920
aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc    19980
cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac    20040
tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa    20100
catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga    20160
ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca    20220
ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa    20280
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtggtcc    20340
caaagatgga cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc    20400
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca    20460
ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg    20520
ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctgtt gaaatcagac ctgctactgc    20580
tgctgatatg gctgctgttt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa    20640
cttcagaact gagcctcaaa ctcctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga    20700
tagataccct tggcttgttg ctgaggttga gggtgttgtt gctggaatcg cttacgctgg    20760
accttggaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca    20820
cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga    20880
```

agctcaggga ttcaagtctg ttgttgctgt tatcggactc cctaacgatc cttctgttag 20940
acttcatgag gctcttggat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 21000
cggtggatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttcctg ctcctcctag 21060
acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 21120
agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 21180
aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 21240
tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 21300
gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 21360
acggttaaaa ccaccccagt acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420
cgtcaatttg tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480
gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 21527

<210> 2
<211> 23512
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia nucleotídica de pGA7- mod_B

<400> 2
tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccgttcg 240
actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctcgccgcgc cgatcacttc 300
tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360
tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420
ttgctctgtt ccttgttgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480
tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540
aatgttgttc ttccgattgg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600
cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660
gctactggct cattacacat ttccccttcc cctcattctc actttgtggc tttattatta 720
ttattattac atatatttta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatca 780
ttagtgagcc ttctcagcct ttccgttaac gtagtagtgc tgtcccacct tatcaaggtt 840
agagaaagta gccttccaag caccgtagta agagagcacc ttgtagttga gtccccactt 900
cttagcgaaa ggaacgaatc ttctgctaac ctcaggctgt ctgaattgag gcatatcagg 960
gaagaggtgg tggataacct gacagttaag gtatcccata agccagttca cgtatcctct 1020
agaaggatcg atatcaacgg tgtgatcaac agcgtagtta acccaagaaa ggtgcttatc 1080
agatggaaca acagggaggt gagtatgaga agtagagaag tgagcgaaaa ggtacatgta 1140
agcgatccag tttccgaaag tgaaccacca gtaagcaaca ggccaagagt atccagtagc 1200
aagcttgata acagcggttc taacaacatg agaaacgagc atccaagaag cctcttcgta 1260
gttcttctta cggagaactt gtctagggtg gagaacgtag atccagaaag cttgaacaag 1320
aagtccagag gtaacaggaa cgaaagtcca agcttgaagt ctagcccaag ctctagagaa 1380
tcctctaggt ctgttatcct caacagcagt gttgaagaaa gccacagcag gagtggtatc 1440
aagatccata tcgtgtctaa ccttttgagg ggtagcatgg tgcttgttat gcatctggtt 1500
ccacatctca ccagaagtag aaagtccgaa tccacaagtc atagcctgaa gtctcttgtc 1560
cacgtaaaca gatccggtaa gagagttatg tccaccctca tgttgaaccc atccacatct 1620
agctccgaag aaagcaccgt aaacaacaga agcaatgata gggtatccag cgtacataag 1680
agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctcgagaagt ctgtaagcca catgggtgat 1740
agaaggcttg aagaatccat ctctctcaag ctcagcacgc catctagcga aatcctcaag 1800
cataggagca tcctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gcaaagctct 1860
aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc 1920
agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccagggtgct tgaagttagt 1980

```
cacatcgtac tcaacgtcct caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc     2040
atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcatccttag catcaagagc     2100
ctcagcagaa gatttagacc tggtaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagtctt     2160
aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttgtttgt tgtttgttgt     2220
tgttggtaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggtatcttt tggatggata agcaagtagt     2280
gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg     2340
tcgccacata agaaatggag gggaagggtt cttgcgccat tcttcagttt gcatggatgc     2400
atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtttc     2460
agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt     2520
gtgaatctat tcggttgata atactagtgc attttggccg ttaatccctt caattaactg     2580
cacaaacttc agttgagtat tgattatttg attataggtt ctgtaaacac aataccaagt     2640
ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagagtgg ttaaacttag     2700
ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattattt ttttaattgc aaatatataa     2760
agtctaaagg ggttacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaatc tgacttaatc     2820
cgtctcatca ctctggtttc cagttctaat ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg     2880
aagcaagaag taaattgatc aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac ccactaccat     2940
cgccgcggag acccccaaac tcaacctcca cccatcggta agaagcacag ggcagcccgc     3000
accaccacca atttggcgtg catgacacct agggacttgg cacgggaggc ggcgcacgtg     3060
gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagaccat acgatgtaga     3120
atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacaa aaaaaacaac tctcgtaatt     3180
gtacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgcccaa     3240
cacgtagttg ccggaatccg gtgtggagct cacgactctg aaagataggc gcttcctgtt     3300
tcgtttcgct cacccactgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt ggtttgctga     3360
caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg     3420
gagttatggt tgcaagtcca taacttgccg ttcgaatatt ttgcggagcc agtcggacgg     3480
gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagttcttc     3540
cctaatgctt tcatgaggct tcgggtcgtt atggatgtcg gaaaacccct cttgaaggaa     3600
cgagacgtta ttatgcatga cggtaagact attacttgtc agtataagta tgaaagatta     3660
cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaaatg tgcacttcga     3720
tttcaatact cagagatcga cttccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca     3780
tggaaggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct     3840
aaactgaaat cgaagtcaaa tcacccaacc gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct     3900
ccacagtatc caatcatcgt gcacgatgct ccaggtattg caagccaggt attgcaagct     3960
aggagtagga tagagacctt aaacgtcgtt ggtgtgaaga gtcatcttca gacctaatgg     4020
agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa     4080
ggatctgcta tcccaactga cctctcgtta gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg     4140
aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct     4200
aatttttta gtcttgcttc tgcacttttt gtttattatg ttctggtgac tatgttattt     4260
acccttgtcc gtatgcttga gggtacccta gtagattggt tggttggttt ccatgtacca     4320
gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagttgtg     4380
taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag gagtggttct     4440
tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg     4500
aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt     4560
gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa tagaaagtgg     4620
tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg     4680
tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccactcatta     4740
tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat actcatgatc     4800
ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta     4860
atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat     4920
ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttta tacgtacatt ttattttaag     4980
tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt ctgcaatgta     5040
ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg     5100
catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac ggaccacaaa     5160
agaggatcca tacaaataca tctcatagct tcctccatta ttttccgaca caaacagagc     5220
```

```
attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat     5280
taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgctcttg ctggaactct tggatacgtt     5340
acctacaatg tggctaaccc tgatatccca gcttctgaga aagttcctgc ttacttcatg     5400
caggttgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctcctctt catctacttc     5460
ggaaagcgta tcatgcagaa cagatctcaa cctttcggac tcaagaacgc tatgctcgtt     5520
tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct acctttttcgt tacttctcat     5580
agggctcagg gacttaaggt ttggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga     5640
atctctcagg ttatctggct tcactacaac aacaagtacg ttgagcttct cgacaccttc     5700
ttcatggtga tgaggaagaa gttcgaccag ctttctttcc ttcacatcta ccaccacact     5760
cttctcatct ggtcatggtt cgttgttatg aagcttgagc ctgttggaga ttgctacttc     5820
ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact cttactacgg acttgctgct     5880
cttggagtta actgtttctg gaagaagtac atcacccaga tccagatgct tcagttctgt     5940
atctgtgctt ctcactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgcttt ctggcttcct     6000
taccttcaac tctgggttat ggtgaacatg ttcgttctct tcgccaactt ctaccgtaag     6060
aggtacaagt ctaagggtgc taagaagcag tgataaggcg cgcggcgcgc cgggccgccg     6120
ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtgta ataagacgac tctcactact cgatcgctag     6180
tgattgtcat tgttatatat aataatgtta tctttcacaa cttatcgtaa tgcatgtgaa     6240
actataacac attaatccta cttgtcatat gataacactc tccccattta aaactcttgt     6300
caatttaaag atataagatt ctttaaatga ttaaaaaaaa tatattataa attcaatcac     6360
tcctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag     6420
tctgaataga ataattagat tctagtctca tccccttta aaccaactta gtaaacgttt     6480
tttttttaa ttttatgaag ttaagttttt accttgtttt taaaaagaat cgttcataag     6540
atgccatgcc agaacattag ctacacgtta cacatagcat gcagccgcgg agaattgttt     6600
ttcttcgcca cttgtcactc ccttcaaaca cctaagagct tctctctcac agcacacaca     6660
tacaatcaca tgcgtgcatg cattattaca cgtgatcgcc atgcaaatct cctttatagc     6720
ctataaatta actcatccgc ttcactcttt actcaaacca aaactcatcg atacaaacaa     6780
gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca     6840
acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc     6900
tgctcctcct tctgctcaac ttcacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga     6960
gcttgttatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gttaagagac accctggtgg     7020
aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt     7080
tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttcct tctcgtcctg ttcacaaggg     7140
atactctcca agaagggctg atcttatcgc tgatttccaa gagttcacca agcaacttga     7200
ggctgaggga atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat     7260
cgctatgcat gttgctggtg ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc     7320
tatgcttgga gttgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgagggtg gacattactc     7380
tctcactgga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttgttacg gacttggatg     7440
tggaatgtct ggtgcttggt ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctcctcaaaa     7500
gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tcctctcgtt gctttccatg agagaatcgc     7560
tgctaaggtt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc     7620
tcctgttacc actcttcttg ttgctcttgg atggcagctt taccttcatc ctagacacat     7680
gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcgga atcagatacg gacttgttgg     7740
ataccttgct gctaactacg gtgctggata cgttctcgct tgttaccttc tttacgttca     7800
gcttggagct atgtacatct tctgcaactt cgctgtttct catactcacc tccctgttgt     7860
tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgctgct aaccacacta ctaactgttc     7920
tccatcttgg tggtgtgatt ggtggatgtc ttaccttaac taccagatcg agcaccacct     7980
ttacccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgct cctagagtta agcagctttt     8040
cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt     8100
cgctaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcgttc     8160
aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg cgatgattat     8220
catataattt ctgttgaatt acgttaagca cgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt     8280
atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga     8340
aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact     8400
agatcggtcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaat ttagtttggt attgagtaaa     8460
```

```
acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact     8520
ttttatagaa ttttctttaa aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcatgtaat     8580
atttcgttaa atatgaagtg ctccattttt attaacttta aataattggt tgtacgatca     8640
ctttcttatc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc     8700
aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta     8760
aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa     8820
atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata     8880
aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg     8940
taaaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag     9000
attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac     9060
cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact     9120
cggtccattt gcacccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac     9180
gttgtcaata tcctggaaat tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat     9240
ttaaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca     9300
agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac     9360
aaagaaccat aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa     9420
tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc     9480
tctaaagaat ggcagttttc ctttgcatgt aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt     9540
ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtgatag aacccacacg agcatgtgct     9600
ttccatttaa ttttaaaaac caagaaacat acatacataa cattccatca gcctctctct     9660
ctttttatta cggttaatga cttaaaaacac atcttattat cccatcctta acacctagca     9720
gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaacca tgcagactgc tgctgcccct     9780
ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccgg aaggtcccta gcgacttgtt     9840
tagattgatg ggaccacctc tcaacttcct gctgctgtcc ctgctgctgg atgtcctgcc     9900
tcatctggcc gattgcacgc tccagtcccc tgcatgtgca ctcgctcctc aattgcttaa     9960
gatcatcgca gcagctatcg aagtgctggc tctgttgccc tcctccacgg ccttggttgt    10020
agtagtagct gccgccgccc ttctggactt tttcccacag gaaccgccga ataattcgat    10080
agaaccacac gagcatgtgc tttcatttat tttaaaaacc aagaaacata cataacattt    10140
catcagcctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctt    10200
tattacagct gttacactaa cttaaaaacac attcatctca ttattattat tattatccat    10260
ccttaacacc tagcagtgtc tttgtacgat ctcataatcg atcacccctt catcaggtat    10320
ccttaggctt cactccaacg ttgttgcagt tacggaacat gtacacacca tcatggttct    10380
caacgaactg gcaagatctc caagttttcc aaaggctaac ccacatgttc tcatcggtgt    10440
gtctgtagtg ctctcccata actttcttga tgcactcggt agcttctcta gcatggtaga    10500
atgggatcct tgaaacgtag tgatggagca catgagtctc gatgatgtca tggaagatga    10560
ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact    10620
cttgagcatc gtaatgaggc atagaagaat cggtgtgctg aaggaaggta acgaaaacaa    10680
gccagtggtt aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga    10740
aaaccttgta agcggtgtaa acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa    10800
cgatgtacca gtagtccttc ttatcgaaaa cagggctaga aggccagtag tgagacttga    10860
agaacttaga aacaccaggg taaggttgtc cagtagcgtt agtagcaagg taaagagaaa    10920
gtcctccaag ctgttggaac aagagagcga aaacagagta gataggagtt tcctcagcga    10980
tatcgtgaag gctggtaact tggtgcttct ctttgaattc ctcggcggtg taaggaacga    11040
aaaccatatc tctggtcatg tgtccagtag ccttatggtg cttagcatga gagaacttcc    11100
agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaaccca tccaacggta tcgttaaccc    11160
atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc    11220
cgaaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgttag    11280
ggagaagagg gatgtaggta agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatctc    11340
tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgta acagtgctta gggatagcgt    11400
caaggatatc cttgatggtg taatctggca ccttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag    11460
cggtcttttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaacg cctaacggtc ttagtagatc    11520
cctcaaggat ctcagatcca gacacggtaa ccttagacat ggtatggtaa ttgtaaatgt    11580
aattgtaatg ttgtttgttg tttgttgttg ttggtaattg ttgtaaaatt tttggtggtg    11640
attggttctt taaggtgtga gagtgagttg tgagttgtgt ggtgggtttg gtgagattgg    11700
```

```
ggatggtggg tttatatagt ggagactgag gaatggggtc gtgagtgtta actttgcatg    11760
ggctacacgt gggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaat gcagccaata    11820
catatacggt attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg    11880
gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tcttgcttta atttggatta    11940
tttttattct cttaccttgg ccgttcatat tcacatccct aaaggcaaga cagaattgaa    12000
tggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg    12060
aaggaaaata ctgattctct caagcatacg gacaagggta aataacatag tcaccagaac    12120
ataataaaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaaatta gctatggaca ttcaggttca    12180
tattggaaac atcattatcc tagtcttgtg accatccttc ctcctgctct agttgagagg    12240
ccttgggact aacgagaggt cagttgggat agcagatcct tatcctggac tagcctttct    12300
ggtgtttcag agtcttcgtg ccgccgtcta catctatctc cattaggtct gaagatgact    12360
cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggcttgc    12420
aatacctgga gcatcgtgca cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt    12480
agagctcccg gttgggtgat ttgacttcga tttcagttta ggcttgttga aatttttcag    12540
gttccattgt gaagccttta gagcttgagc ttccttccat gttaatgcct tgatcgaata    12600
ctcctagaga aaagggaagt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac atttttttfc    12660
aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg    12720
acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tccttcaaga ggggttttcc    12780
gacatccata acgacccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt    12840
gtcatggcct ttataggtgt cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaaa    12900
atattcgaac ggcaagttat ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta    12960
ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggttgt cagcaaacca atgaccgaaa    13020
tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatctttc    13080
agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggct tcgccgtatt    13140
agagatatgt tgaggcagac ccatctgtgc cactcgtaca attacgagag ttgttttttt    13200
tgtgattttc ctagtttctc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggtctctca    13260
acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcatcc acgtgcgccg cctcccgtgc    13320
caagtcccta ggtgtcatgc acgccaaatt ggtggtggtg cgggctgccc tgtgcttctt    13380
accgatgggt ggaggttgag tttgggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt    13440
ggtgtgggtt gacggcattg atcaatttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca    13500
attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaagtcag attccaacag    13560
agttacatct cttaagaaat aatgtaaccc ctttagactt tatatatttg caattaaaaa    13620
aataatttaa cttttagact ttatatatag ttttaataac taagtttaac cactctatta    13680
tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga    13740
acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac    13800
ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca    13860
atatcatcgc cgttcttctt ctgtccacat atcccctctg aaacttgaga gacacctgca    13920
cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa    13980
tggcgcaaga acccttcccc tccatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc    14040
gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atccatccaa    14100
aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta    14160
catttacaat taccatacca tgccacctag cgctgctaag caaatgggag cttctactgg    14220
tgttcatgct ggtgttactg actcttctgc tttcaccaga aaggatgttg ctgatagacc    14280
tgatctcacc atcgttggag attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc    14340
tggtggtgct catttcgttt ctttgttcgg aggaagagat gctactgagg ctttcatgga    14400
ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc    14460
ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc    14520
taagatggtg ccttctgttt cttctggatt cgctcctgct tcttactggg ttaaggctgg    14580
acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact    14640
tctcccttct atcgttcttg gatggctttt cgctcttatc ggtcttaaca tccagcatga    14700
tgctaaccat ggtgctttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca    14760
ggattggatc ggaggatcta tgatcctttg gcttcaagag catgttgtta tgcaccacct    14820
ccacactaac gatgttgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa    14880
gcctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttaccttt tgcctggtga    14940
```

```
gactatgtac gctttcaagc ttttgttcct cgacatctct gagcttgtta tgtggcgttg    15000
ggagggtgag cctatctcta agcttgctgg atacctcttt atgccttctt tgcttctcaa    15060
gcttaccttc tgggctagat tcgttgcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac    15120
tgctgtgtgt atcgctgcta ctgttatgac tggatctttc tacctcgctt tcttcttctt    15180
catctcccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttggacct gatggatcta tcacttctat    15240
gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc    15300
tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccctag    15360
agttcaccat ggattctacc ctagacttgc tcctcttgtt aaggctgagc ttgaggctag    15420
aggaatcgag tacaagcact accctactat ctggtctaac cttgcttcta ccctcagaca    15480
tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac    15540
gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa    15600
tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat    15660
tgtcaataaa tcatgaattt tgtggttttt atgtgttttt ttaaatcatg aattttaaat    15720
tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt    15780
tacccaaatc tagttcttga gaggatgaag catcaccgaa cagttctgca actatccctc    15840
aaaagcttta aaatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaaaca    15900
tattatctat actaatacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atccctgaat    15960
gattcctatt aactacaagc cttgttggcg gcggagaagt gatcggcgcg gcgagaagca    16020
gcggactcgg agacgaggcc ttggaagatc tgagtcgaac gggcagaatc agtattttcc    16080
ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaat ttttggccac    16140
cattcaattc tgtcttgcct ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggta agagaataaa    16200
aataatccaa attaaagcaa gagaggccaa gtaagataat ccaaatgtac acttgtcatt    16260
gccaaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata    16320
tgtattggct gcatttgcat gaataatact acgtgtaagc ccaaaagaac ccacgtgtag    16380
cccatgcaaa gttaacactc acgaccccat tcctcagtct ccactatata aacccaccat    16440
ccccaatctc accaaaccca ccacacaact cacaactcac tctcacacct taaagaacca    16500
atcaccacca aaaattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa    16560
ttacatttac aattaccata ccatgagcgc tgttaccgtt actggatctg atcctaagaa    16620
cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg    16680
aaacgtgttc tctgttcctg atttcaccat caaggacatc cttggagcta tccctcatga    16740
gtgttacgag agaagattgg ctacctctct ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat    16800
gcttaccacc ggatacctta cccataagat cctttaccct ctcctcatct cttacacctc    16860
taacagcatc atcaagttca ctttctgggc cctttacact tacgttcaag gacttttcgg    16920
aaccggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat    16980
cgtgaacgat ttcgttggat ggacccttca ctcttacctt atggttcctt acttcagctg    17040
gaagtactct catggaaagc accataaggc tactggacac atgaccagag atatggtttt    17100
cgttcctgcc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcggta acctcgctga    17160
gtactctgag gattctccac ttagaaccct ttacgagctt cttgttcaac aacttggagg    17220
atggatcgct tacctcttcg ttaacgttac aggacaacct taccctgatg ttccttcttg    17280
gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat    17340
cttccttttct gatcttggaa tcctcaccca gggaatcgtt cttactcttt ggtacaagaa    17400
attcggagga tggtcccttt tcatcaactg gttcgttcct tacatctggg ttaaccactg    17460
gctcgttttc atcacattcc ttcagcacac tgatcctact atgcctcatt acaacgctga    17520
ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagttcg gattcatcgg    17580
acctcacatc ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat    17640
cccattctac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagttatgg gaaagcacta    17700
caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaata    17760
cgttgacggt gataacggtg ttctcatgtt ccgtaacatc aacaactgcg gagttggagc    17820
tgctgagaag taatgaaggg gtgatcgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt    17880
taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg    17940
taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagaggc    18000
tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg    18060
gttctatcga attattcggc ggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta    18120
ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga    18180
```

```
tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcggcca    18240
gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca    18300
atctaaacaa gtcgctaggg accttccggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca    18360
gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtggt gatcgatgag atcgtataaa    18420
gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata    18480
aaaagagaga gaggctgatg gaatgttatg tatgtatgtt tcttggtttt taaaattaaa    18540
tggaaagcac atgctcgtgt gggttctatc tcgattaaaa atcccaatta tatttggtct    18600
aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt    18660
tttatatata tgcctttaag acttttttata gaattttctt taaaaaatat ctagaaatat    18720
ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt taaatatgaa gtgctccatt tttattaact    18780
ttaaataatt ggttgtacga tcactttctt atcaagtgtt actaaaatgc gtcaatctct    18840
ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaattc ttatatatct ttttcgaatt    18900
tgaagtgaaa tttcgataat ttaaaattaa atagaacata tcattattta ggtatcatat    18960
tgatttttat acttaattac taaatttggt taactttgaa agtgtacatc aacgaaaaat    19020
tagtcaaacg actaaaataa ataaatatca tgtgttatta agaaaattct cctataagaa    19080
tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt tactaacaca tatatttact    19140
tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga    19200
aaatgctgaa aacccggcaa aaccgaacca atccaaaccg atatagttgg tttggtttga    19260
ttttgatata aaccgaacca actcggtcca tttgcacccc taatcataat agctttaata    19320
tttcaagata ttattaagtt aacgttgtca atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa    19380
gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaag cagctcgatg tggtggtaat atgtaattta    19440
cttgattcta aaaaaatatc ccaagtatta ataatttctg ctaggaagaa ggttagctac    19500
gatttacagc aaagccagaa tacaaagaac cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga    19560
aggaacaaat atttttaaaa aaatacgcaa tgacttggaa caaaagaaag tgatatattt    19620
tttgttctta aacaagcatc ccctctaaag aatggcagtt ttcctttgca tgtaactatt    19680
atgctccctt cgttacaaaa attttggact actattggga acttcttctg aaaatagtcc    19740
tgcaggctag tagattggtt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg    19800
aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagttgtgt aaatgtatgt atatgtaatg    19860
tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga    19920
gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc    19980
ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa    20040
aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggt ctaggatctg attgtaattt    20100
tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata    20160
ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag    20220
acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat    20280
gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt    20340
agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt    20400
taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat    20460
cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac    20520
tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat    20580
gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat    20640
ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca    20700
acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct    20760
caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct    20820
gctatcttct ctgctaccga ctctattgga tggggactca agcctatctc ttctgctact    20880
aaggatctcc ctctcgttga atctcctacc cctcttatcc tttctctcct cgcttacttc    20940
gctatcgttg gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag    21000
gatcctttcc ttctcaaggc tcttatgctc gctcacaacg ttttccttat cggactcagc    21060
ctttacatgt gcctcaagct cgtttacgag gcttacgtga acaagtactc cttctgggga    21120
aacgcttaca accctgctca aaccgagatg gctaaggtga tctggatctt ctacgtgtcc    21180
aagatctacg agttcatgga caccttcatc atgcttctca agggaaacgt taaccaggtt    21240
tccttcctcc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctggtggat gatcacttat    21300
gctgctccag gtggagatgc ttacttctct gctgctctca actcttgggt tcatgtgtgc    21360
atgtacacct actacttcat ggctgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag    21420
```

```
tacctttggt ggggaagata ccttacccag atgcaaatgt tccagttctt catgaacctt    21480
ctccaggctg tttacctcct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgctcaactc    21540
ctcgttgttt acatggttac cctcctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac    21600
cacgcttcta agtgataagg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga aagtgtaata    21660
agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat aatgttatct    21720
ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcatatgat    21780
aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtcaa tttaaagata taagattctt taaatgatta    21840
aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg    21900
attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcagg    21960
gcggccgcgg atcccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta    22020
aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc    22080
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca    22140
gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga    22200
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc    22260
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt    22320
ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc    22380
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa    22440
tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagaga    22500
acacgggggа ctgaattaaa tatgagccct gagaggcgtc ctgttgaaat cagacctgct    22560
actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatcga gacttctacc    22620
gttaacttca gaactgagcc tcaaactcct caagagtgga tcgatgatct tgagagactc    22680
caagatagat acccttggct tgttgctgag gttgagggtg ttgttgctgg aatcgcttac    22740
gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacgtt    22800
tcacacagac atcagagact tggacttgga tctacccttt acactcacct tctcaagtct    22860
atggaagctc agggattcaa gtctgttgtt gctgttatcg gactccctaa cgatccttct    22920
gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagagc tgctggatac    22980
aagcacggtg gatggcatga tgttggattc tggcaaagag atttcgagct tcctgctcct    23040
cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgcg tgatcgttca aacatttggc    23100
aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc    23160
tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat    23220
gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat    23280
agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcatc tatgttacta gatcactagt    23340
gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt    23400
ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc    23460
gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt cc            23512
```

<210> 3
<211> 1254
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 12 desaturasa de Lachancea kluyveri en plantas

<400> 3

```
atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc       60
gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat      120
ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct      180
acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc      240
cataagatcc tttacctct cctcatctct tacacctcta acagcatcat caagttcact      300
ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct      360
catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg      420
acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga agtactctca tggaaagcac      480
```

```
cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg ttcctgccac caaagaggaa      540
ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt actctgagga ttctccactt      600
agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat ggatcgctta cctcttcgtt      660
aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga aatggaacca cttctggctt      720
acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct tcctttctga tcttggaatc      780
ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat tcggaggatg gtccctttc       840
atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc tcgttttcat cacattcctt      900
cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt      960
gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc     1020
atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc cattctacaa cgctagacct     1080
gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg     1140
tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt     1200
ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga           1254
```

<210> 4
<211> 416
<212> PRT
<213> Lachancea kluyveri

<400> 4

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

```
Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile
        275                 280                 285
Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
    290                 295                 300
Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305                 310                 315                 320
Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile
                325                 330                 335
Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg
            340                 345                 350
Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val
        355                 360                 365
Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu
    370                 375                 380
Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val
385                 390                 395                 400
Leu Met Phe Arg Asn Ile Asn Asn Cys Gly Val Gly Ala Ala Glu Lys
                405                 410                 415
```

<210> 5
<211> 1251
<212> ADN
<213> Pichia pastoris

<400> 5

```
atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgttagg       60
cgttctggaa acgttgcatc tttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac cttcggaaac      120
gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatatccttg acgctatccc taagcactgt      180
tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtggtga gagatatcgt ggctatctct      240
gctatcgctt acgttggact tacctacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc      300
gctgcttggt ctgcttacgt gttctctatc tcttgtttcg gattcggaat ctggatcctt      360
ggacatgagt gtggacattc tgctttctct aactacggat gggttaacga taccgttgga      420
tgggttctcc actctcttgt tatggttcct tacttcagct ggaagttctc tcatgctaag      480
caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctta caccgccgag      540
gaattcaaag agaagcacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc      600
tactctgttt tcgctctctt gttccaacag cttggaggac tttctcttta ccttgctact      660
aacgctactg gacaacctta ccctggtgtt tctaagttct tcaagtctca ctactggcct      720
tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggtacatcg ttctttctga tcttggaatc      780
cttgctaccc tcacttctgt ttacaccgct tacaaggttt tcggattctg gcctactttc      840
atcacatggt tctgtccttg gatccttgtt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt      900
cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgctcaag agtggacttt cgctaagggt      960
gctgctgcta ctatcgatag agagttcgga atcctcggaa tcatcttcca tgacatcatc     1020
gagactcatg tgctccatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct     1080
accgagtgca tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg     1140
gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tggtgtgtac     1200
atgttccgta actgcaacaa cgttggagtg aagcctaagg atacctgatg a              1251
```

<210> 6
<211> 415
<212> PRT
<213> Pichia pastoris

<400> 6

```
Met Ser Lys Val Thr Val Ser Gly Ser Glu Ile Leu Glu Gly Ser Thr
```

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

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

<210> 7

<211> 1392
<212> ADN
<213> Micromonas pusilla

<400> 7
atgtgcccgc cgaagacgga cggccgatcg tccccgcgat cgccgctgac gcgcagcaaa 60
tcctccgcgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg 120
ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat gggtgcgcgt ggaggacgtc 180
gagtacgacg tcacaaactt caaacacccg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg 240
aacacgggcg cggacgccac ggaggcgttc aaggagttcc acatgcgatc gcttaaggcg 300
tggaagatgc tcagagcgct gccgtcgcgc cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcgag 360
gacgcgccga tgttggagga tttcgcgcgg tggcgcgcgg agctcgaacg cgacgggttc 420
tttaagccct cgataacgca cgtcgcgtat cggttactcg agctcctcgc gaccttcgcc 480
ctcggcaccg ccctcatgta cgccgggtac ccgatcatcg cgtccgtcgt gtacggcgcg 540
ttcttcggcg ctcggtgcgg ttgggtccag cacgagggcg ggcacaactc gctcacgggg 600
tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtgcg ggttcgggct gtccacgagc 660
ggggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac 720
gacatggacc tggacacgac ccccgcggtg gcgtttttta acaccgccgt ggaggacaac 780
cggccgaggg ggttctcccg cgcgtgggct cggcttcagg cgtggacgtt cgtcccggtg 840
acctccgggc tgctcgtcca ggcgttctgg atctacgtcc tgcacccgcg gcaggtgttg 900
cgaaagaaga actacgagga ggcgtcgtgg atgctcgtct ctcacgtcgt caggaccgcg 960
gtgattaaac tcgcgacggg gtactcgtgg cccgtcgcgt actggtggtt caccttcggc 1020
aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctcccg 1080
gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactacg cggtcgatca caccgtggac 1140
atcgacccgt cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt 1200
catcacctgt tcccggacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc 1260
ccgttcgcga agaagtgggg gctgaactac aaggtgctgt cctattacgg cgcctggaag 1320
gcgacgttct cgaacttgga taaggtcggg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag 1380
aaggcgcact ga 1392

<210> 8
<211> 1395
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 6 desaturasa de Micromonas pusilla en plantas (versión 1)

<400> 8
atgtgccctc ctaagactga tggaagatct tctcctagat ctccacttac caggtctaaa 60
tcttctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctactg ctcctgttga tcttaagact 120
cttgagcctc atgagcttgc tgctactttc gagactagat gggttagagt tgaggacgtt 180
gagtacgatg tgactaactt caagcaccct ggtggatctg tgatcttcta catgcttgct 240
aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaattcc acatgcgttc tctcaaggct 300
tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360
gatgctccta tgcttgagga tttcgctaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc 420
ttcaagcctt ctatcaccca tgtggcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgct 480
cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacggtgct 540
ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacataactc tcttaccgga 600
tctgtttacg tggacaagag acttcaggct atgacttgtg gattcggact ttctacttct 660
ggtgagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcaaaa ggttagacac 720
gatatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca acactgctgt tgaggataac 780
agacctagag gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacttt cgttcctgtt 840

```
acctctggac ttcttgttca agctttctgg atctacgttc tccaccctag acaagttctc      900
cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcatgttgt tagaaccgct      960
gttatcaagc ttgctactgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga     1020
aactggatcg cttacatgta ccttttcgct cacttctcta cttctcatac tcacctccct     1080
gttgttccat ctgataagca cctttcttgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgat     1140
atcgatcctt ctagaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc     1200
caccacctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggttagcag aagattcgtt     1260
cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaag     1320
gctactttct ctaaccttga taaggtggga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag     1380
aaggctcact aatga                                                      1395

<210>  9
<211>  463
<212>  PRT
<213>  Micromonas pusilla

<400>  9
Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
1               5                  10                  15
Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser
            20                  25                  30
Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala
        35                  40                  45
Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val
    50                  55                  60
Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala
65                  70                  75                  80
Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg
                85                  90                  95
Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala
            100                 105                 110
Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe
        115                 120                 125
Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
    130                 135                 140
Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala
145                 150                 155                 160
Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val
                165                 170                 175
Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
            180                 185                 190
Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu
        195                 200                 205
Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp
    210                 215                 220
Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His
225                 230                 235                 240
Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala
                245                 250                 255
Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu
            260                 265                 270
Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala
        275                 280                 285
Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn
```

```
    290                 295                 300
Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala
305                 310                 315                 320
Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp
                325                 330                 335
Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe
            340                 345                 350
Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
        355                 360                 365
Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser
    370                 375                 380
Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
385                 390                 395                 400
His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
                405                 410                 415
Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val
            420                 425                 430
Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys
        435                 440                 445
Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His
    450                 455                 460
```

<210> 10
<211> 1449
<212> ADN
<213> Ostreococcus lucimarinus

<400> 10

```
atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cacgagctcg       60
tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac      120
gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac      180
gcgatcgcga agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg      240
acggatttta agcatcccgg aggatcggtt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg      300
gacgcgacgg aggcttttaa agagtttcat tatcggtcga aaaaggcgcg caaggcgttg      360
gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgaggcg      420
atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt ttttaagccc      480
tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcgg cgatgttcgc gctcggcacg      540
gcgttgatgc acgcgcgttg gcacgtcgct tccgtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc      600
gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggt gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg      660
tgggacaagc gaatccaagc cttcgccgcg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg      720
tggaacaaca tgcacaacaa gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat      780
ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgcccgcgg      840
ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccgt gacgtccggt      900
atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg cacccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc      960
ttcgaagaag cggcttggat gttttccgcg cacgtcattc gcacggcggt tatcaaagcc     1020
gtcaccggct actcctggat cgcctcgtac ggcttgttcg cggcgacgat gtgggcgagc     1080
ggatgttact tgttcgcgca cttttccacg tctcacacgc acttggatgt cgtgccgagc     1140
gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac     1200
aacagcgtcg tcaactggtt gatgggctac ttgaactgcc aagtcatcca tcacctgttc     1260
ccggatatgc ctcagttccg ccaacccgaa gtctcccgcc gattcgtccc gtttgcgaag     1320
aagtggaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaaggc gacgttcggc     1380
aacttgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctcagcgcgt caaatcaaag     1440
tcggcgtga                                                            1449
```

<210> 11
<211> 1449
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 6-desaturasa de Ostreococcus lucimarinus en plantas

<400> 11
atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct 60
tcttcttcac tctctgaggg tggaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat 120
gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttgga ccaaagagct tgagcctcac 180
gctatcgcta agaccttcga gagaagatac gttaccatcg agggtgttga gtacgatgtg 240
accgatttca aacaccctgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactggtgct 300
gatgctactg aggctttcaa agagttccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt 360
gctgctcttc ctcacaagcc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct 420
atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggatt cttcaagcct 480
tctcctgctc atgttgctta ccgtttcgct gaactcgctg ctatgttcgc tcttggaacc 540
gctcttatgc atgctagatg gcacgttgct agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga 600
gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg 660
tgggataaga gaatccaagc tttcgctgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg 720
tggaacaaca tgcacaacaa gcaccatgct actcctcaga aagtgagaca cgatatggat 780
cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg 840
ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttggacct tcgttcctgt tacctctgga 900
atggtgctct tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct 960
ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cacgttatca gaaccgctgt tatcaaggct 1020
gttaccggat actcttggat cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct 1080
ggatgctacc ttttcgctca cttctctact tctcacaccc acctcgatgt tgttccatct 1140
gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac 1200
aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc 1260
cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgctaag 1320
aagtggaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcgga 1380
aacctcaacg atgttggaaa gcactactac gttcacggat ctcagagagt gaagagcaag 1440
agcgcttga 1449

<210> 12
<211> 482
<212> PRT
<213> Ostreococcus lucimarinus

<400> 12
Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu
1 5 10 15
Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
20 25 30
Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala
35 40 45
Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
50 55 60
Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val
65 70 75 80
Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser

```
                85                  90                  95
Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
            100                 105                 110
Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
        115                 120                 125
Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
    130                 135                 140
Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
145                 150                 155                 160
Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
                165                 170                 175
Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
            180                 185                 190
Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
        195                 200                 205
Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
    210                 215                 220
Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
225                 230                 235                 240
Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
                245                 250                 255
His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
            260                 265                 270
Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
        275                 280                 285
Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe
    290                 295                 300
Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
305                 310                 315                 320
Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
                325                 330                 335
Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu
            340                 345                 350
Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
        355                 360                 365
Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
    370                 375                 380
Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn
385                 390                 395                 400
Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
                405                 410                 415
His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
            420                 425                 430
Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
        435                 440                 445
Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp
    450                 455                 460
Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
465                 470                 475                 480

Ser Ala
```

<210> 13

<211> 456
<212> PRT
<213> Ostreococcus lucimarinus

<400> 13
```
Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
1               5                  10                  15
Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
            20                  25                  30
Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
        35                  40                  45
Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
    50                  55                  60
Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
65                  70                  75                  80
Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
                85                  90                  95
Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
            100                 105                 110
Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
        115                 120                 125
Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
    130                 135                 140
Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
145                 150                 155                 160
Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
                165                 170                 175
Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
            180                 185                 190
Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
        195                 200                 205
Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
    210                 215                 220
His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
225                 230                 235                 240
Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
                245                 250                 255
Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
            260                 265                 270
Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
        275                 280                 285
Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
    290                 295                 300
Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe
305                 310                 315                 320
Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
                325                 330                 335
Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
            340                 345                 350
Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
        355                 360                 365
His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
    370                 375                 380
Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
```

```
385                 390                 395                 400
Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
                405                 410                 415
Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
            420                 425                 430
Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
        435                 440                 445
Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
    450                 455
```

<210> 14
<211> 894
<212> ADN
<213> Pyramimonas cordata

<400> 14
atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg 60
gtggtagccc ctgcaatttt ctcagctacc gacagcatcg gttggggtct taagcccatt 120
agcagcgcga caaaggatct tcctctcgtt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg 180
ttggcctatt ttgcgatcgt cggctctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctcgcaca 240
gtaaaggggc aagacccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttcctc 300
attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac 360
tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt 420
ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggcaac 480
gtcaaccagg tctctttcct gcatgtgtac catcatggct ccatctctgg tatctggtgg 540
atgatcacct acgctgcccc tggcggtgac gcgtacttct cggcggcgct caactcgtgg 600
gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccaa ggacgagaag 660
accaagcgca agtacctctg gtggggccgc tacctgaccc agatgcagat gttccagttc 720
ttcatgaacc tgctccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta ccccaagttc 780
atcgcccagc tgctggtggt gtacatggtc acgctgctga tgctcttcgg caacttctac 840
tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag 894

<210> 15
<211> 870
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 6 elongasa de Pyramimonas cordata en plantas (truncada en extremo 3' y que codifica para elongasa funcional) (versión 1)

<400> 15
atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgctgc tatcgatgct 60
gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120
tcttctgcta ctaaggactt gcctcttgtt gagtctccta cacctctcat cctttctttg 180
cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc 240
gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcacaa cgtgttcctt 300
atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac 360
tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc 420
ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaaat 480
gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg 540
atgattactt acgctgctcc tggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600
gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa 660

```
actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc      720
ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt      780
atcgctcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac      840
tacatgaagc accacgctag caagtgatga                                       870

<210>  16
<211>  297
<212>  PRT
<213>  Pyramimonas cordata

<400>  16
Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1               5                   10                  15
Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
            20                  25                  30
Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
        35                  40                  45
Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
    50                  55                  60
Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65                  70                  75                  80
Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
                85                  90                  95
Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
            100                 105                 110
Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
        115                 120                 125
Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
    130                 135                 140
Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145                 150                 155                 160
Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
                165                 170                 175
Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
            180                 185                 190
Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
        195                 200                 205
Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
    210                 215                 220
Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225                 230                 235                 240
Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
                245                 250                 255
Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
            260                 265                 270
Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
        275                 280                 285
Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln
    290                 295

<210>  17
<211>  288
<212>  PRT
<213>  Pyramimonas cordata
```

<400> 17
Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1 5 10 15
Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
20 25 30
Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
35 40 45
Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60
Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65 70 75 80
Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
85 90 95
Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
100 105 110
Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
115 120 125
Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
130 135 140
Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
165 170 175
Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
180 185 190
Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
195 200 205
Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220
Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240
Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255
Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270
Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

<210> 18
<211> 1278
<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 18
atgccgccgc gcgatagcta ctcgtacgcc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60
gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgtcatcg gtgaccgcgc gtacgacgtg 120
accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat 180
gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggtctgcca aggcggacaa gatgctcaag 240
tcgctgcctt cgcgcccggt gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc 300
gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg 360
cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420
tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480

tggctcatgc acgagggcgg ccactactcg ctcacgggca acattgcttt tgaccgtgcc 540
atccaagtcg cgtgctacgg ccttggctgc ggcatgtcgg gcgcgtggtg gcgcaaccag 600
cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660
ccgctcgtcg ccttccacga gcggatagcc gccaaggtga agagccccgc gatgaaggcg 720
tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgacca cgctgctggt cgcgctgggc 780
tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840
atgctcggca ttcgctacgg ccttgtcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcggggtac 900
gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctcggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960
gccgtgtcgc acacacacct gccggttgtc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020
tacgccgcga accacacgac caactgctcg ccctcgtggt ggtgcgactg gtggatgtcg 1080
tacctcaact accagatcga gcaccacctc tacccgtcca tgccgcagtt ccgccacccg 1140
aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcacta cgacgtgcgt 1200
ggctacttcg aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccg 1260
gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 19
<211> 1281
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 5 desaturasa de Pavlova salina en plantas (versión 1)

<400> 19
atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt 60
gatactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtt 120
accaacttcg ttaagagaca ccctggtgga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat 180
gctaccgatg cttacaagca gttccatgtt agatctgcta aggctgacaa gatgcttaag 240
tctcttcctt ctcgtcctgt tcacaaggga tactctccaa gaagggctga tcttatcgct 300
gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgagcc ttctcttcct 360
catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420
tggcatggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgtgga 480
tggcttatgc atgagggtgg acattactct ctcactggaa acattgcttt cgacagagct 540
atccaagttg cttgttacgg acttggatgt ggaatgtctg gtgcttggtg gcgtaaccag 600
cataacaagc accatgctac tcctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt 660
cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct 720
tggctttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga 780
tggcagcttt accttcatcc tagacacatg ctcaggacta agcactacga tgagcttgct 840
atgctcggaa tcagatacgg acttgttgga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900
gttctcgctt gttaccttct ttacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960
gctgtttctc atactcacct ccctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020
tacgctgcta accacactac taactgttct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgtct 1080
taccttaact accagatcga gcaccacctt taccccttcta tgcctcaatt cagacaccct 1140
aagatcgctc ctagagttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcacta cgatgttaga 1200
ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaaccttg ataacgttgc ccatgctcct 1260
gagaagaaaa tgcagtaatg a 1281

<210> 20
<211> 425
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 20

```
Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln
1               5                   10                  15
Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val
            20                  25                  30
Ile Gly Asp Arg Ala Tyr Asp Val Thr Asn Phe Val Lys Arg His Pro
        35                  40                  45
Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala
    50                  55                  60
Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys
65                  70                  75                  80
Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala
                85                  90                  95
Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu
            100                 105                 110
Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
        115                 120                 125
Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr
    130                 135                 140
Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly
145                 150                 155                 160
Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala
                165                 170                 175
Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met
            180                 185                 190
Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro
        195                 200                 205
Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala
    210                 215                 220
Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala
225                 230                 235                 240
Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu
                245                 250                 255
Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg
            260                 265                 270
Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu
        275                 280                 285
Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys
    290                 295                 300
Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe
305                 310                 315                 320
Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala
                325                 330                 335
Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser
            340                 345                 350
Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His
        355                 360                 365
His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro
    370                 375                 380
Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg
385                 390                 395                 400

Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val
                405                 410                 415
```

```
Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln
            420                 425

<210>  21
<211>  1329
<212>  ADN
<213>  Pyramimonas cordata

<400>  21
atgggaaagg gaggcaatgc tagcgctcct actgcgaaga aggaggtgtt gatcgagggg       60
aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtggtt cgatcatcaa gtttctctcg      120
ggttctggtg ctgacgccac cgcttcctac cgcgagttcc acgttaggtc agcgaaggca      180
gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg      240
gttgagttct ccaagctcaa cccgccctcc gcggagagtg cctctgctcc cctgaccgac      300
cttgccaagg tggaagcgct gaacaaggac ttcgaggctt tccgtgagca gctcattcag      360
gagggcttct ttaagcccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg      420
atgatggccg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttgttgt gaccctcgga      480
gttctgatcc gcggcattgc acagggccgg tgcggttggc ttatgcacga gggcggccac      540
tatagtctta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc      600
ggctgtggaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacccca      660
cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttcctc tgatggcttt caacaacgct      720
gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag      780
gccttcctct tcttccccgt gacctccctt ctggtcggcc tcggttggac caccgtcctc      840
caccccaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctcgt      900
tacgcgagtt tcgctgctct tttcgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc      960
tacctcgcca ccttcgctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac     1020
actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggtcgtgta ttcggccatc     1080
cacaccacta acatcaaatc cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc     1140
cagatcgagc atcacctgtt cccttcaatg ccccagttcc gccacaagat tatctccccg     1200
cgtgtaaagg ccttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg     1260
gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttggca ctcacgcatc tcactccaag     1320
gcgcactag                                                            1329

<210>  22
<211>  442
<212>  PRT
<213>  Pyramimonas cordata

<400>  22
Met Gly Lys Gly Gly Asn Ala Ser Ala Pro Thr Ala Lys Lys Glu Val
1               5                  10                  15
Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly
            20                  25                  30
Gly Ser Ile Ile Lys Phe Leu Ser Gly Ser Gly Ala Asp Ala Thr Ala
        35                  40                  45
Ser Tyr Arg Glu Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Phe Leu
    50                  55                  60
Lys Thr Leu Pro Ser Arg Glu Ala Thr Pro Gln Glu Leu Lys Gln Ala
65                  70                  75                  80
Val Glu Phe Ser Lys Leu Asn Pro Pro Ser Ala Glu Ser Ala Ser Ala
                85                  90                  95
Pro Leu Thr Asp Leu Ala Lys Val Glu Ala Leu Asn Lys Asp Phe Glu
            100                 105                 110
Ala Phe Arg Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Phe Phe Lys Pro Asn Ile
```

```
        115                 120                 125
Pro His Val Val Lys Arg Ile Thr Glu Val Val Ala Met Met Ala Val
    130                 135                 140
Ala Ser Trp Met Met Val Gln Thr Asn Ala Leu Val Val Thr Leu Gly
145                 150                 155                 160
Val Leu Ile Arg Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Met His
                165                 170                 175
Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Lys Ile Ser Ile Asp Arg Arg
            180                 185                 190
Leu Gln Glu Ser Ile Tyr Gly Phe Gly Cys Gly Met Ser Gly Ala Trp
        195                 200                 205
Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gln
    210                 215                 220
His Asp Val Asp Leu Glu Thr Leu Pro Leu Met Ala Phe Asn Asn Ala
225                 230                 235                 240
Val Thr Asp Arg Arg Lys Val Lys Pro Gly Ser Leu Gln Ala Leu Trp
                245                 250                 255
Leu Lys Tyr Gln Ala Phe Leu Phe Phe Pro Val Thr Ser Leu Leu Val
            260                 265                 270
Gly Leu Gly Trp Thr Thr Val Leu His Pro Arg His Ser Leu Arg Thr
        275                 280                 285
Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe
    290                 295                 300
Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu
305                 310                 315                 320

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

<210> 23
<211> 804
<212> ADN
<213> Pyramimonas cordata

<400> 23

```
atggcgtcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat       60
gtcgcaaacc cagatattcc tgcatccgag aaggtgcctg cttactttat gcaggtcgag      120
tattgggggc caacgattgg gaccatcggt tatcttctgt tcatctactt tggtaaacgg      180
attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggt gtacaacttc      240
tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcacgtcgca ccgcgctcag      300
```

```
gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag      360
gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacgtt cttcatggtc      420
atgcgcaaga agtttgacca gctttcgttc ctgcacattt accatcatac cctgttgatc      480
tggtcttggt tcgtggtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc      540
gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tcgtactatg gccttgccgc gctcggggtg      600
aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct      660
tcgcactcga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgcgt tctggttgcc ttacttgcag      720
ctgtgggtga tggtgaacat gttcgtgttg ttcgccaact tctatcgcaa gcgctacaag      780
agcaagggtg ccaagaagca gtaa                                             804

<210>  24
<211>  807
<212>  ADN
<213>  Secuencia Artificial

<220>
<223>  Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 5
elongasa de Pyramimonas cordata en plantas (versión 1)

<400>  24
atggcctcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat       60
gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag      120
tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt      180
atcatgcaga acagatctca acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc      240
taccagacct tcttcaacag ctactgcatc tacctttttcg ttacttctca tagggctcag     300
ggacttaagg tttggggaaa catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag      360
gttatctggc ttcactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg      420
atgaggaaga agttcgacca gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc      480
tggtcatggt tcgttgttat gaagcttgag cctgttggag attgctactt cggatcttct      540
gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt      600
aactgtttct ggaagaagta catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct      660
tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttaccttcaa      720
ctctgggtta tggtgaacat gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag      780
tctaagggtg ctaagaagca gtgataa                                          807

<210>  25
<211>  267
<212>  PRT
<213>  Pyramimonas cordata

<400>  25
Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr
1               5                  10                  15
Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val
            20                  25                  30
Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr
        35                  40                  45
Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn
    50                  55                  60
Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe
65                  70                  75                  80
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser
                85                  90                  95
His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
```

```
           100                 105                 110
Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
        115                 120                 125
Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
    130                 135                 140
Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile
145                 150                 155                 160
Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr
                165                 170                 175
Phe Gly Ser Ser Val Asn Thr Phe Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr
            180                 185                 190
Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile
        195                 200                 205
Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile
    210                 215                 220
Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln
225                 230                 235                 240
Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg
                245                 250                 255
Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln
            260                 265
```

<210> 26
<211> 1344
<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 26

```
atgcctccga gcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca       60
gattcgtcgg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt      120
gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcatc cgggtggcgc gcactttgtg      180
tcgctgttcg gcgggcgcga tgccacggag gcgttcatgg agtaccaccg gcgcgcctgg      240
cccaagtcgc gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc      300
gccgccgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcatcg ccaagatggt gccgtcggtc      360
agcagcgggt tcgcgccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg      420
atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgcc tgctcccgtc gatcgtgctc      480
gggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc      540
tccaagtcgg cctcggtcaa cctggcgctc gggttgtgcc aggactggat cggcgggagc      600
atgatcctct ggctgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac      660
aaggacccgg accagaaggc gcacggcgcc ctgcggctca agccgaccga cgcgtggagc      720
ccgatgcact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag      780
ctgctgtttc tcgacatcag cgagctggtg atgtggcggt gggagggcga gcccatcagc      840
aagctggccg ggtacctctt catgccctcg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc      900
tttgtcgcgc tgccgctgta cctcgcgccc agcgtgcaca cggcggtgtg catcgcggcg      960
acggtaatga cggggagctt ctacctcgcc ttcttcttct tcatctcgca caacttcgag     1020
ggcgtggcga gcgtcggacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcatccttc     1080
ctcaagcggc aggccgagac ctcgtccaac gtgggcggcc cgctgctcgc cacgctcaac     1140
ggcggcctca actaccaaat cgagcaccac ctcttcccca gggtgcacca cggcttctac     1200
cctcgcctcg cgccgttggt caaggcggag ctcgaggcgc gcggcattga gtacaagcac     1260
taccccacca tatggagcaa cctggcatcc acgctgaggc acatgtacgc gctcggccgc     1320
aggccgcgca gcaaggcgga gtga                                            1344
```

<210> 27
<211> 1347

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 4 desaturasa de Pavlova salina en plantas (versión 1)

<400> 27
atgccaccta gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tggtgttact 60
gactcttctg ctttcaccag aaaggatgtt gctgatagac ctgatctcac catcgttgga 120
gattctgttt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt 180
tctttgttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggcttgg 240
cctaagtcta gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt 300
gctgctgatg agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt 360
tcttctggat tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct 420
atcgctcttg aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt 480
ggatggcttt tcgctcttat cggtcttaac atccagcatg atgctaacca tggtgctttg 540
tctaagtctg cttctgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600
atgatccttt ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat 660
aaggatcctg atcaaaaggc tcacggtgct cttagactca agcctactga tgcttggtca 720
cctatgcatt ggcttcagca tctttacctt ttgcctggtg agactatgta cgctttcaag 780
cttttgttcc tcgacatctc tgagcttgtt atgtggcgtt gggagggtga gcctatctct 840
aagcttgctg gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga 900
ttcgttgctt tgcctcttta ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct 960
actgttatga ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcatctccca caacttcgag 1020
ggtgttgctt ctgttggacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc 1080
cttaagagac aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140
ggtggactca actaccaaat tgagcatcac ttgttcccta gagttcacca tggattctac 1200
cctagacttg ctcctcttgt taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260
taccctacta tctggtctaa ccttgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320
aggcctagat ctaaggctga gtaatga 1347

<210> 28
<211> 447
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 28
Met Pro Pro Ser Ala Ala Lys Gln Met Gly Ala Ser Thr Gly Val His
1 5 10 15
Ala Gly Val Thr Asp Ser Ser Ala Phe Thr Arg Lys Asp Val Ala Asp
20 25 30
Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala
35 40 45
Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly
50 55 60
Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp
65 70 75 80
Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr
85 90 95
Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg
100 105 110
Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser
115 120 125

```
Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu
    130                 135                 140
Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu
145                 150                 155                 160

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

<210>  29
<211>  263
<212>  PRT
<213>  Isochrysis galbana

<400>  29
Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
1               5                   10                  15
Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
            20                  25                  30
Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
        35                  40                  45
```

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

<210> 30
<211> 801
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Marco abierto de lectura optimizado por codones para expresión de 9 elongasa de Emiliania huxleyi en plantas

<400> 30

```
atgcttgata gagcttcatc tgatgctgct atttggagcg ctgtttctga tcctgagatc       60
cttatcggaa ccttctctta ccttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttgtg      120
gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt      180
ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaactggt      240
gagtggctta gatctcttac tggtgattct cctcaacaac tttggcagtg cccttctaga      300
gtttgggaca gcaaactctt cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacgtt      360
gagtaccttg atactgcttg gcttgttctc aagggaaaga aggtttcatt cctccaggga      420
ttccatcatt tcggtgctcc atgggatgtt taccttggaa tcaggcttaa gaacgaggga      480
gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccacactg ttatgtacac ttactacgga      540
cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaatctct      600
caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg tttccatgct      660
gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggatc tgttttcctt      720
cttttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt      780
gctaccagaa aggctctttg a                                                801
```

<210> 31
<211> 266
<212> PRT
<213> Emiliania huxleyi

<400> 31
Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser
1 5 10 15
Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30
Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45
Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr
50 55 60
Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Lys Gly Thr Gly
65 70 75 80
Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln
85 90 95
Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys
100 105 110
Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125
Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe
130 135 140
Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly
145 150 155 160
Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr
165 170 175
Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro
180 185 190
Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu
195 200 205
Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln
210 215 220
Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu
260 265

<210> 32
<211> 819
<212> ADN
<213> Pavlova pinguis

<400> 32
atggttgcgc cacccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg 60
ttcggtgggg aggtgctcta cttctccatt gcctacctgt ttcttgcgcc cattttgaag 120
cgcacccgt tggtggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac 180
gtgatcatgt gcgtgttctc gctggtgtgc ttcatctgcc agctcgcagc cctgggctat 240
gacatgggct acttgcagtg ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt ccccctctac 300
caggacgtgt ccccgtcccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc 360

```
ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctggtgat gaagggcaag      420
cccgtgtcct tgctccaggg cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc      480
atcaccttcc agaacgaggg catctacgtg ttcgtggtgc tcaacgcctt catccacacg      540
atcatgtacg catactacgc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagttcgtc      600
atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatggtgta tcactacatc      660
accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctcgtcttct cctacctttt caactatgcg      720
tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag      780
aagaaggccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag                              819
```

<210> 33
<211> 272
<212> PRT
<213> Pavlova pinguis

<400> 33

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

Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln
        195                 200                 205
Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr
    210                 215                 220
Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala
225                 230                 235                 240
Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp
                245                 250                 255
Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys
            260                 265                 270
```

<210> 34
<211> 840

<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 34
atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cgggctgaag 60
gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttcgcttg ggtatctgct gctcgagccc 120
atcctcaagc gctcaccgtt tgtggacaag cgcaagggcg cataccgcaa cggcatgatc 180
gcgtacaaca tcctcatgtg cggtttctcg ctggtatgct tcgtgtgcca gatggcggcg 240
ctcggccttg atcgcggcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcga cagcgtggtg 300
cagctctacc aggacgtgag cccatcccct gcattcgcga acaagctctt ccggtactca 360
gcggtggcgt tccactactc aaagtacgtg gagtacatgg acacagcgtg gcttgtgctg 420
aagggcaagc ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccact tcggcgccgc gtgggacacc 480
tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctacgtct ttgtgctgct caacgcattc 540
atccacacaa tcatgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg 600
aagccgctga tcaccctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac 660
ccgtacattg acctcggcta cttccgtgcg tcgcccgagc tcgtgtggag ctacctgttc 720
aactatgcgt acgtactcat ggtgctcttc ctcttcatgc gcttcttcta ccacgacaac 780
tttagcaagc acaagccaat ctcgcgcatc gactccagca accgcatgaa aaccgagtag 840

<210> 35
<211> 279
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 35
Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser
1 5 10 15
Pro Gly Leu Lys Asp Ala Val Ile Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser
20 25 30
Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val
35 40 45
Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile
50 55 60
Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala
65 70 75 80
Leu Gly Leu Asp Arg Gly His Leu Gln Phe Val Arg Asp Leu Thr Gly
85 90 95
Asp Ser Val Val Gln Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe
100 105 110
Ala Asn Lys Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Val Ala Phe His Tyr Ser Lys
115 120 125
Tyr Val Glu Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Leu Lys Gly Lys Pro
130 135 140
Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr
145 150 155 160
Tyr Phe Gly Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Thr Tyr Val Phe Val Leu
165 170 175
Leu Asn Ala Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ala Thr
180 185 190
Ala Ala Gly Ile Lys Ile Ser Met Lys Pro Leu Ile Thr Leu Met Gln
195 200 205
Ile Thr Gln Phe Leu Leu Gly Phe Ala Leu Val Tyr Pro Tyr Ile Asp
210 215 220
Leu Gly Tyr Phe Arg Ala Ser Pro Glu Leu Val Trp Ser Tyr Leu Phe

```
225                 230                 235                 240
Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Met Val Leu Phe Leu Phe Met Arg Phe Phe
                245                 250                 255
Tyr His Asp Asn Phe Ser Lys His Lys Pro Ile Ser Arg Ile Asp Ser
            260                 265                 270
Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu
        275
```

<210> 36
<211> 1284
<212> ADN
<213> Pavlova salina

<400> 36

```
atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag gcgcatccgg cggcggagct ggcggtcccg       60
agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc      120
aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttccgg      180
atcttccagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgatc      240
aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc      300
tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt      360
tactacgatc catgcccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc      420
tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggctccc cgctctgcgg cgccctcatg      480
gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctcgcgcacg actatctgca ccactccgtc      540
ttcaaggggt ccgtcgcacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta cttcctcggc      600
ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtggtgg cgcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc      660
accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc      720
aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttccagc gctaccagca gtactactat      780
gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg      840
atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctcgcactcg tcgcgcacta cgccatcgtc      900
gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgctcg tgacggttct gcgcgggttt      960
ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag     1020
gtgcgtcaca tgacgctcgt cgagcagacg gcactcacct cgcgcaacat ctcgggcggc     1080
tggctcgtga acgtgctcac cggcttcatc tcactgcaga cggagcacca cctgttcccg     1140
atgatgccaa ccggcaacct catgactatc cagcccgagg tgcgcgcctt cttcaagaag     1200
cacggacttg agtaccgcga gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtgcg     1260
cttgcattcg agcacctgct ttga                                            1284
```

<210> 37
<211> 427
<212> PRT
<213> Pavlova salina

<400> 37

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

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

<210> 38
<211> 116
<212> PRT
<213> Virus de hoja doblada amarilla de tomate

<400> 38

```
Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1               5                   10                  15
Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
            20                  25                  30
```

```
Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
        35                  40                  45
Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
    50                  55                  60
His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65                  70                  75                  80
Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
                85                  90                  95
Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn
            100                 105                 110
Val Ser Lys Pro
        115
```

<210> 39
<211> 351
<212> ADN
<213> Virus de hoja doblada amarilla de tomate

<400> 39

```
atgtgggatc cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgtta       60
gctattaaat atttgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat      120
ttaattaggg atcttatatc tgttgtaagg gcccgtgact atgtcgaagc gaccaggcga      180
tataatcatt tccacgcccg cctcgaaggt tcgccgaagg ctgaacttcg acagcccata      240
cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta      300
caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a               351
```

<210> 40
<211> 389
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 40

```
Met Val Ile Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Leu Leu Phe Phe
1               5                   10                  15
Ile Ser Gly Leu Ala Val Asn Leu Phe Gln Ala Val Cys Tyr Val Leu
            20                  25                  30
Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
        35                  40                  45
Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
    50                  55                  60
Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65                  70                  75                  80
Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
                85                  90                  95
Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
            100                 105                 110
Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
        115                 120                 125
Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
    130                 135                 140
Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Ser Asp Phe
145                 150                 155                 160
Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
                165                 170                 175
```

```
Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
            180                 185                 190
Pro Ile Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
        195                 200                 205
Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
    210                 215                 220
Val Thr Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225                 230                 235                 240
Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
                245                 250                 255
Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
            260                 265                 270
Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
        275                 280                 285
Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
    290                 295                 300
Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Val Leu Thr Leu Gly Ala Ile
305                 310                 315                 320
Lys Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Thr
                325                 330                 335
Ile Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
            340                 345                 350
Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
        355                 360                 365
Ala Lys Pro Lys Asp Asn His His Pro Glu Ser Ser Ser Gln Thr Glu
    370                 375                 380
Thr Glu Lys Glu Lys
385
```

<210> 41
<211> 281
<212> PRT
<213> Limnanthes alba

<400> 41

```
Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys
1               5                   10                  15
Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met
            20                  25                  30
Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu
        35                  40                  45
Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp
    50                  55                  60
Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly
65                  70                  75                  80
Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser
                85                  90                  95
Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro
            100                 105                 110
Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly
        115                 120                 125
Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr
    130                 135                 140
Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala
```

```
145                 150                 155                 160
Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu
                165                 170                 175
Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu
            180                 185                 190
Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln Ser His Leu
        195                 200                 205
Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys
    210                 215                 220

Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro
225                 230                 235                 240
Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val
                245                 250                 255
Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys
            260                 265                 270
Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys
        275                 280
```

<210> 42
<211> 303
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 42

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

```
225                 230                 235                 240
Thr Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Ser Pro Ala Ile Asn Asp Thr Thr Leu
                245                 250                 255
Pro Pro Gln Ala Ile Glu Tyr Ala Ala Leu Gln His Asp Lys Lys Val
            260                 265                 270
Asn Lys Lys Ile Lys Asn Glu Pro Val Pro Ser Val Ser Ile Ser Asn
        275                 280                 285
Asp Val Asn Thr His Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Lys Met His
    290                 295                 300
```

<210> 43
<211> 373
<212> PRT
<213> Micromonas pusilla

<400> 43

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

```
Ser Ala Gly Gln Phe Glu Gly Val Arg Glu Trp Ser Thr Ser Gly Thr
305                 310                 315                 320

Ala Val Pro Leu Lys Thr Gln Thr Ala Leu Arg Cys Phe Phe Val Leu
                325                 330                 335
Gln Gly Leu Val Cys Val Gly Val Ala Cys Ser Ser Thr Ala Phe Leu
            340                 345                 350
Ala Tyr Val Ala Cys Ala Ala Val Gly Ala Ala Val Ile Ala Gln Thr
        355                 360                 365
Asp Pro Ala Trp Trp
    370

<210>  44
<211>  314
<212>  PRT
<213>  Mortierella alpina

<400>  44
Met Ser Ile Gly Ser Ser Asn Pro Val Leu Leu Ala Ala Ile Pro Phe
1               5                   10                  15
Val Tyr Leu Phe Val Leu Pro Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro Gln Lys
            20                  25                  30
Ala Gln Phe Leu Ala Lys Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Thr Leu Ile
        35                  40                  45
Met Ser Val Ala Gly Cys Phe Ile Ser Ile Val Cys Ala Leu Leu Asp
    50                  55                  60
Lys Arg Tyr Val Ile Asn Tyr Val Val Ser Arg Leu Phe Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80
Ala Ala Arg Pro Cys Gly Val Thr Tyr Lys Ile Val Gly Glu Glu His
                85                  90                  95
Leu Asp Lys Tyr Pro Ala Ile Val Val Cys Asn His Gln Ser Ser Met
            100                 105                 110
Asp Met Met Val Leu Gly Arg Val Phe Pro Lys His Cys Val Val Met
        115                 120                 125
Ala Lys Lys Glu Leu Leu Tyr Phe Pro Phe Leu Gly Met Phe Met Lys
    130                 135                 140
Leu Ser Asn Ala Ile Phe Ile Asp Arg Lys Asn His Lys Lys Ala Ile
145                 150                 155                 160
Glu Ser Thr Thr Gln Ala Val Ala Asp Met Lys Lys His Asn Ser Gly
                165                 170                 175
Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Leu Asp Lys Ala Asp
            180                 185                 190
Leu Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His Leu Ala Ile Gln Ala Gln
        195                 200                 205
Leu Pro Ile Leu Pro Ile Ile Ser Gln Gly Tyr Ser His Ile Tyr Asp
    210                 215                 220
Ser Ser Lys Arg Tyr Phe Pro Gly Gly Glu Leu Glu Ile Arg Val Leu
225                 230                 235                 240
Glu Pro Ile Pro Thr Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asp Val Asn Asp Leu
                245                 250                 255
Met Asp Lys Thr Arg Asn Leu Met Leu Lys His Leu Lys Glu Met Asp
            260                 265                 270
Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Asn Gly Ser Thr His Ile Asp
        275                 280                 285
```

```
Ala Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ala Thr Ser Ile Gly Asn Thr Asp Asp
    290                 295                 300
Ala Ile Thr Lys Arg Arg Thr Pro Lys Glu
305                 310

<210>  45
<211>  391
<212>  PRT
<213>  Braccisa napus

<400>  45
Met Ala Met Ala Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe
1               5                   10                  15
Phe Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Cys Tyr Val
            20                  25                  30
Leu Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val
        35                  40                  45
Val Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp
    50                  55                  60
Ala Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asp Glu Thr Phe Asn Arg
65                  70                  75                  80
Met Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile
                85                  90                  95
Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
            100                 105                 110
Ser Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
        115                 120                 125
Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp
    130                 135                 140
Ala Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp
145                 150                 155                 160
Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
                165                 170                 175
Thr Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Gln
            180                 185                 190
Leu Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
        195                 200                 205
Ser Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met
    210                 215                 220
Thr Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu
225                 230                 235                 240
Phe Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser
                245                 250                 255
Met Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg
            260                 265                 270
Asp Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala
        275                 280                 285
Asp Thr Phe Pro Gly Gln Lys Glu His Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys
    290                 295                 300
Ser Leu Ala Val Val Val Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
305                 310                 315                 320
Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Leu Lys Gly Ile
                325                 330                 335
Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
```

```
            340                 345                 350
Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
        355                 360                 365
Pro Ala Lys Pro Lys Asp Lys His Gln Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
    370                 375                 380
Glu Val Glu Glu Lys Gln Lys
385                 390
```

<210> 46
<211> 390
<212> PRT
<213> Braccisa napus

<400> 46

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

```
Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Ala
                325                 330                 335
Phe Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
            340                 345                 350
Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
        355                 360                 365
Ala Lys Pro Lys Asp Asn His Asn Asp Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
    370                 375                 380
Glu Val Glu Lys Gln Lys
385                 390
```

<210> 47
<211> 361
<212> PRT
<213> Phytophthora infestans

<400> 47

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

```
    290                 295                 300
His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
305                 310                 315                 320
Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val
                325                 330                 335
Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
            340                 345                 350
Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
        355                 360
```

<210> 48
<211> 418
<212> PRT
<213> Thalassiosira pseudonana

<400> 48

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

Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys
65                  70                  75                  80
Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met
                85                  90                  95
Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val
            100                 105                 110
Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr
        115                 120                 125
Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp
    130                 135                 140
Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp
145                 150                 155                 160
Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr
                165                 170                 175
Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His
            180                 185                 190
Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu
        195                 200                 205
Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg
    210                 215                 220
Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile
225                 230                 235                 240
Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val
                245                 250                 255
Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys
            260                 265                 270
Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr
        275                 280                 285
Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met
```

```
    290                 295                 300
Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp
305                 310                 315                 320
Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser
                325                 330                 335
Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His
            340                 345                 350
Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu
        355                 360                 365
Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys
    370                 375                 380
His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val
385                 390                 395                 400
Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys
                405                 410                 415
Arg Glu
```

<210> 49
<211> 363
<212> PRT
<213> Pythium irregulare

<400> 49

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

```
Val Val Thr Thr Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr
                245                 250                 255
Ala Asp Ser Glu Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp
            260                 265                 270
Arg Ser Tyr Gly Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr
        275                 280                 285
His Gln Ile His His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn
    290                 295                 300
Asp Ala Thr Ala Ala Phe Ala Lys Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys
305                 310                 315                 320
Asn Ala Ala Pro Ile Ile Pro Thr Phe Phe Arg Met Ala Ala Met Tyr
                325                 330                 335
Ala Lys Tyr Gly Val Val Asp Thr Asp Ala Lys Thr Phe Thr Leu Lys
            340                 345                 350
Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Ser
        355                 360
```

<210> 50
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 50
gcgaagcaca tcgagtca 18

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 51
ggttgaggtg gtagctgagg 20

<210> 52
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = Hex

<220>
<221> misc_feature

<222> (9)..(9)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 52
ntctctacnc cgtctcacat gacgcn 26

<210> 53
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 53
atacaagcac ggtggatgg 19

<210> 54
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 54
tggtctaaca ggtctaggag ga 22

<210> 55
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = FAM

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature

<222> (29)..(29)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 55
ntggcaaaga ngatttcgag cttcctgcn 29

<210> 56
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 56
caagcaccgt agtaagagag ca 22

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 57
cagacagcct gaggttagca 20

<210> 58
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = FAM

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> N = Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> N = 3IABkFQ

<400> 58
ntccccactt ncttagcgaa aggaacgan 29

REIVINDICACIONES

1. Lípido vegetal extraído, que comprende ácidos grasos en forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido αlinolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístco (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído, si está presente, es menor que 1 %, y donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %.

2. Lípido vegetal o lípido microbiano extraído que comprende ácidos grasos en forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y

ácido docosapentaenoico (DPA) y opcionalmente uno o más ácidos estearidónicos (SDA), ácidos eicosapentaneoicos (EPA), y ácidos eicosatetranoicos (ETA), donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 7 % y 35 %.

3. El lípido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene una o más de las siguientes características:

i) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 15 % o entre alrededor de 3 % y alrededor de 10 %,

ii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de alrededor de 0.1 %,

iii) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 1 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 3 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 6 % y alrededor de 30 %, entre 1 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 60 %, alrededor de 45 % a alrededor de 60 %, alrededor de 30% o entre alrededor de 15 % y alrededor de 30 %,

iv) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total

de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 4 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 4 % y alrededor de 17 % o entre alrededor de 5 % y alrededor de 10 %,

v) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 40 %, entre alrededor de 7 % y alrededor de 40 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 4 % y 16 % o entre alrededor de 2 % y 16 %,

vi) el nivel de ácido γ-linolénico (GLA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que 4 %, menor que alrededor de 3 %, menor que alrededor de 2 %, menor que alrededor de 1 %, menor que alrededor de 0.5 %, entre 0.05 % y 7 %, entre 0.05 % y 4 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

vii) el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que alrededor de 10 %, menor que alrededor de 8 %, menor que alrededor de 7 %, menor que alrededor de 6 %, menor que alrededor de 4 %, menor que alrededor 3 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 7 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 6 %, entre 0.05 % y alrededor de 4 %, entre

alrededor de 0.05 % y alrededor de 3 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 10 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

viii) el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que alrededor de 6 %, menor que alrededor de 5 %, menor que alrededor de 4 %, menor que alrededor de 1 %, menor que alrededor de 0.5 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 6 %, entre 0.05 % y alrededor de 5 %, entre 0.05 % y alrededor de 4 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2%,

ix) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que 4 %, menor que alrededor de 2 %, menor que alrededor de 1 %, entre 0.05 % y 4 %, entre 0.05 % y 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 % o entre 0.05 % y alrededor de 1 %,

x) el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 4 % y 15 %, menor que 4 %, menor que alrededor de 3 %, menor que alrededor de 2 %, entre 0.05 % y 10 %, entre 0.05 % y 5 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

xi) si el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %, el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que 4 %, menor que alrededor de 3 %, menor que alrededor de 2 %, entre 0.05 % y 8 %, entre 0.05 % y 5 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 %, entre 5 % y 15 %, entre 5 % y 10 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

xii) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de alrededor de 22 %, alrededor de 24 %, alrededor de 26 %, alrededor de 28 %, alrededor de 31 %, entre 20.1 % y 29 %, entre 20.1 % y 28 %, entre 20.1 % y alrededor de 27 %, entre 20.1 % y alrededor de 26 %, entre 20.1 % y alrededor de 25 %, entre 20.1 % y alrededor de 24 %, entre 21 % y 35 %, entre 21 % y 30 %, entre 21 % y 28 %, entre 21 % y alrededor de 26 % o entre 21 % y alrededor de 24 %,

xiii) el lípido comprende ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácidos grasos,

xiv) el lípido comprende menos que 0.1 % de ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácido graso,

xv) el lípido comprende menos que 0.1 % de uno o más o

todos de SDA, EPA y ETA en su contenido de ácidos grasos,

xvi) el nivel total de ácidos grasos saturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 25 %, entre alrededor de 4 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 6 % y alrededor de 20 % o entre alrededor de 6 % y alrededor de 12 %,

xvii) el nivel total de ácidos grasos monoinsaturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 40 %, entre alrededor de 4 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 8 % y alrededor de 25 %, entre 8 % y alrededor de 22 %, entre alrededor de 15 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 15 % y alrededor de 35 %,

xviii) el nivel total de ácidos grasos poliinsaturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 20 % y alrededor de 75 %, entre 30 % y 75 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 75 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 % o entre alrededor de 60 % y alrededor de 75 %,

xix) el nivel total de ácidos grasos ω6 en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre

alrededor de 35 % y alrededor de 50 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 6 % y 20 %, menor que 20 %, menor que alrededor de 16%, menor que alrededor de 10 %, entre alrededor de 1 % y alrededor de 16 %, entre alrededor de 2 % y alrededor de 10 % o entre alrededor de 4 % y alrededor de 10 %,

xx) el nivel de ácidos grasos ω6 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que alrededor de 10 %, menor que alrededor de 8 %, menor que alrededor de 6 %, menor que 4 %, entre alrededor de 1 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 1 % y alrededor de 10 %, entre 0.5 % y alrededor de 8 %, o entre alrededor de 0.5 % y 4 %,

xxi) el nivel total de ácidos grasos ω3 en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 36 % y alrededor de 65 %, entre 36 % y alrededor de 70 %, entre 40 % y alrededor de 60 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 60 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 60 %, entre 40 % y alrededor de 65 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 65 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 65 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 % o alrededor de 70 %,

xxii) el nivel de ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 21 % y alrededor de 45 %, entre 21 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 23 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 25 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 27 % y alrededor de 35 %, alrededor de 23 %, alrededor de 25 %, alrededor de 27 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 % o alrededor de 45 %,

xxiii) la relación de total de ácidos grasos ω6:total de ácidos grasos ω3 en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 1.0 y alrededor de 3.0, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 1, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 0.5, menor que alrededor de 0.50, menor que alrededor de 0.40, menor que alrededor de 0.30, menor que alrededor de 0.20, menor que alrededor de 0.15, alrededor de 1.0, alrededor de 0.1, de alrededor de 0.10 a alrededor de 0.4 o alrededor de 0.2,

xxiv) la relación de ácidos grasos ω6 nuevos:ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 1.0 y alrededor de 3.0, entre alrededor de 0.02 y alrededor de 0.1, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 1, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 0.5, menor que alrededor de 0.50, menor que

alrededor de 0.40, menor que alrededor de 0.30, menor que alrededor de 0.20, menor que alrededor de 0.15, alrededor de 0.02, alrededor de 0.05, de alrededor de 0.1 a alrededor de 0.2 o alrededor de 1.0,

xxv) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por Δ12-desaturasa de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 98%, entre alrededor de 70 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 90 %,

xxvi) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a SDA mediante Δ6-desaturasa de al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 70 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 60 % o entre alrededor de 50 % y alrededor de 70 %,

xxvii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA mediante Δ6-elongasa de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, entre

alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 88 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 85 %,

xxviii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ETA a EPA mediante Δ5-desaturasa de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 99 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 99 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 98 %,

xxix) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de EPA en DPA mediante Δ5-elongasa de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, entre alrededor de 50% y alrededor de 99 %, entre alrededor de 85 % y alrededor de 99 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 85 % y alrededor de 95 %,

xxx) si el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %, la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de DPA en DHA mediante Δ4-desaturasa de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 93 %, entre

alrededor de 50 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 80 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 85 % y alrededor de 95 %,

xxxi) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico en DPA y/o DHA de al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 50%, entre alrededor de 10 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 25 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

xxxii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de LA en DPA y/o DHA de al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 25 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, entre alrededor de 15 % y alrededor de 50 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

xxxiii) la composición de ácidos grasos del lípido se

basa en una eficacia de conversión de ALA en DPA y/o DHA de al menos alrededor de 17 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 24 %, al menos alrededor de 30 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, entre alrededor de 22 % y alrededor de 70%, entre alrededor de 17 % y alrededor de 55 %, entre alrededor de 22 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 24 % y alrededor de 40 %,

xxxiv) el total de ácidos grasos en el lípido extraído tiene menos que 1.5 % C20:1, menos que 1 % C20:1 o alrededor de 1 % C20:1,

xxxv) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 99 % o entre alrededor de 90 % y alrededor de 99 %,

xxxvi) el lípido comprende diacilglicerol (DAG), donde dicho DAG comprende preferentemente DHA y/o DPA,

xxxvii) el lípido comprende menos de alrededor de 10 %, menos de alrededor de 5 %, menos de alrededor de 1 % o entre alrededor de 0.001 % y alrededor de 5 %, ácidos grasos libres (no esterificados) y/o fosfolípido o es

esencialmente libre de estos,

xxxviii) al menos 70 %, al menos 72 % o al menos 80 %, del DHA y/o DPA esterificado en forma de TAG está en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG,

xxxix) la especie de TAG que contiene DHA de manera más abundante en el lípido es DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12),

xl) la especie de TAG que contiene DPA de manera más abundante en el lípido es DPA/18:3/18:3 (TAG 56:12),

xli) el lípido comprende TAG con tri-DHA (TAG 66:18), y

xlii) el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 12 %, alrededor de 15 %, alrededor de 18 %, alrededor de 20 %, alrededor de 22 %, alrededor de 24 %, alrededor de 26 %, alrededor de 28 %, alrededor de 31 %, entre alrededor de 7 % y alrededor de 31 %, entre alrededor de 7 % y alrededor de 28 %, entre alrededor de 10 % y 35 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 25 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 22 %, entre alrededor de 14 % y 35 %, entre alrededor de 16 % y 35 %, entre alrededor de 16 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 16 % y alrededor de 25 % o entre alrededor de 16 % y alrededor de 22 %,

opcionalmente donde el nivel de DHA es menor que 0.5 % del contenido total de ácidos grasos del lípido extraído.

4. El lípido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el lípido es un aceite, preferentemente un aceite de una oleaginosa, más preferentemente donde el lípido comprende o es aceite de ***Brassica sp.,*** tal como aceite de ***Brassica napus*** o aceite de ***Brassica juncea,*** aceite de ***Gossypium hirsutum***, aceite de ***Linum usitatissimum***, aceite de ***Helianthus sp.***, aceite de ***Carthamus tinctorius***, aceite de ***Glycine max***, aceite de ***Zea mays***, aceite de ***Elaesis guineenis***, aceite de ***Nicotiana benthamiana***, aceite de ***Lupinus angustifolius***, aceite de ***Camelina sativa***, aceite de ***Crambe abyssinica***, aceite de ***Miscanthus x giganteus*** o aceite de ***Miscanthus sinensis.***

5. Un proceso para producir un lípido vegetal extraído que comprende las siguientes etapas:

i) obtener una parte de una planta, donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden

ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más ácidos eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído, si está presente, es menor que 1 %, y donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble en la parte de la planta es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %, y

ii) extraer el lípido de la parte de la planta,

donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %.

6. Un proceso para producir un lípido vegetal extraído o lípido microbiano, que comprende las siguientes etapas:

i) obtener una parte de una planta o de una célula microbiana que comprende lípidos, donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos

grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble en la parte de la planta es de entre 7% y 35%, y

ii) extraer el lípido de la parte de la planta o la célula microbiana,

donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 7 % y 35 %.

7. El proceso de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, donde el lípido extraído tiene una o más de las características definidas en la reivindicación 3 o la reivindicación 4.

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la parte de la planta es una semilla, preferentemente una oleaginosa tal como *Brassica sp.* tal como *Brassica napus* o *Brassica juncea, Gossypium hirsutum, Linum usitatissimum, Helianthus sp., Carthamus tinctorius, Glycine max, Zea mays, Elaesis guineenis, Nicotiana*

benthamiana, Lupinus angustifolius, Camelina sativa, o Crambe abyssinica, preferentemente una semilla de *Brassica napus, B. juncea* o *C. sativa*.

9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde la parte de la planta o la célula microbiana comprende polinucleótidos exógenos que codifican una o más de las siguientes enzimas;

i) una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa,una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongase y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iv) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

v) una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vi) una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-

desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vii) una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

viii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

ix) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

x) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

xi) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

xii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

y donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de la

planta o de la célula microbiana.

10. El proceso de la reivindicación 9, donde la parte de la planta o la célula microbiana tiene una o más o todas de las siguientes características

i) la Δ12-desaturasa convierte ácido oleico en ácido linoleico en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana con una eficacia de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 90 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 85 %,

ii) la ω3-desaturasa convierte ácidos grasos ω6 en ácidos grasos ω3 en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana con una eficacia de al menos alrededor de 65 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 85 %, entre alrededor de 65 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 75 % y alrededor de 91 % o entre alrededor de 80 % y alrededor de 91 %,

iii) la Δ6-desaturasa convierte ALA en SDA en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana con una eficacia de al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos

alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 70 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 60 % o entre alrededor de 50 % y alrededor de 70 %,

iv) la Δ6-desaturasa convierte ácido linoleico en ácido γ-linolénico en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana con una eficacia menor que alrededor de 5 %, menor que alrededor de 2.5 %, menor que alrededor de 1 %, entre alrededor de 0.1 % y alrededor de 5 %, entre alrededor de 0.5 % y alrededor de 2.5 % o entre alrededor de 0.5 % y alrededor de 1 %,

v) la Δ6-elongasa convierte SDA en ETA en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana con una eficacia de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 80 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 80 %,

vi) la Δ5-desaturasa convierte ETA en EPA en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana con una eficacia de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de

70 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 95 %,

vii) la Δ5-elongasa convierte EPA en DPA en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana con una eficacia de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 90 % o entre alrededor de 85 % y alrededor de 95 %,

viii) la Δ4-desaturasa convierte DPA en DHA en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 93 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 80 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 85% y alrededor de 95 %,

ix) la eficacia de conversión de ácido oleico en DHA o DPA en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana es de al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 50%, entre alrededor de 10 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 25 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

x) la eficacia de conversión de LA en DHA o DPA en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana es de al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 25 %, al menos alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, entre alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, entre alrededor de 15 % y alrededor de 50 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

xi) la eficacia de conversión de ALA en DHA o DPA en una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana es de al menos alrededor de 17 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 24 %, al menos alrededor de 30 %, alrededor de 30 %, entre alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, entre alrededor de 17 % y alrededor de 55 %, entre alrededor de 22 % y alrededor de 35 % o entre alrededor de 24 % y alrededor de 35 %,

xii) una o más células de la parte de la planta o la célula microbiana comprenden al menos alrededor de 25 %, al menos alrededor de 30 %, entre alrededor de 25 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 27.5 % y alrededor de 37.5 %, más de ácidos grasos ω3 que las células correspondientes que carecen de polinucleótidos exógenos,

xiii) la Δ6-desaturasa preferentemente desatura el ácido

α-linolénico (ALA) en relación con ácido linoleico (LA),

xiv) la Δ6-elongasa tiene, además, actividad de Δ9-elongasa,

xv) la Δ12-desaturasa tiene, además, actividad de Δ15-desaturasa,

xvi) la Δ6-desaturasa tiene, además, actividad de Δ8-desaturasa,

xvii) la Δ8-desaturasa tiene, además, actividad de Δ6-desaturasa o no tiene actividad de Δ6-desaturasa,

xviii) la Δ15-desaturasa tiene, además, actividad de ω3-desaturasa en GLA,

xix) la ω3-desaturasa tiene, además, actividad de Δ15-desaturasa en LA,

xx) la ω3-desaturasa desatura ambos LA y/o GLA,

xxi) la ω3-desaturasa preferentemente desatura GLA en relación con LA,

xxii) una o más o todas las desaturasas tienen mayor actividad en un sustrato de acil-CoA que un sustrato de acil-PC correspondiente,

xxiii) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad de Δ6-desaturasa en ALA que en LA como sustrato de ácido graso,

xxiv) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad de Δ6-desaturasa en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en

ALA unida a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,

xxv) la Δ6-desaturasa tiene al menos alrededor de una actividad de Δ6-desaturasa 2 veces mayor, al menos una actividad 3 veces mayor, al menos una actividad 4 veces mayor, o al menos actividad 5 veces mayor, en ALA como un sustrato en comparación con LA,

xxvi) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA unida a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,

xxvii) la Δ6-desaturasa tiene al menos alrededor de una actividad de Δ6-desaturasa 5 veces mayor o al menos una actividad 10 veces mayor, en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA unida a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,

xxviii) la desaturasa es una desaturasa del extremo delantero,

xxix) la Δ6-desaturasa no tiene actividad de Δ5-desaturasa detectable en ETA.

11. El proceso de la reivindicaciones 9 o reivindicación 10, donde la parte de la planta o la célula microbiana comprende además un polinucleótido exógeno que codifica una

diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT), glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT) preferentemente una LPAAT que puede usar un sustrato de acil-CoA de ácido graso poliinsaturado C22 tal como DHA-CoA y/o DPA-CoA, acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT), fosfolipasa A_2 (PLA_2), fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD), CDP colina diacilglicerol colinofosfotransferasa (CPT), fosfatidilcolina diacilglicerol aciltransferasa (PDAT), fosfatidilcolina:diacilglicerol colinofosfotransferasa (PDCT), acil-CoA sintasa (ACS), o una combinación de dos o más de estos.

12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde los polinucleótidos exógenos se enlazan covalentemente en una molécula de ADN, preferentemente una molécula de ADN-T, integrada al genoma de las células de la parte de la planta o la célula microbiana y preferentemente donde la cantidad de dichas moléculas de ADN integradas al genoma de las células de la parte de la planta o la célula microbiana no es más de una, no más de dos o tres, o es dos o tres.

13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, donde el contenido total de aceite de la parte de la planta o la célula microbiana que comprende polinucleótidos exógenos es de al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 80 %, o entre alrededor de 80 % y alrededor de 100 % del contenido total de aceite de una parte de la planta o célula microbiana correspondiente que carece de polinucleótidos exógenos.

14. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13 que comprende además tratar el lípido para aumentar el nivel de DHA y/o DPA como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos, donde el tratamiento comprende una o más de fraccionamiento, destilación o transesterificación, tal como la producción de ésteres de metilo o etilo de DHA y/o DPA.

15. Una planta oleaginosa o una parte de esta que comprende a) un lípido en su semilla, donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores específicos de la semilla que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla en desarrollo de la planta, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y opcionalmente ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido de la semilla es de entre 20.1 % y 30 %, o entre 20.1 % y 35 %, y donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y

donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido, si está presente, es menor que 1 %.

16. Una planta oleaginosa que comprende lípido en su semilla, o una parte de esta, o una célula microbiana, que comprende

a) un que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

iv) una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores específicos de las semillas que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla de la planta en desarrollo o uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula microbiana, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA) y ácido docosapentaenoico (DPA) y opcionalmente ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido de la semilla o la célula microbiana es de entre 7 % y 35 %.

17. Una planta ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** que es capaz de producir semillas que comprendan DHA y/o DPA, donde la semilla madura cosechada de la planta tiene un contenido de DHA y/o DPA de al menos alrededor de 28 mg por gramo de semilla, preferentemente al menos alrededor de 32 mg por gramo de semilla, al menos alrededor de 36 mg por gramo de semilla, al menos alrededor de 40 mg por gramo de

semilla, más preferentemente al menos alrededor de 44 mg por gramo de semilla o al menos alrededor de 48 mg por gramo de semilla, alrededor de 80 mg por gramo de semilla, o entre alrededor de 30 mg y alrededor de 80 mg por gramo de semilla.

18. Una célula vegetal de la reivindicación 15 o la reivindicación 16 que comprende los polinucleótidos exógenos.

19. Una parte de una planta, preferentemente una semilla o una célula microbiana que tiene una o más de las siguientes características
i) es de una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17,
ii) comprende lípido tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o
iii) se puede utilizar en un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14.

20. Semilla cosechada madura de ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** que comprende DHA y/o DPA y un contenido de humedad de entre alrededor de 4 % y alrededor de 15 % en

peso, preferentemente alrededor de 6 % y alrededor de 8 % en peso o entre alrededor de 4 % y alrededor de 8 % en peso, donde el contenido de DHA y/o DPA de la semilla es de al menos alrededor de 28 mg por gramo de semilla, preferentemente alrededor de 32 mg por gramo de semilla, al menos alrededor de 36 mg por gramo de semilla, al menos alrededor de 40 mg por gramo de semilla, más preferentemente al menos alrededor de 44mg por gramo de semilla o al menos alrededor de 48mg por gramo de semilla, alrededor de 80 mg por gramo de semilla, o entre alrededor de 30 mg y alrededor de 80 mg por gramo de semilla.

21. Un método para producir una planta o una célula microbiana que se puede utilizar para producir el lípido vegetal extraído o el lípido microbiano extraído de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1 a 4, donde el método comprende

a) estudiar el nivel de DHA y/o DPA en el lípido producido por una o más partes de plantas o células microbianas a partir de múltiples plantas o células microbianas, donde cada planta o célula microbiana comprende uno o más polinucleótidos exógenos que codifican uno o más conjuntos de enzimas;

i) una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa,una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongase y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iv) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

v) una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vi) una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vii) una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

viii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

ix) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

x) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

xi) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

xii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de una planta o de la célula microbiana, y

b) identificar una planta o célula microbiana, a partir de las múltiples plantas o células microbianas, que se puede utilizar para producir el lípido vegetal o lípido microbiano extraído de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una o más de sus partes, y

c) opcionalmente, producir células microbianas o plantas de progenie de la célula microbiana o planta identificada, o

semilla de esta.

22. Un método para producir una semilla, donde el método comprende,

a) cultivar una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, o una planta que produce una parte de la planta de la reivindicación 19, o que produce una semilla de la reivindicación 20, preferentemente en un campo como parte de una población de al menos 1000 o 2000 o 3000 de dichas plantas o en un área de al menos 1 hectárea o 2 hectáreas o 3 hectáreas plantadas a una densidad de plantación estándar,

b) cosechar la semilla de la planta o las plantas, y

c) opcionalmente, extraer el lípido de la semilla, preferentemente para producir aceite con un rendimiento total de DHA y/o DPA de al menos 60 kg, 70 kg o 80 kg de DHA y/o DPA/hectárea.

23. La planta, célula vegetal, parte de planta o semilla, o célula microbiana, de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, con una o más de las siguientes características

i) comprende aceite tal como se define en la reivindicación 3 o la reivindicación 4, y

ii) la parte de la planta o la célula microbiana se puede utilizar en un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14.

24. Lípido o aceite producido u obtenido al utilizar el proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la planta oleaginosa de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, la célula microbiana de la reivindicación 16, la planta ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** de la reivindicación 17, la parte de la planta de la reivindicación 19, o la semilla de la reivindicación 20.

25. Polvo de semilla obtenido de la semilla de la reivindicación 20, u obtenida de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

26. Una composición de uno o más del lípido o el aceite de la reivindicación 24, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la célula vegetal o la célula microbiana de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación20, o el polvo de semilla de la reivindicación 25.

27. Piensos, cosméticos o productos químicos que comprenden uno o más del lípido o el aceite de la reivindicación 24, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la planta oleaginosa de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, la célula vegetal o la célula microbiana de la reivindicación 23, la planta ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** de la reivindicación 17, la parte de la planta de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación 20, el polvo de semilla de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 26.

28. Un método para producir piensos, donde el método comprende mezclar uno o más del lípido o el aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la planta oleaginosa de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, la célula vegetal o la célula microbiana de la reivindicación 23, la planta ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** de la reivindicación 17, la parte de la planta de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación 20, el polvo de semilla de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 26, con al menos

otro ingrediente alimenticio.

29. Uso de uno o más del lípido o el aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la célula vegetal o la célula microbiana de la reivindicación 23, la parte de la planta de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación 20, el polvo de semilla de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 26, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección que se podría beneficiar de un PUFA.

LÍPIDO QUE COMPRENDE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA

RESUMEN

Lípidos extraídos de plantas o lípidos microbianos que comprenden ácido docosahexaenoico y/o ácido docosapentaenoico, y procesos para producir los lípidos extraídos.

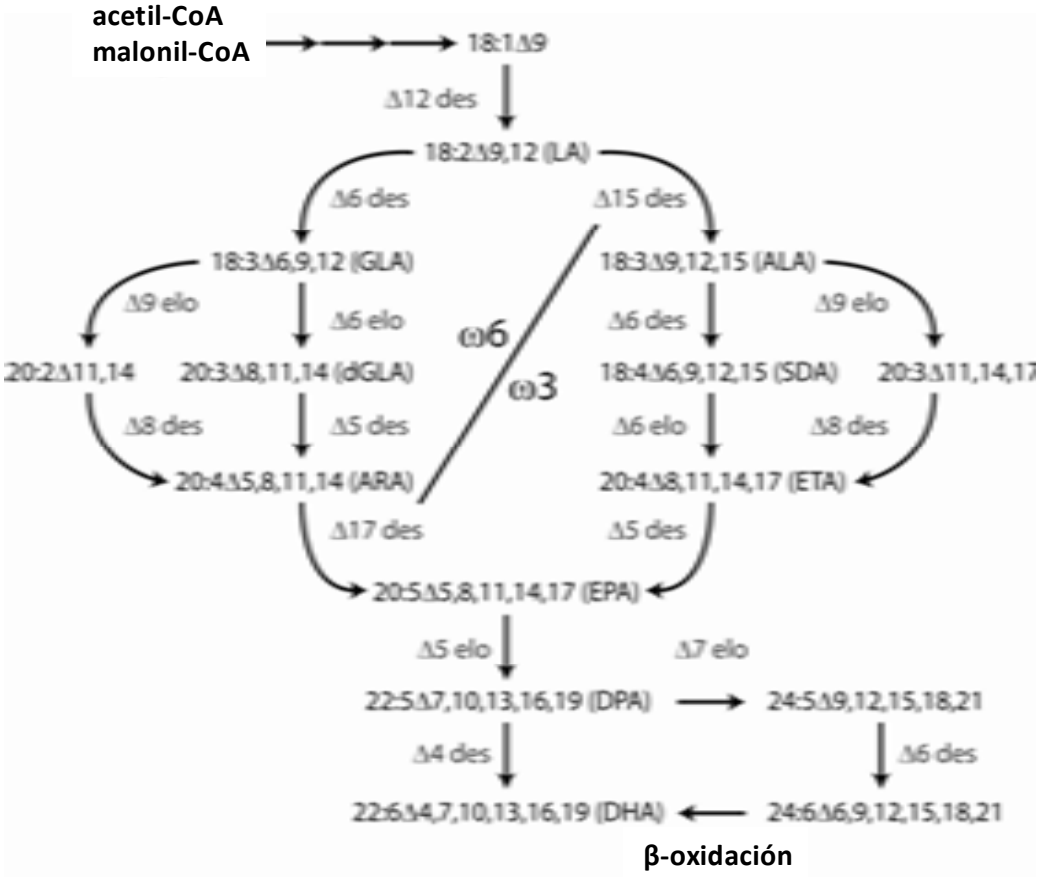

acetil-CoA
malonil-CoA
18:1Δ9
Δ12 des
18:2Δ9,12 (LA)
Δ6 des
Δ15 des
18:3Δ6,9,12 (GLA)
18:3Δ9,12,15 (ALA)
Δ9 elo
Δ6 elo
Δ6 des
Δ9 elo
20:2Δ11,14
20:3Δ8,11,14 (dGLA)
ω6
ω3
18:4Δ6,9,12,15 (SDA)
20:3Δ11,14,17
Δ8 des
Δ5 des
Δ6 elo
Δ8 des
20:4Δ5,8,11,14 (ARA)
20:4Δ8,11,14,17 (ETA)
Δ17 des
Δ5 des
20:5Δ5,8,11,14,17 (EPA)
Δ5 elo
Δ7 elo
22:5Δ7,10,13,16,19 (DPA)
24:5Δ9,12,15,18,21
Δ4 des
Δ6 des
22:6Δ4,7,10,13,16,19 (DHA)
24:6Δ6,9,12,15,18,21
β-oxidación

Figura 1

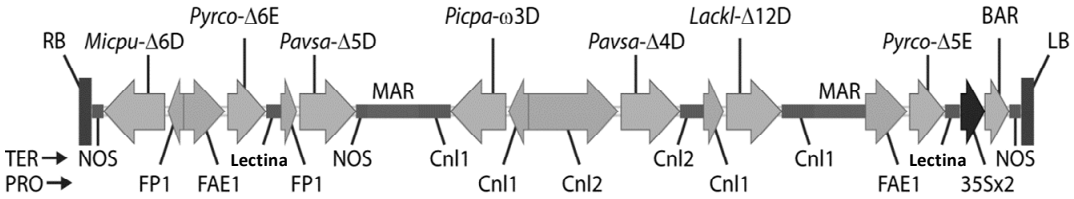

RB
Micpu-Δ6D
Pyrco-Δ6E
Pavsa-Δ5D
MAR
Picpa-ω3D
Pavsa-Δ4D
Lackl-Δ12D
MAR
Pyrco-Δ5E
BAR
LB
TER
PRO
NOS
FP1
FAE1
Lectina
FP1
NOS
Cnl1
Cnl1
Cnl2
Cnl2
Cnl1
Cnl1
FAE1
Lectina
35Sx2
NOS

Figura 2

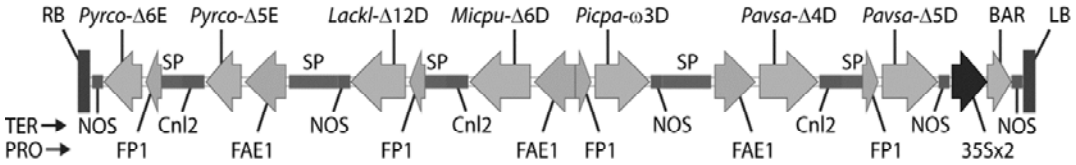

RB
Pyrco-Δ6E
Pyrco-Δ5E
Lackl-Δ12D
Micpu-Δ6D
Picpa-ω3D
Pavsa-Δ4D
Pavsa-Δ5D
BAR
LB
SP
TER
PRO
NOS
FP1
Cnl2
FAE1
35Sx2

Figura 3

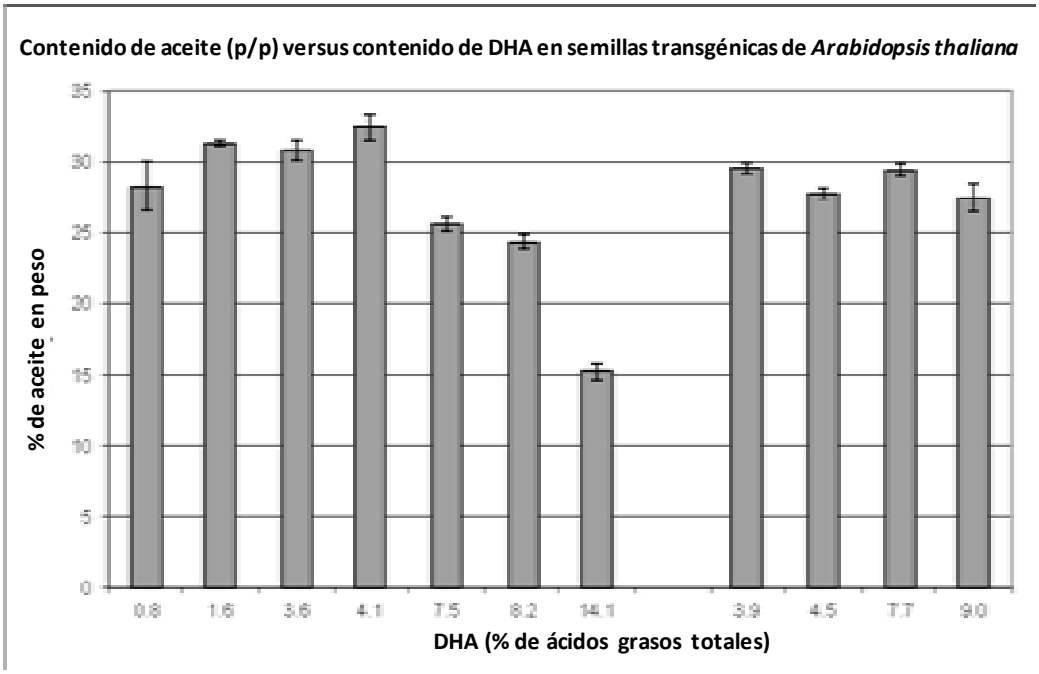

Contenido de aceite (p/p) versus contenido de DHA en semillas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*
% de aceite en peso
35
30
25
20
15
10
5
0
0.8
1.6
3.6
4.1
7.5
8.2
14.1
3.9
4.5
7.7
9.0
DHA (% de ácidos grasos totales)

Figura 4

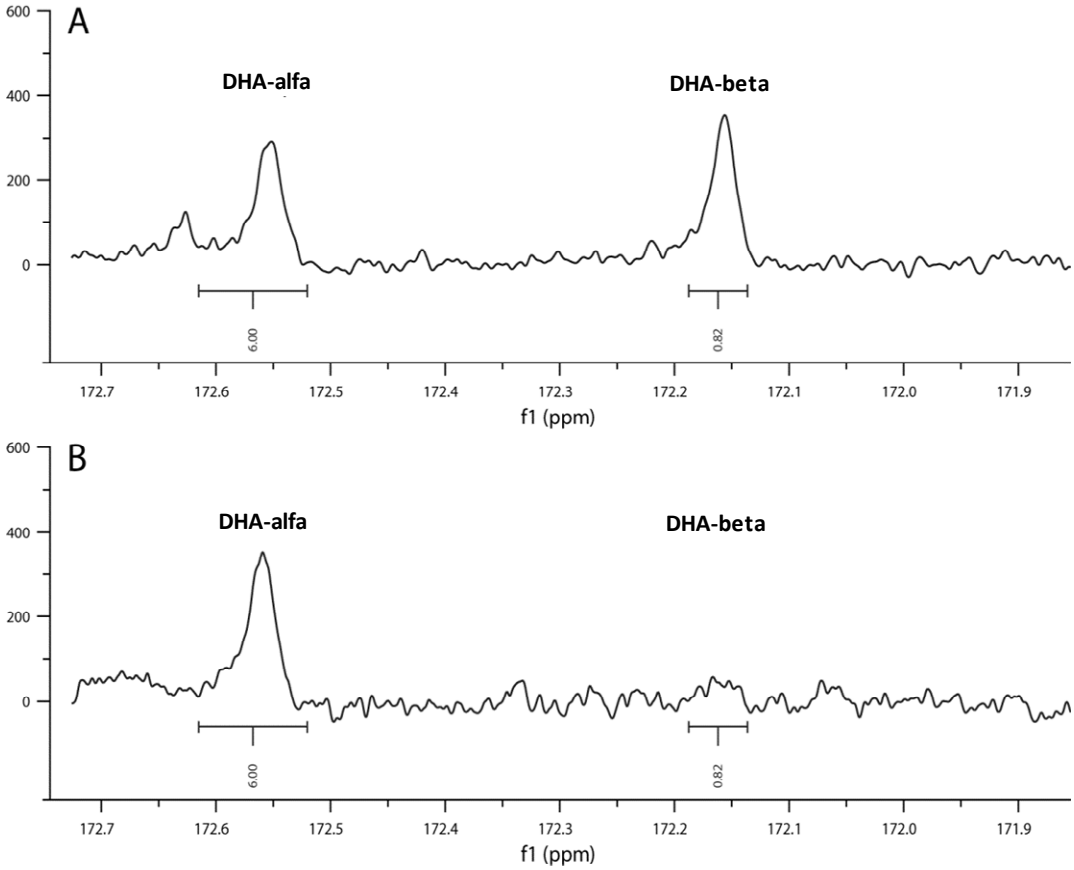

A
DHA-alfa
DHA-beta
600
400
200
0
6.00
0.82
172.7
172.6
172.5
172.4
172.3
172.2
172.1
172.0
171.9
f1 (ppm)
B
DHA-alfa
DHA-beta
600
400
200
0
6.00
0.82
172.7
172.6
172.5
172.4
172.3
172.2
172.1
172.0
171.9
f1 (ppm)

Figura 5

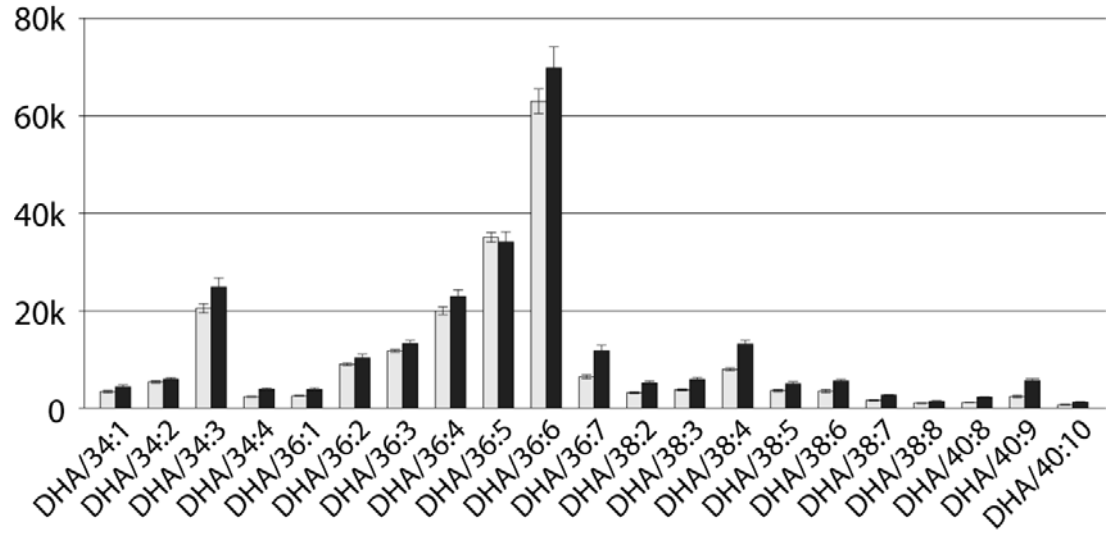
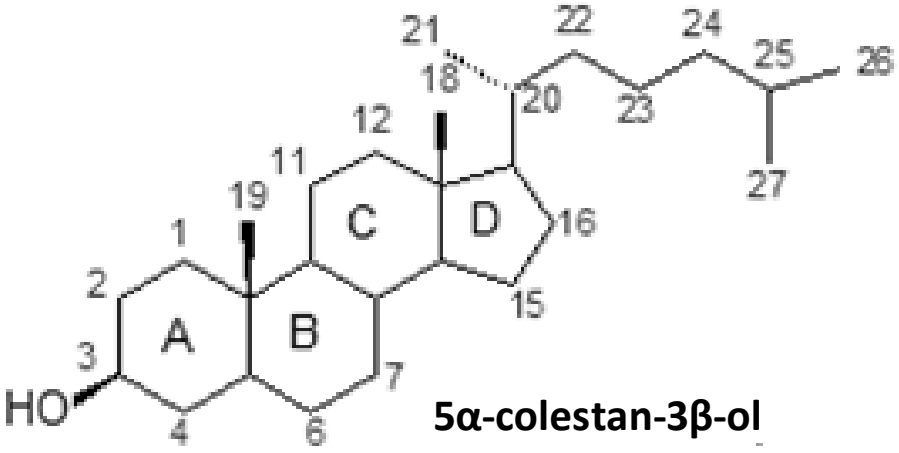

80k
60k
40k
20k
0
DHA/34:1
DHA/34:2
DHA/34:3
DHA/34:4
DHA/36:1
DHA/36:2
DHA/36:3
DHA/36:4
DHA/36:5
DHA/36:6
DHA/36:7
DHA/38:2
DHA/38:3
DHA/38:4
DHA/38:5
DHA/38:6
DHA/38:7
DHA/38:8
DHA/40:8
DHA/40:9
DHA/40:10

Figura 6

A)


21
22
24
25
26
18
20
23
27
12
11
19
C
D
16
1
2
15
A
B
3
7
HO
4
6
5α-colestan-3β-ol

B)

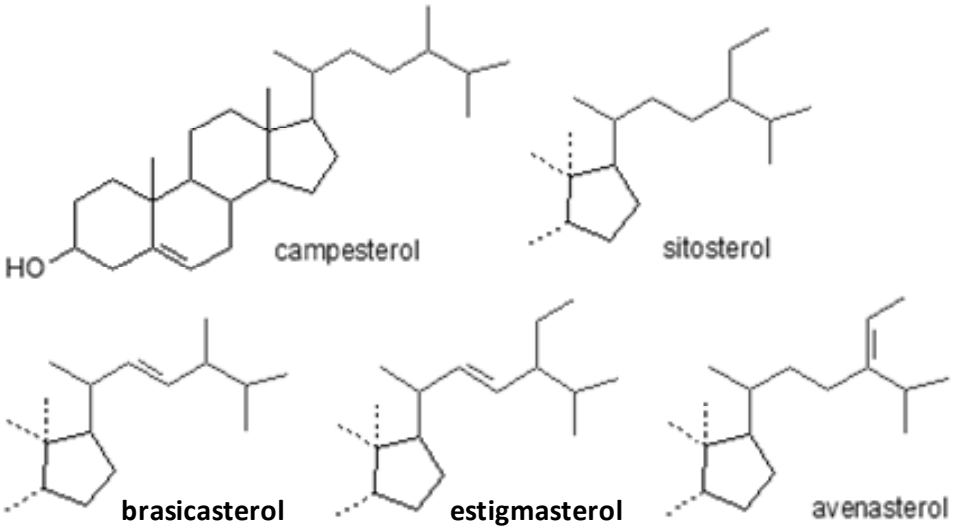

HO
campesterol
sitosterol
brasicasterol
estigmasterol
avenasterol

Figura 7

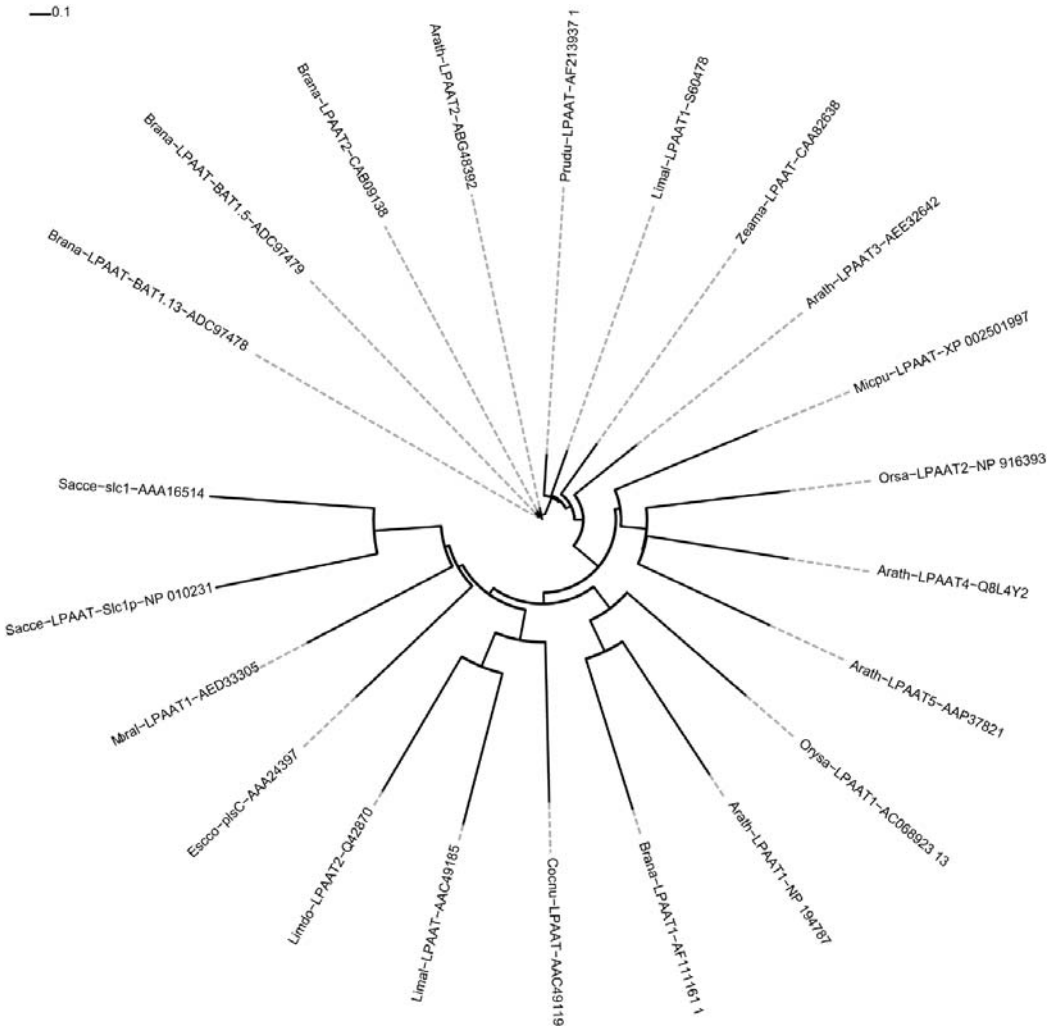

0.1
Arath-LPAAT2-ABG48392
Prudu-LPAAT-AF2139371
Brana-LPAAT2-CAB09138
Limal-LPAAT1-S60478
Brana-LPAAT-BAT1.5-ADC97479
Zeama-LPAAT-CAA82638
Brana-LPAAT-BAT1.13-ADC97478
Arath-LPAAT3-AEE32642
Micpu-LPAAT-XP 002501997
Sacce-slc1-AAA16514
Orsa-LPAAT2-NP 916393
Sacce-LPAAT-Slc1p-NP 010231
Arath-LPAAT4-Q8L4Y2
Mral-LPAAT1-AED33305
Arath-LPAAT5-AAP37821
Escco-plsC-AAA24397
Orysa-LPAAT1-AC068923 13
Limdo-LPAAT2-Q42870
Arath-LPAAT1-NP 194787
Limal-LPAAT-AAC49185
Cocnu-LPAAT-AAC49119
Brana-LPAAT1-AF111161 1

Figura 8

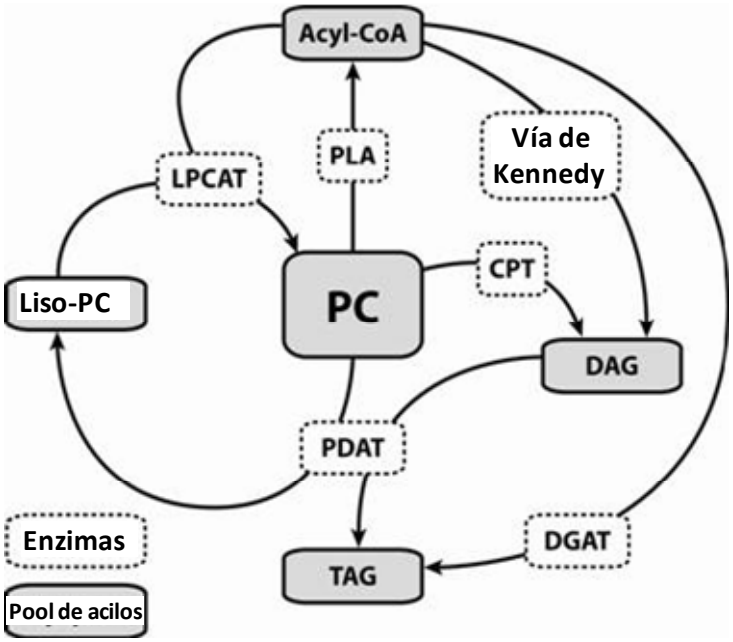

Acyl-CoA
PLA
Vía de Kennedy
LPCAT
CPT
Liso-PC
PC
DAG
PDAT
Enzimas
DGAT
TAG
Pool de acilos

Figura 9

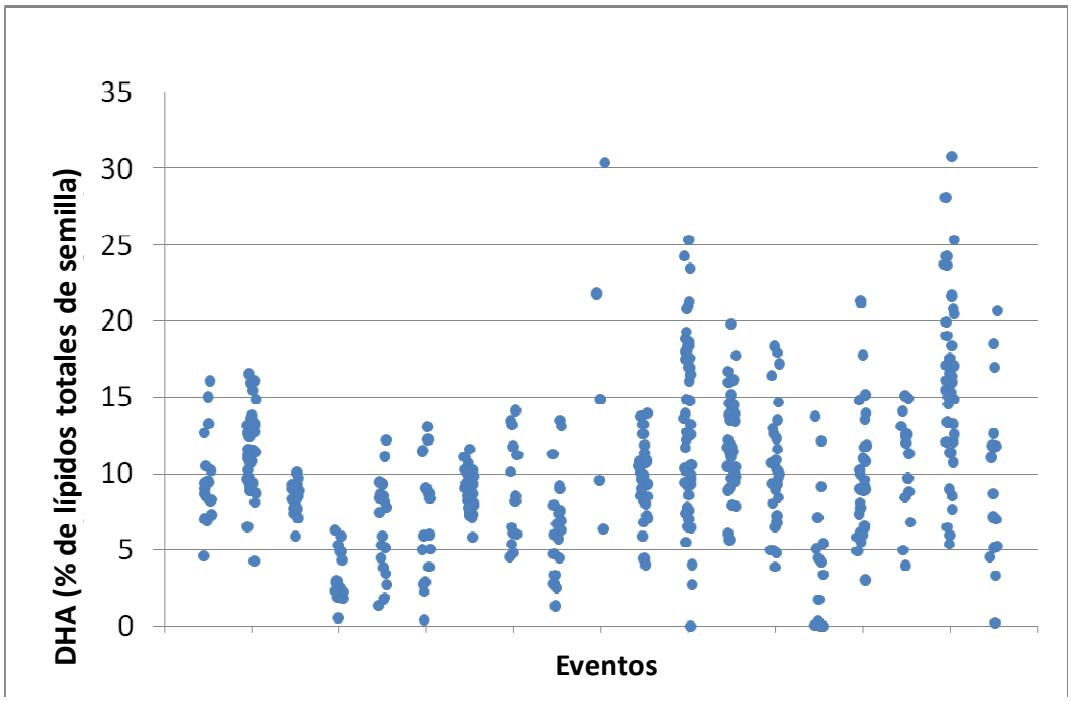


Figura 10

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 June 2015 (25.06.2015)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2015/089587 A1

(51) International Patent Classification:
A01H 5/00 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 15/79* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/AU2014/050433

(22) International Filing Date:
18 December 2014 (18.12.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2013905033 18 December 2013 (18.12.2013) AU
2014902471 27 June 2014 (27.06.2014) AU

(71) Applicants: **COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION** [AU/AU]; Limestone Avenue, Campbell, Australian Capital Territory 2612 (AU). **NUSEED PTY LTD** [—/AU]; 103-105 Pipe Road, Laverton North, Victoria 3026 (AU). **GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION** [AU/AU]; Level 4, 4 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory 2600 (AU).

(72) Inventors: **PETRIE, James Robertson**; 16 Henry Street, Goulburn, New South Wales 2580 (AU). **SINGH, Surinder Pal**; 10 Lucas Place, Downer, Australian Capital Territory 2602 (AU).

(74) Agent: **FB RICE**; Level 14, 90 Collins St, Melbourne, Victoria 3000 (AU).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2015/089587 A1

(54) Title: LIPID COMPRISING LONG CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

(57) Abstract: The present invention relates to extracted plant lipid comprising docosahexaenoic acid (DHA) wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%. The present invention also relates to plant and/or microbial lipid comprising docosapentaenoic acid (DPA) wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 7% and 35%, and processes for producing the extracted lipid.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 516028	**FOR FURTHER ACTION**	See Form PCT/IPEA/416
International application No. **PCT/AU2014/050433**	International filing date *(day/month/year)* 18 December 2014	Priority date *(day/month/year)* 18 December 2013

International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC

See Supplemental Box

Applicant

COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (ET AL)

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of **9** sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. [X] *(sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of **33** sheets, as follows:
      - [X] sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions).
      - [ ] sheets containing rectifications not taken into account by this Authority because they were not available at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4*bis*, 70.2(e), 70.16 and 91.2).
      - [ ] Superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)).

   b. [ ] *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3*bis* of Annex C of the Administrative Instructions).
4. This report contains indications relating to the following items:

[X]	Box No. I	Basis of the report
[ ]	Box No. II	Priority
[ ]	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
[X]	Box No. IV	Lack of unity of invention
[X]	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
[ ]	Box No. VI	Certain documents cited
[ ]	Box No. VII	Certain defects in the international application
[X]	Box No. VIII	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
19 October 2015	16 February 2016
Name and mailing address of the IPEA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	**Authorised officer** Susan MacKenzie AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832690

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/AU2014/050433

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report has been established on the basis of:

   [X] The international application in the language in which it was filed:

   [ ] A translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of :

   [ ] international search (under Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

   [ ] publication of the international application (under Rule 12.4(a)).

   [ ] international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b)).

2. With regard to the **elements** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

   [ ] the international application as originally filed/furnished, or

   [X] the description: pages **1-160** , as originally filed/furnished

   pages , received by this Authority on with the letter of

   [X] the claims: pages , as originally filed/furnished

   pages , as amended (together with any statement) under Article 19,

   pages **161-175** , received by this Authority on **19 October 2015** with the letter of **19 October 2015**

   [X] the drawings: pages **1/10 - 10/10** , as originally filed/furnished

   pages , received by this Authority on with the letter of

   [X] a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. [ ] The amendments have resulted in the cancellation of:

   [ ] the description, pages

   [ ] the claims, Nos.

   [ ] the drawings, sheets/figs

   [ ] the sequence listing (specify):

4. [ ] This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (*c-bis*)):

   [ ] the description, pages

   [ ] the claims, Nos.

   [ ] the drawings, sheets/figs

   [ ] the sequence listing (specify):

5. [ ] This report has been established:

   [ ] taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-*bis*) and 70.2(e)).

   [ ] without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4*bis* and 70.2(e)).

6. With regard to top-up searches (Rules 66.1*ter* and 70.2(f)):

   [ ] A top-up search was carried out by this Authority on (date).

   [ ] Additional relevant documents have been discovered during the top-up search.

   [X] No top-up search was carried out by this Authority because it would serve no useful purpose.

7. [ ] Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45*bis*.8(b) and (c)).

** If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."*

Box No. IV Lack of unity of invention

1. [X] In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:

   [ ] restricted the claims

   [X] paid additional fees

   [ ] paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   [ ] paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   [ ] neither restricted the claims nor paid additional fees

2. [X] This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:

   [ ] complied with.

   [X] not complied with for the following reasons:

See Supplemental Box

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   [X] all parts.

   [ ] the parts relating to claims Nos.

Box No. V **Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims **1-29**	**YES**
	Claims **NONE**	**NO**
Inventive step (IS)	Claims **1-29**	**YES**
	Claims **NONE**	**NO**
Industrial applicability (IA)	Claims **1-29**	**YES**
	Claims **NONE**	**NO**

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS:

CITATIONS

D1: WO 2010/147900 A1 (E.I. DUPONT DE NEMOURS AND COMPANY) 23 December 2010
D2: US 7550286 B2 (DAMUDE, H.G.. et al.) 23 June 2009
D3: US 2013/0309772 A1 (SAKAGUCHI, K. et al.) 21 November 2013
D4: WO 2005/103253 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 03 November 2005

D5: PETRIE, J.R. et al., 'Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA', PLoS One, 2012. Vol. 7, e49165, published online 7 November 2012

D6: RUIZ-LOPEZ, N. et al., 'Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants', Journal of Experimental Botany, 2012, Vol. 63, pages 2397-2410

D7: PETRIE, J.R. et al. 'Metabolic engineering Camelina sativa with fish oil-like levels of DHA', PLoS One, January 2014. Vol. 9, page e85061
D8: WO 2013/185184 A2 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION et al.) 19 December 0203

NOVELTY (N)

Claims 1-29 meet the criteria set forth in PCT Article 33(2) for novelty.

The prior art published before the priority date does not disclose extracted plant lipid as defined by the claims. Therefore the subject matter of the above cited claims is novel and meets the requirements of Article 33(2) of the PCT with regard to novelty.

INVENTIVE STEP (IS)

Claims 1-29 meet the criteria set out in PCT Article 33(3) with regard to the requirement of Inventive Step.

With respect to the first identified invention, D4 would appear to represent the closest prior art. D4 discloses strains of thraustochytrid microalgae from which may be derived extracted lipid with DHA content which falls within the range of between 20.1% -35% (see strains A, C and H, Table 4, page 69).

The issue of inventive step, in relation to any claim defining the invention, is whether in light of one or more prior art documents it would have been obvious to the person skilled in the art to arrive at something falling with the scope of the claim. The word "obvious" suggests that it does not go beyond the normal progress of technology, but merely follows plainly or logically from the prior art.

It is therefore not considered an "obvious" step for the person skilled in the art, to arrive at a plant lipid falling within the scope of claim 1, from the disclosure of lipids derived from microalgae as disclosed in D4. This is because microalgae inherently produce much high levels of DHA compared to higher plants. Furthermore, the microalgae disclosed in the prior art does not belong to the phylogenetic kingdom Plantae.

In order to arrive at the invention defined in claim 1 it would be considered to take a level of ingenuity or experimentation for the person skilled in the art. Further examples of close prior art represented by D5 discloses extracted plant lipid wherein the level of DHA in the total fatty acid content is approximately 15%, which is not within the range 20.1% - 35%. D5 in addition to other prior art such as D6 and D7 provide evidence of the technically challenging nature of producing DHA and other PUFAs in plants to achieve levels similar to or higher than those obtained from marine sources.

With respect to the second identified invention, D1 discloses engineered yeast strains which produce lipids comprising DPA in the range 7% – 35%. D1 is silent with respect to producing lipids in plants.

Other close prior art in relation to invention 2 is represented by D2 (see Table 10), D3 (Fig 30) and D4 (Table 4) each disclose microorganisms which produce lipids wherein the level of DPA in the total fatty acid content falls within the range 7% - 35%. These documents do not disclose plant extracted lipids as defined in the claims.

It can be seen from the close prior art relating to LC-PUFA production in plants represented by D4 – D8, that to produce plants which produce lipids with the levels of DHA and/or DPA as represented in claims 1 or 2 is a technically challenging problem in the art. As such, in order to arrive at the invention relating to plants defined in the above claims, it would be expected to require a level of ingenuity or inventiveness.

As such, the above cited claims are considered to meet the requirements for inventive step in relation to invention 1.

INDUSTRIAL APPLICABILITY (IA)

The invention defined in the claims is considered to meet the requirements of Industrial Applicability under Article 33(4) of the PCT because it can be made by, or used in, industry.

A01H 5/00 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

Box No. VIII Certain observations in the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The claims do not meet the requirements of Article 6 of the PCT because they are not fully supported by the description.

Claims are not fully supported if their subject matter is different to the subject matter of the description. The claims are inconsistent with the description because they omit one or more features that the description indicates is intrinsic to the invention.

From reading the specification as a whole, it would appear that the invention relates to the production of plant lipids with a high DHA content within the range of 20.1% - 35% or DPA in plants within the range of 7% - 35%.

Article 6 of the PCT requires that the scope of the claims must not be broader than is justified by the description and they must be enabled by the description across their entire scope. However there is evidence that shows that the invention cannot be worked through the whole of the field claimed by routine methods of experimentation or analysis.

Both D5 and D8 disclose methods towards achieving high levels of DHA in plant lipid using engineered constructs comprising a plurality of PUFA pathway genes which would appear to be identical to those described in the specification, i.e. JP5416-GA7 plasmid described in example 1 of the instant application. The use of this specialised construct comprising 7 enzymes disclosed in D5 and D8 resulted in transgenic plants with levels of DHA or DPA which fall below the range defined in the claims of the instant application. As such, the technical advance of the present application would appear to relate to further modifications to the JP5416-GA7 construct described in example 4 to achieve increased levels of DHA or DPA compared to the prior art D5 and D8.

The claims would appear to represent a desideratum style of claim. The application is directed towards the goal of increasing DHA and/or DPA production in plant lipids or microbes. The description provides support for a method of achieving this goal by a specific means described in example 4. In contrast the claims are either directed towards the goal per se, which is lipids comprising the high levels of DHA and/or DPA within the ranges defined in the claims, or this goal in conjunction with enzymatic pathways which, as discussed above, do not inevitably achieve the claimed result. It is therefore considered that the scope of such claims is not supported or enabled by the description because the technical features which achieve the results are not reflected in the claims.

It is also noted that claims 3, 9, 10, 16 and 21 lack clarity and descriptive support, in that these claims encompass an extraordinary large number of possible options. Some of these options relate to specific percentages of specific fatty acids, or to specific enzyme efficiencies, however support for the scope of these claims cannot be found in the description. As such, the description does not provide support or enablement for the scope these claims.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/AU2014/050433

Supplemental Box Relating to Sequence Listing

Continuation of Box No. I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)
   - ☐ on paper
   - ☐ in electronic form

   b. (time)
   - ☐ in the international application as filed
   - ☐ together with the international application in electronic form
   - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
   - ☐ to this Authority as an amendment on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A sequence listing was filed as part of the specification in electronic form, however was not used for the purposes of this search and examination opinion.

* *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

Continuation of: **Box IV**

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:

(1) Claims 1, 5, 15 (all fully), 3, 4, 7-14, 17-29 (all partially). The feature of extracted plant lipid wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35% and claims related thereto, is specific to this group of claims.

(2) Claims 2, 6, 16 (all fully), 3, 4, 7-14, 17-29 (all partially). The feature of extracted plant lipid wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 7% and 35% and claims related thereto is specific to this group of claims.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is the concept of the production modified plant oils with modified omega-3 LC PUFAS. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in many documents in the prior art of which the documents below are cited as one of many which disclose the concept of genetically altering plants to produce extracted lipids comprising fatty acids similar to fish oil derived lipids. Furthermore, the concept of increasing production of C22 polyunsaturated fatty acids such as DHA or DPA is disclosed in the 2nd cited document Petrie et al, 2012.

RUIZ-LOPEZ, N. et al., 'Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants', Journal of Experimental Botany, 2012, Vol. 63, pages 2397-2410

PETRIE, J.R. et al., 'Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA', PLoS One, 2012. Vol. 7, No. 11, e49165, published online 7 November 2012

Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied *a posteriori*.

By online submission

The Commissioner of Patents
PO Box 200
WODEN ACT 2606

FB Rice
Melbourne VIC
Telephone: 03 8618 4100
Facsimile: 03 8618 4199
Customer No: 2410000452

---

19 October 2015

Our Ref: 516028
Contact: Ian Rourke
irourke@fbrice.com.au

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

Dear Commissioner

Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Grains Research and Development Corporation, Nuseed Pty Ltd
International Patent Application PCT/AU2014/050433
Entitled: "Lipid comprising long chain polyunsaturated fatty acids"

Attached is a Demand for International Preliminary Examination in respect of this application. We also ***include*** substitute claim pages 161 to 175, under Article 34(2).

In the Written Opinion the International Examiner held that claim 1 is novel and inventive. However, claim 2 was held not novel in view of 2010/147900 (D1), and not inventive at least when compared to this document.

Claims 2, 6 and 16 have been amended to exclude reference to microbial lipid or microbial cells. Furthermore, the relevant dependent claims have been amended to remove all reference to microbial lipid or microbial cells.

In addition, the features of claims 1, 5 and 15 that the fatty acid content comprises between about 2% and 16% palmitic acid, and the level of myristic acid, if present, is less than 1%, has been included in claims 2, 6 and 16.

Consistent with our understanding of the Examiner's comments on inventive step in relation to "Invention 2" in Box No. V of the Written Opinion, none of the cited art teaches or suggests plant lipid or plant cells having a fatty acid content which has about 2% to 16% palmitic acid, less than 1% myristic acid and between 7% and 35% DPA. Thus, the amended claims are clearly novel and inventive when compared to the cited art.

Second Written Opinion

If the Examiner wishes to maintain any of the novelty and/or inventive step objections against pending the pending claims we would appreciate receiving a second Written Opinion.

FB RICE

The Commissioner of Patents
Our Ref: 516028
19 October 2015

Fee
We transmit the fee.

Yours respectfully
FB Rice



Examination Fee: $868

CLAIMS

1. Extracted plant lipid, comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA) and docosahexaenoic acid (DHA), and optionally one or more of stearidonic acid (SDA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid, if present, is less than 1%, and wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%.

2. Extracted plant lipid, comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA) and docosapentaenoic acid (DPA), and optionally one or more of stearidonic acid (SDA), eicosapentaenoic acid (EPA), and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid, if present, is less than 1%, and wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 7% and 35%.

3. The lipid of claim 1 or claim 2 which has one or more of the following features

i) the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 15%, or between about 3% and about 10%,

ii) the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid is about 0.1%,

iii) the level of oleic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 1% and about 30%, between about 3% and about 30%, between about 6% and about 30%, between 1% and about 20%, between about 30% and about 60%, about 45% to about 60%, about 30%, or between about 15% and about 30%,

iv) the level of linoleic acid (LA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 35%, between about 4% and about 20%, between about 4% and about 17%, or between about 5% and about 10%,

v) the level of α-linolenic acid (ALA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 40%, between about 7% and about 40%, between about 10% and about 35%, between about 20% and about 35%, between about 4% and 16%, or between about 2% and 16%,

vi) the level of γ-linolenic acid (GLA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than 4%, less than about 3%, less than about 2%, less than about 1%, less than about 0.5%, between 0.05% and 7%, between 0.05% and 4%, between 0.05% and about 3%, or between 0.05% and about 2%,

vii) the level of stearidonic acid (SDA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than about 10%, less than about 8%, less than about 7%, less than about 6%, less than about 4%, less than about 3%, between about 0.05% and about 7%, between about 0.05% and about 6%, between about 0.05% and about 4%, between about 0.05% and about 3%, between about 0.05% and about 10%, or between 0.05% and about 2%,

viii) the level of eicosatetraenoic acid (ETA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than about 6%, less than about 5%, less than about 4%, less than about 1%, less than about 0.5%, between 0.05% and about 6%, between 0.05% and about 5%, between 0.05% and about 4%, between 0.05% and about 3%, or between 0.05% and about 2%,

ix) the level of eicosatrienoic acid (ETrA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than 4%, less than about 2%, less than about 1%, between 0.05% and 4%, between 0.05% and 3%, or between 0.05% and about 2%, or between 0.05% and about 1%,

x) the level of eicosapentaenoic acid (EPA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 4% and 15%, less than 4%, less than about 3%, less than about 2%, between 0.05% and 10%, between 0.05% and 5%, between 0.05% and about 3%, or between 0.05% and about 2%,

xi) if the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%, the level of docosapentaenoic acid (DPA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than 4%, less than about 3%, less than about 2%, between 0.05% and 8%, between 0.05% and 5%, between 0.05% and about 3%, between 5% and 15%, between 5% and 10%, or between 0.05% and about 2%,

xii) the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is about 22%, about 24%, about 26%, about 28%, about 31%, between 20.1% and 29%, between 20.1% and 28%, between 20.1% and about 27%, between 20.1% and

about 26%, between 20.1% and about 25%, between 20.1% and about 24%, between 21% and 35%, between 21% and 30%, between 21% and 28%, between 21% and about 26%, or between 21% and about 24%,

xiii) the lipid comprises ω6-docosapentaenoic acid ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) in its fatty acid content,

xiv) the lipid comprises less than 0.1% of ω6-docosapentaenoic acid ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) in its fatty acid content,

xv) the lipid comprises less than 0.1% of one or more or all of SDA, EPA and ETA in its fatty acid content,

xvi) the level of total saturated fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 25%, between about 4% and about 20%, between about 6% and about 20%, or between about 6% and about 12%,

xvii) the level of total monounsaturated fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 40%, between about 4% and about 35%, between about 8% and about 25%, between 8% and about 22%, between about 15% and about 40% or between about 15% and about 35%,

xviii) the level of total polyunsaturated fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 20% and about 75%, between 30% and 75%, between about 50% and about 75%, about 60%, about 65%, about 70%, about 75%, or between about 60% and about 75%,

xix) the level of total ω6 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 35% and about 50%, between about 20% and about 35%, between about 6% and 20%, less than 20%, less than about 16%, less than about 10%, between about 1% and about 16%, between about 2% and about 10%, or between about 4% and about 10%,

xx) the level of new ω6 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than about 10%, less than about 8%, less than about 6%, less than 4%, between about 1% and about 20%, between about 1% and about 10%, between 0.5% and about 8%, or between 0.5% and 4%,

xxi) the level of total ω3 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 36% and about 65%, between 36% and about 70%, between 40% and about 60%, between about 30% and about 60%, between about 35% and about 60%, between 40% and about 65%, between about 30% and about 65%, between about 35% and about 65%, about 35%, about 40%, about 45%, about 50%, about 55%, about 60%, about 65% or about 70%,

xxii) the level of new ω3 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 21% and about 45%, between 21% and about 35%, between about 23% and about 35%, between about 25% and about 35%, between about 27% and about 35%, about 23%, about 25%, about 27%, about 30%, about 35%, about 40% or about 45%,

xxiii) the ratio of total ω6 fatty acids: total ω3 fatty acids in the fatty acid content of the extracted lipid is between about 1.0 and about 3.0, between about 0.1 and about 1, between about 0.1 and about 0.5, less than about 0.50, less than about 0.40, less than about 0.30, less than about 0.20, less than about 0.15, about 1.0, about 0.1, about 0.10 to about 0.4, or about 0.2,

xxiv) the ratio of new ω6 fatty acids: new ω3 fatty acids in the fatty acid content of the extracted lipid is between about 1.0 and about 3.0, between about 0.02 and about 0.1, between about 0.1 and about 1, between about 0.1 and about 0.5, less than about 0.50, less than about 0.40, less than about 0.30, less than about 0.20, less than about 0.15, about 0.02, about 0.05, about 0.1, about 0.2 or about 1.0,

xxv) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of oleic acid to LA by Δ12-desaturase of at least about 60%, at least about 70%, at least about 80%, between about 60% and about 98%, between about 70% and about 95%, or between about 75% and about 90%,

xxvi) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of ALA to SDA by Δ6-desaturase of at least about 30%, at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, between about 30% and about 70%, between about 35% and about 60%, or between about 50% and about 70%,

xxvii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of SDA to ETA acid by Δ6-elongase of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 88%, or between about 75% and about 85%,

xxviii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of ETA to EPA by Δ5-desaturase of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, between about 60% and about 99%, between about 70% and about 99%, or between about 75% and about 98%,

xxix) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of EPA to DPA by Δ5-elongase of at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, between about 50% and about 99%, between about 85% and about

99%, between about 50% and about 95%, or between about 85% and about 95%,

xxx) if the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%, the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of DPA to DHA by Δ4-desaturase of at least about 80%, at least about 90%, at least about 93%, between about 50% and about 95%, between about 80% and about 95%, or between about 85% and about 95%,

xxxi) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of oleic acid to DPA and/or DHA of at least about 10%, at least about 15%, at least about 20%, at least about 25%, about 20%, about 25%, about 30%, between about 10% and about 50%, between about 10% and about 30%, between about 10% and about 25% or between about 20% and about 30%,

xxxii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of LA to DPA and/or DHA of at least about 15%, at least about 20%, at least about 22%, at least about 25%, at least about 30%, at least about 40%, about 25%, about 30%, about 35%, about 40%, about 45%, about 50%, between about 15% and about 50%, between about 20% and about 40%, or between about 20% and about 30%,

xxxiii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of ALA to DPA and/or DHA of at least about 17%, at least about 22%, at least about 24%, at least about 30%, about 30%, about 35%, about 40%, about 45%, about 50%, about 55%, about 60%, between about 22% and about 70%, between about 17% and about 55%, between about 22% and about 40%, or between about 24% and about 40%,

xxxiv) the total fatty acid in the extracted lipid has less than 1.5% C20:1, less than 1% C20:1 or about 1% C20:1,

xxxv) the triacylglycerol (TAG) content of the lipid is at least about 70%, at least about 80%, at least about 90%, at least 95%, between about 70% and about 99%, or between about 90% and about 99%,

xxxvi) the lipid comprises diacylglycerol (DAG), which DAG preferably comprises DHA and/or DPA,

xxxvii) the lipid comprises less than about 10%, less than about 5%, less than about 1%, or between about 0.001% and about 5%, free (non-esterified) fatty acids and/or phospholipid, or is essentially free thereof,

xxxviii) at least 70%, at least 72% or at least 80%, of the DHA and/or DPA esterified in the form of TAG is in the *sn*-1 or *sn*-3 position of the TAG,

xxxix) the most abundant DHA-containing TAG species in the lipid is DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12),

xl) the most abundant DPA-containing TAG species in the lipid is DPA/18:3/18:3 (TAG 56:12),

xli) the lipid comprises tri-DHA TAG (TAG 66:18), and

xlii) the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is about 7%, about 8%, about 9%, about 10%, about 12%, about 15%, about 18%, about 20%, about 22%, about 24%, about 26%, about 28%, about 31%, between about 7% and about 31%, between about 7% and about 28%, between about 10% and 35%, between about 10% and about 30%, between about 10% and about 25%, between about 10% and about 22%, between about 14% and 35%, between about 16% and 35%, between about 16% and about 30%, between about 16% and about 25%, or between about 16% and about 22%, optionally wherein the level of DHA is less than 0.5% of the total fatty acid content of the extracted lipid.

4. The lipid according to any one of claims 1 to 3, wherein the lipid is an oil, preferably oil from an oilseed, more preferably wherein the lipid comprises or is *Brassica sp.* oil such as *Brassica napus* oil or *Brassica juncea* oil, *Gossypium hirsutum* oil, *Linum usitatissimum* oil, *Helianthus sp.* oil, *Carthamus tinctorius* oil, *Glycine max* oil, *Zea mays* oil, *Elaesis guineenis* oil, *Nicotiana benthamiana* oil, *Lupinus angustifolius* oil, *Camelina sativa* oil, *Crambe abyssinica* oil, *Miscanthus x giganteus* oil, or *Miscanthus sinensis* oil.

5. A process for producing extracted plant lipid, comprising the steps of

i) obtaining a plant part comprising lipid, the lipid comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA) and γ-linolenic acid (GLA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and optionally one or more of eicosapentaenoic acid (EPA) and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid, if present, is less than 1%, and wherein the level of DHA in the

total fatty acid content of extractable lipid in the plant part is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%, and

ii) extracting lipid from the plant part,

wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%.

6. A process for producing extracted plant lipid, comprising the steps of

i) obtaining a plant part comprising lipid, the lipid comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), docosapentaenoic acid (DPA), and optionally one or more of eicosapentaenoic acid (EPA) and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of extractable lipid in the plant part is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of extractable lipid in the plant part, if present, is less than 1%, and wherein the level of DPA in the total fatty acid content of extractable lipid in the plant part is between 7% and 35%, and

ii) extracting lipid from the plant part,

wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 7% and 35%.

7. The process of claim 5 or claim 6, wherein the extracted lipid has one or more of the features defined in claim 3 or claim 4.

8. The process of any one of claims 5 to 7, wherein the plant part is a seed, preferably an oilseed such as *Brassica sp.* such as *Brassica napus* or *Brassica juncea, Gossypium hirsutum, Linum usitatissimum, Helianthus sp., Carthamus tinctorius, Glycine max, Zea mays, Elaesis guineenis, Nicotiana benthamiana, Lupinus angustifolius, Camelina sativa, or Crambe abyssinica*, preferably a *Brassica napus, B. juncea* or *C. sativa* seed.

9. The process according to any one of claims 5 to 8, wherein the plant part comprises exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) an ω3-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

ii) a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

iii) a Δ12-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

iv) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

v) an ω3-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

vi) a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and a Δ5-elongase,

vii) a Δ12-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

viii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

ix) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

x) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and a Δ5-elongase,

xi) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

xii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

and wherein each polynucleotide is operably linked to one or more promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in a cell of the plant part.

10. The process of claim 9, wherein the plant part or has one or more or all of the following features

i) the Δ12-desaturase converts oleic acid to linoleic acid in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 60%, at least about 70%, at least about 80%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 90%, or between about 75% and about 85%,

ii) the ω3-desaturase converts ω6 fatty acids to ω3 fatty acids in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 65%, at least about 75%, at least about 85%, between about 65% and about 95%, between about 75% and about 91%, or between about 80% and about 91%,

iii) the Δ6-desaturase converts ALA to SDA in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 20%, at least about 30%, at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, between about 30% and about 70%, between about 35% and about 60%, or between about 50% and about 70%,

iv) the Δ6-desaturase converts linoleic acid to γ-linolenic acid in one or more cells of the plant part with an efficiency of less than about 5%, less than about 2.5%, less than about 1%, between about 0.1% and about 5%, between about 0.5% and about 2.5%, or between about 0.5% and about 1%,

v) the Δ6-elongase converts SDA to ETA in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 80%, or between about 75% and about 80%,

vi) the Δ5-desaturase converts ETA to EPA in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, at least about 80%, at least about 90%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 95%, or between about 75% and about 95%,

vii) the Δ5-elongase converts EPA to DPA in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, between about 50% and about 90%, or between about 85% and about 95%,

viii) the Δ4-desaturase converts DPA to DHA in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 80%, at least about 90%, at least about 93%, between about 50% and about 95%, between about 80% and about 95%, or between about 85% and about 95%,

ix) the efficiency of conversion of oleic acid to DHA or DPA in one or more cells of the plant part is at least about 10%, at least about 15%, at least about 20%, at least about 25%, about 20%, about 25%, about 30%, between about 10% and about 50%, between about 10% and about 30%, between about 10% and about 25%, or between about 20% and about 30%,

x) the efficiency of conversion of LA to DHA or DPA in one or more cells of the plant part is at least about 15%, at least about 20%, at least about 22%, at least about 25%, at least about 30%, about 25%, about 30%, about 35%, between about 15% and about 50%, between about 20% and about 40%, or between about 20% and about 30%,

xi) the efficiency of conversion of ALA to DHA or DPA in one or more cells of the plant part is at least about 17%, at least about 22%, at least about 24%, at least

about 30%, about 30%, about 35%, about 40%, between about 17% and about 55%, between about 22% and about 35%, or between about 24% and about 35%,

xii) one or more cells of the plant part comprise at least about 25%, at least about 30%, between about 25% and about 40%, or between about 27.5% and about 37.5%, more ω3 fatty acids than corresponding cells lacking the exogenous polynucleotides,

xiii) the Δ6-desaturase preferentially desaturates α-linolenic acid (ALA) relative to linoleic acid (LA),

xiv) the Δ6-elongase also has Δ9-elongase activity,

xv) the Δ12-desaturase also has Δ15-desaturase activity,

xvi) the Δ6-desaturase also has Δ8-desaturase activity,

xvii) the Δ8-desaturase also has Δ6-desaturase activity or does not have Δ6-desaturase activity,

xviii) the Δ15-desaturase also has ω3-desaturase activity on GLA,

xix) the ω3-desaturase also has Δ15-desaturase activity on LA,

xx) the ω3-desaturase desaturates both LA and/or GLA,

xxi) the ω3-desaturase preferentially desaturates GLA relative to LA,

xxii) one or more or all of the desaturases have greater activity on an acyl-CoA substrate than a corresponding acyl-PC substrate,

xxiii) the Δ6-desaturase has greater Δ6-desaturase activity on ALA than LA as fatty acid substrate,

xxiv) the Δ6-desaturase has greater Δ6-desaturase activity on ALA-CoA as fatty acid substrate than on ALA joined to the *sn*-2 position of PC as fatty acid substrate,

xxv) the Δ6-desaturase has at least about a 2-fold greater Δ6-desaturase activity, at least 3-fold greater activity, at least 4-fold greater activity, or at least 5-fold greater activity, on ALA as a substrate compared to LA,

xxvi) the Δ6-desaturase has greater activity on ALA-CoA as fatty acid substrate than on ALA joined to the *sn*-2 position of PC as fatty acid substrate,

xxvii) the Δ6-desaturase has at least about a 5-fold greater Δ6-desaturase activity or at least 10-fold greater activity, on ALA-CoA as fatty acid substrate than on ALA joined to the *sn*-2 position of PC as fatty acid substrate,

xxviii) the desaturase is a front-end desaturase, and

xxix) the Δ6-desaturase has no detectable Δ5-desaturase activity on ETA.

11. The process of claim 9 or claim 10, wherein the plant part further comprises an exogenous polynucleotide encoding a diacylglycerol acyltransferase (DGAT),

monoacylglycerol acyltransferase (MGAT), glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase (LPAAT) preferably an LPAAT which can use a C22 polyunsaturated fatty acyl-CoA substrate such as DHA-CoA and/or DPA-CoA, acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT), phospholipase A_2 (PLA_2), phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD), CDP-choline diacylglycerol choline phosphotransferase (CPT), phoshatidylcholine diacylglycerol acyltransferase (PDAT), phosphatidylcholine:diacylglycerol choline phosphotransferase (PDCT), acyl-CoA synthase (ACS), or a combination of two or more thereof.

12. The process according to any one of claims 9 to 11, wherein the exogenous polynucleotides are covalently linked in a DNA molecule, preferably a T-DNA molecule, integrated into the genome of cells of the plant part and preferably where the number of such DNA molecules integrated into the genome of the cells of the plant part is not more than one, not more than two or three, or is two or three.

13. The process according to any one of claims 5 to 12, wherein the total oil content of the plant part comprising the exogenous polynucleotides is at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, between about 50% and about 80%, or between about 80% and about 100% of the total oil content of a corresponding plant part lacking the exogenous polynucleotides.

14. The process according to any one of claims 5 to 13 which further comprises treating the lipid to increase the level of DHA and/or DPA as a percentage of the total fatty acid content, wherein the treatment comprises one or more of fractionation, distillation or transesterification such as the production of methyl- or ethyl-esters of DHA and/or DPA.

15. An oilseed plant or part thereof comprising

a) lipid in its seed, the lipid comprising fatty acids in an esterified form, and

b) exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

ii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

wherein each polynucleotide is operably linked to one or more seed-specific promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in developing seed of the plant, wherein the fatty acids comprise oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA) and optionally γ-linolenic acid (GLA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and optionally eicosapentaenoic acid (EPA) and/or eicosatetraenoic acid (ETA), and wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the lipid of the seed is between 20.1% and 30%, or between 20.1% and 35%, and wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the lipid, if present, is less than 1%.

16. An oilseed plant comprising lipid in its seed, or part thereof, comprising

a) lipid comprising fatty acids in an esterified form, and

b) exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

ii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

iii) a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

iv) a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

wherein each polynucleotide is operably linked to one or more seed-specific promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in developing seed of the plant, wherein the fatty acids comprise oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), and docosapentaenoic acid (DPA), and optionally docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and/or eicosatetraenoic acid (ETA), and wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the lipid of the seed is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the lipid of the seed, if present, is less than 1%, and wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the lipid of the seed is between 7% and 35%.

17. A *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant which is capable of producing seed comprising DHA and/or DPA, wherein mature, harvested seed of the plant has a DHA and/or DPA content of at least about 28mg per gram seed, preferably at least about 32mg per gram seed, at least about 36mg per gram seed, at least about 40mg per gram seed, more preferably at least about 44mg per gram seed or at least about 48mg per gram seed, about 80 mg per gram seed, or between about 30mg and about 80mg per gram seed.

18. A plant cell of claim 15 or claim 16 comprising the exogenous polynucleotides.

19. A plant part, preferably a seed, which has one or more of the following features
i) is from a plant according to any one of claims 15 to 17,
ii) comprises lipid as defined in any one of claims 1 to 4, or
iii) can be used in a process according to any one of claims 5 to 14.

20. Mature, harvested *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* seed comprising DHA and/or DPA and a moisture content of between about 4% and about 15% by weight, preferably between about 6% and about 8% by weight or between about 4% and about 8% by weight, wherein the DHA and/or DPA content of the seed at least about 28mg per gram seed, preferably at least about 32mg per gram seed, at least about 36mg per gram seed, at least about 40mg per gram seed, more preferably at least about 44mg per gram seed or at least about 48mg per gram seed, about 80 mg per gram seed, or between about 30mg and about 80mg per gram seed.

21. A method of producing a plant which can be used to produce extracted plant lipid according any one of claims 1 to 4, the method comprising

a) assaying the level of DHA and/or DPA in lipid produced by one or more plant parts from a plurality of plants , each plant comprising one or more exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) an ω3-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

ii) a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

iii) a Δ12-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

iv) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

v) an ω3-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

vi) a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elngase and a Δ5-elongase,

vii) a Δ12-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

viii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

ix) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

x) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and a Δ5-elongase,

xi) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

xii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

wherein each polynucleotide is operably linked to one or more promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in a cell of a plant part, and

b) identifying a plant, from the plurality of plants, which can be used to produce extracted plant lipid according to any one of claims 1 to 4 in one or more of its parts, and

c) optionally, producing progeny plants from the identified plant, or seed therefrom.

22. A method of producing seed, the method comprising,

a) growing a plant according to any one of claims 15 to 17, or a plant which produces a plant part of claim 19, or which produces a seed of claim 20, preferably in a field as part of a population of at least 1000 or 2000 or 3000 such plants or in an area of at least 1 hectare or 2 hectares or 3 hectares planted at a standard planting density,

b) harvesting seed from the plant or plants, and

c) optionally, extracting lipid from the seed, preferably to produce oil with a total DHA and/or DPA yield of at least 60kg or 70kg or 80kg DHA and/or DPA/hectare.

23. The plant, plant cell, plant part or seed of any one of claims 15 to 20, which has one or more of the following features

i) comprises oil is as defined in claim 3 or claim 4, and

ii) the plant part or seed is capable of being used in a process according to any one of claims 5 to 14.

24. Lipid, or oil, produced by, or obtained from, using the process according to any one of claims 5 to 14, the cell according to claim 18, the oilseed plant of claim 15 or claim 16, the *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant of claim 17, the plant part of claim 19, or the seed of claim 20.

25. Seedmeal obtained from seed of claim 20, or obtained from the plant of any one of claims 15 to 17.

26. A composition comprising one or more of the lipid or oil of claim 24, the cell according to claim 18, the plant cell of claim 23, the seed of claim 20, or the seedmeal of claim 25.

27. Feedstuffs, cosmetics or chemicals comprising one or more of the lipid or oil of claim 24, the cell according to claim 18, the oilseed plant of claim 15 or claim 16, the plant cell of claim 23, the *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant of claim 17, the plant part of claim 23, the seed of claim 20, the seedmeal of claim 25, or the composition of claim 26.

28. A method of producing a feedstuff, the method comprising mixing one or more of the lipid or oil according to any one of claims 1 to 4, the cell according to claim 18, the oilseed plant of claim 15 or claim 16, the plant cell of claim 23, the *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant of claim 17, the plant part of claim 23, the seed of claim 20, the seedmeal of claim 25, or the composition of claim 26, with at least one other food ingredient.

29. Use of one or more of the lipid or oil according to any one of claims 1 to 4, the cell according to claim 18, the plant cell of claim 23, the plant part of claim 23, the seed of claim 20, the seedmeal of claim 25, or the composition of claim 26, for the manufacture of a medicament for treating or preventing a condition which would benefit from a PUFA.

CLAIMS

1. Extracted plant lipid, comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA) and docosahexaenoic acid (DHA), and optionally one or more of stearidonic acid (SDA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid, if present, is less than 1%, and wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%.

2. Extracted plant lipid ~~or microbial lipid~~, comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA) and docosapentaenoic acid (DPA), and optionally one or more of stearidonic acid (SDA), eicosapentaenoic acid (EPA), and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid, if present, is less than 1%, and wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 7% and 35%.

3. The lipid of claim 1 or claim 2 which has one or more of the following features

i) the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 15%, or between about 3% and about 10%,

ii) the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid is about 0.1%,

iii) the level of oleic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 1% and about 30%, between about 3% and about 30%, between about 6% and about 30%, between 1% and about 20%, between about 30% and about 60%, about 45% to about 60%, about 30%, or between about 15% and about 30%,

iv) the level of linoleic acid (LA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 35%, between about 4% and about 20%, between about 4% and about 17%, or between about 5% and about 10%,

v) the level of α-linolenic acid (ALA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 40%, between about 7% and about 40%, between about 10% and about 35%, between about 20% and about 35%, between about 4% and 16%, or between about 2% and 16%,

vi) the level of γ-linolenic acid (GLA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than 4%, less than about 3%, less than about 2%, less than about 1%, less than about 0.5%, between 0.05% and 7%, between 0.05% and 4%, between 0.05% and about 3%, or between 0.05% and about 2%,

vii) the level of stearidonic acid (SDA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than about 10%, less than about 8%, less than about 7%, less than about 6%, less than about 4%, less than about 3%, between about 0.05% and about 7%, between about 0.05% and about 6%, between about 0.05% and about 4%, between about 0.05% and about 3%, between about 0.05% and about 10%, or between 0.05% and about 2%,

viii) the level of eicosatetraenoic acid (ETA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than about 6%, less than about 5%, less than about 4%, less than about 1%, less than about 0.5%, between 0.05% and about 6%, between 0.05% and about 5%, between 0.05% and about 4%, between 0.05% and about 3%, or between 0.05% and about 2%,

ix) the level of eicosatrienoic acid (ETrA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than 4%, less than about 2%, less than about 1%, between 0.05% and 4%, between 0.05% and 3%, or between 0.05% and about 2%, or between 0.05% and about 1%,

x) the level of eicosapentaenoic acid (EPA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 4% and 15%, less than 4%, less than about 3%, less than about 2%, between 0.05% and 10%, between 0.05% and 5%, between 0.05% and about 3%, or between 0.05% and about 2%,

xi) if the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%, the level of docosapentaenoic acid (DPA) in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than 4%, less than about 3%, less than about 2%, between 0.05% and 8%, between 0.05% and 5%, between 0.05% and about 3%, between 5% and 15%, between 5% and 10%, or between 0.05% and about 2%,

xii) the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is about 22%, about 24%, about 26%, about 28%, about 31%, between 20.1% and 29%, between 20.1% and 28%, between 20.1% and about 27%, between 20.1% and

about 26%, between 20.1% and about 25%, between 20.1% and about 24%, between 21% and 35%, between 21% and 30%, between 21% and 28%, between 21% and about 26%, or between 21% and about 24%,

xiii) the lipid comprises ω6-docosapentaenoic acid ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) in its fatty acid content,

xiv) the lipid comprises less than 0.1% of ω6-docosapentaenoic acid ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) in its fatty acid content,

xv) the lipid comprises less than 0.1% of one or more or all of SDA, EPA and ETA in its fatty acid content,

xvi) the level of total saturated fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 25%, between about 4% and about 20%, between about 6% and about 20%, or between about 6% and about 12%,

xvii) the level of total monounsaturated fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 4% and about 40%, between about 4% and about 35%, between about 8% and about 25%, between 8% and about 22%, between about 15% and about 40% or between about 15% and about 35%,

xviii) the level of total polyunsaturated fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 20% and about 75%, between 30% and 75%, between about 50% and about 75%, about 60%, about 65%, about 70%, about 75%, or between about 60% and about 75%,

xix) the level of total ω6 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 35% and about 50%, between about 20% and about 35%, between about 6% and 20%, less than 20%, less than about 16%, less than about 10%, between about 1% and about 16%, between about 2% and about 10%, or between about 4% and about 10%,

xx) the level of new ω6 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is less than about 10%, less than about 8%, less than about 6%, less than 4%, between about 1% and about 20%, between about 1% and about 10%, between 0.5% and about 8%, or between 0.5% and 4%,

xxi) the level of total ω3 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 36% and about 65%, between 36% and about 70%, between 40% and about 60%, between about 30% and about 60%, between about 35% and about 60%, between 40% and about 65%, between about 30% and about 65%, between about 35% and about 65%, about 35%, about 40%, about 45%, about 50%, about 55%, about 60%, about 65% or about 70%,

xxii) the level of new ω3 fatty acids in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 21% and about 45%, between 21% and about 35%, between about 23% and about 35%, between about 25% and about 35%, between about 27% and about 35%, about 23%, about 25%, about 27%, about 30%, about 35%, about 40% or about 45%,

xxiii) the ratio of total ω6 fatty acids: total ω3 fatty acids in the fatty acid content of the extracted lipid is between about 1.0 and about 3.0, between about 0.1 and about 1, between about 0.1 and about 0.5, less than about 0.50, less than about 0.40, less than about 0.30, less than about 0.20, less than about 0.15, about 1.0, about 0.1, about 0.10 to about 0.4, or about 0.2,

xxiv) the ratio of new ω6 fatty acids: new ω3 fatty acids in the fatty acid content of the extracted lipid is between about 1.0 and about 3.0, between about 0.02 and about 0.1, between about 0.1 and about 1, between about 0.1 and about 0.5, less than about 0.50, less than about 0.40, less than about 0.30, less than about 0.20, less than about 0.15, about 0.02, about 0.05, about 0.1, about 0.2 or about 1.0,

xxv) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of oleic acid to LA by Δ12-desaturase of at least about 60%, at least about 70%, at least about 80%, between about 60% and about 98%, between about 70% and about 95%, or between about 75% and about 90%,

xxvi) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of ALA to SDA by Δ6-desaturase of at least about 30%, at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, between about 30% and about 70%, between about 35% and about 60%, or between about 50% and about 70%,

xxvii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of SDA to ETA acid by Δ6-elongase of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 88%, or between about 75% and about 85%,

xxviii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of ETA to EPA by Δ5-desaturase of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, between about 60% and about 99%, between about 70% and about 99%, or between about 75% and about 98%,

xxix) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of EPA to DPA by Δ5-elongase of at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, between about 50% and about 99%, between about 85% and about

99%, between about 50% and about 95%, or between about 85% and about 95%,

xxx) if the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%, the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of DPA to DHA by Δ4-desaturase of at least about 80%, at least about 90%, at least about 93%, between about 50% and about 95%, between about 80% and about 95%, or between about 85% and about 95%,

xxxi) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of oleic acid to DPA and/or DHA of at least about 10%, at least about 15%, at least about 20%, at least about 25%, about 20%, about 25%, about 30%, between about 10% and about 50%, between about 10% and about 30%, between about 10% and about 25% or between about 20% and about 30%,

xxxii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of LA to DPA and/or DHA of at least about 15%, at least about 20%, at least about 22%, at least about 25%, at least about 30%, at least about 40%, about 25%, about 30%, about 35%, about 40%, about 45%, about 50%, between about 15% and about 50%, between about 20% and about 40%, or between about 20% and about 30%,

xxxiii) the fatty acid composition of the lipid is based on an efficiency of conversion of ALA to DPA and/or DHA of at least about 17%, at least about 22%, at least about 24%, at least about 30%, about 30%, about 35%, about 40%, about 45%, about 50%, about 55%, about 60%, between about 22% and about 70%, between about 17% and about 55%, between about 22% and about 40%, or between about 24% and about 40%,

xxxiv) the total fatty acid in the extracted lipid has less than 1.5% C20:1, less than 1% C20:1 or about 1% C20:1,

xxxv) the triacylglycerol (TAG) content of the lipid is at least about 70%, at least about 80%, at least about 90%, at least 95%, between about 70% and about 99%, or between about 90% and about 99%,

xxxvi) the lipid comprises diacylglycerol (DAG), which DAG preferably comprises DHA and/or DPA,

xxxvii) the lipid comprises less than about 10%, less than about 5%, less than about 1%, or between about 0.001% and about 5%, free (non-esterified) fatty acids and/or phospholipid, or is essentially free thereof,

xxxviii) at least 70%, at least 72% or at least 80%, of the DHA and/or DPA esterified in the form of TAG is in the *sn*-1 or *sn*-3 position of the TAG,

xxxix) the most abundant DHA-containing TAG species in the lipid is DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12),

xl) the most abundant DPA-containing TAG species in the lipid is DPA/18:3/18:3 (TAG 56:12),

xli) the lipid comprises tri-DHA TAG (TAG 66:18), and

xlii) the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is about 7%, about 8%, about 9%, about 10%, about 12%, about 15%, about 18%, about 20%, about 22%, about 24%, about 26%, about 28%, about 31%, between about 7% and about 31%, between about 7% and about 28%, between about 10% and 35%, between about 10% and about 30%, between about 10% and about 25%, between about 10% and about 22%, between about 14% and 35%, between about 16% and 35%, between about 16% and about 30%, between about 16% and about 25%, or between about 16% and about 22%, optionally wherein the level of DHA is less than 0.5% of the total fatty acid content of the extracted lipid.

4. The lipid according to any one of claims 1 to 3, wherein the lipid is an oil, preferably oil from an oilseed, more preferably wherein the lipid comprises or is *Brassica sp.* oil such as *Brassica napus* oil or *Brassica juncea* oil, *Gossypium hirsutum* oil, *Linum usitatissimum* oil, *Helianthus sp.* oil, *Carthamus tinctorius* oil, *Glycine max* oil, *Zea mays* oil, *Elaesis guineenis* oil, *Nicotiana benthamiana* oil, *Lupinus angustifolius* oil, *Camelina sativa* oil, *Crambe abyssinica* oil, *Miscanthus x giganteus* oil, or *Miscanthus sinensis* oil.

5. A process for producing extracted plant lipid, comprising the steps of

i) obtaining a plant part comprising lipid, the lipid comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA) and γ-linolenic acid (GLA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and optionally one or more of eicosapentaenoic acid (EPA) and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the extracted lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the extracted lipid, if present, is less than 1%, and wherein the level of DHA in the

MARKED-UP COPY
PCT/AU2014/050433
Received 19 May 2015

total fatty acid content of extractable lipid in the plant part is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%, and

ii) extracting lipid from the plant part,

wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 20.1% and 30% or between 20.1% and 35%.

6. A process for producing extracted plant lipid ~~or microbial lipid~~, comprising the steps of

i) obtaining a plant part ~~or a microbial cell~~ comprising lipid, the lipid comprising fatty acids in an esterified form, the fatty acids comprising oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), docosapentaenoic acid (DPA), and optionally one or more of eicosapentaenoic acid (EPA) and eicosatetraenoic acid (ETA), wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of extractable lipid in the plant part is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of extractable lipid in the plant part, if present, is less than 1%, and wherein the level of DPA in the total fatty acid content of extractable lipid in the plant part is between 7% and 35%, and

ii) extracting lipid from the plant part ~~or microbial cell~~,

wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the extracted lipid is between 7% and 35%.

7. The process of claim 5 or claim 6, wherein the extracted lipid has one or more of the features defined in claim 3 or claim 4.

8. The process of any one of claims 5 to 7, wherein the plant part is a seed, preferably an oilseed such as *Brassica sp.* such as *Brassica napus* or *Brassica juncea, Gossypium hirsutum, Linum usitatissimum, Helianthus sp., Carthamus tinctorius, Glycine max, Zea mays, Elaesis guineenis, Nicotiana benthamiana, Lupinus angustifolius, Camelina sativa, or Crambe abyssinica*, preferably a *Brassica napus, B. juncea* or *C. sativa* seed.

9. The process according to any one of claims 5 to 8, wherein the plant part ~~or microbial cell~~ comprises exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) an ω3-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

ii) a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

iii) a Δ12-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

iv) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

v) an ω3-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

vi) a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and a Δ5-elongase,

vii) a Δ12-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

viii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

ix) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

x) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and a Δ5-elongase,

xi) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

xii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

and wherein each polynucleotide is operably linked to one or more promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in a cell of the plant part ~~or microbial cell~~.

10. The process of claim 9, wherein the plant part or ~~microbial cell~~ has one or more or all of the following features

i) the Δ12-desaturase converts oleic acid to linoleic acid in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ with an efficiency of at least about 60%, at least about 70%, at least about 80%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 90%, or between about 75% and about 85%,

ii) the ω3-desaturase converts ω6 fatty acids to ω3 fatty acids in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ with an efficiency of at least about 65%, at

least about 75%, at least about 85%, between about 65% and about 95%, between about 75% and about 91%, or between about 80% and about 91%,

iii) the Δ6-desaturase converts ALA to SDA in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ with an efficiency of at least about 20%, at least about 30%, at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, between about 30% and about 70%, between about 35% and about 60%, or between about 50% and about 70%,

iv) the Δ6-desaturase converts linoleic acid to γ-linolenic acid in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ with an efficiency of less than about 5%, less than about 2.5%, less than about 1%, between about 0.1% and about 5%, between about 0.5% and about 2.5%, or between about 0.5% and about 1%,

v) the Δ6-elongase converts SDA to ETA in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ with an efficiency of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 80%, or between about 75% and about 80%,

vi) the Δ5-desaturase converts ETA to EPA in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ with an efficiency of at least about 60%, at least about 70%, at least about 75%, at least about 80%, at least about 90%, between about 60% and about 95%, between about 70% and about 95%, or between about 75% and about 95%,

vii) the Δ5-elongase converts EPA to DPA in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ with an efficiency of at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, between about 50% and about 90%, or between about 85% and about 95%,

viii) the Δ4-desaturase converts DPA to DHA in one or more cells of the plant part with an efficiency of at least about 80%, at least about 90%, at least about 93%, between about 50% and about 95%, between about 80% and about 95%, or between about 85% and about 95%,

ix) the efficiency of conversion of oleic acid to DHA or DPA in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ is at least about 10%, at least about 15%, at least about 20%, at least about 25%, about 20%, about 25%, about 30%, between about 10% and about 50%, between about 10% and about 30%, between about 10% and about 25%, or between about 20% and about 30%,

x) the efficiency of conversion of LA to DHA or DPA in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ is at least about 15%, at least about 20%, at least about 22%, at least about 25%, at least about 30%, about 25%, about 30%, about 35%,

between about 15% and about 50%, between about 20% and about 40%, or between about 20% and about 30%,

xi) the efficiency of conversion of ALA to DHA or DPA in one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ is at least about 17%, at least about 22%, at least about 24%, at least about 30%, about 30%, about 35%, about 40%, between about 17% and about 55%, between about 22% and about 35%, or between about 24% and about 35%,

xii) one or more cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ comprise at least about 25%, at least about 30%, between about 25% and about 40%, or between about 27.5% and about 37.5%, more ω3 fatty acids than corresponding cells lacking the exogenous polynucleotides,

xiii) the Δ6-desaturase preferentially desaturates α-linolenic acid (ALA) relative to linoleic acid (LA),

xiv) the Δ6-elongase also has Δ9-elongase activity,

xv) the Δ12-desaturase also has Δ15-desaturase activity,

xvi) the Δ6-desaturase also has Δ8-desaturase activity,

xvii) the Δ8-desaturase also has Δ6-desaturase activity or does not have Δ6-desaturase activity,

xviii) the Δ15-desaturase also has ω3-desaturase activity on GLA,

xix) the ω3-desaturase also has Δ15-desaturase activity on LA,

xx) the ω3-desaturase desaturates both LA and/or GLA,

xxi) the ω3-desaturase preferentially desaturates GLA relative to LA,

xxii) one or more or all of the desaturases have greater activity on an acyl-CoA substrate than a corresponding acyl-PC substrate,

xxiii) the Δ6-desaturase has greater Δ6-desaturase activity on ALA than LA as fatty acid substrate,

xxiv) the Δ6-desaturase has greater Δ6-desaturase activity on ALA-CoA as fatty acid substrate than on ALA joined to the *sn*-2 position of PC as fatty acid substrate,

xxv) the Δ6-desaturase has at least about a 2-fold greater Δ6-desaturase activity, at least 3-fold greater activity, at least 4-fold greater activity, or at least 5-fold greater activity, on ALA as a substrate compared to LA,

xxvi) the Δ6-desaturase has greater activity on ALA-CoA as fatty acid substrate than on ALA joined to the *sn*-2 position of PC as fatty acid substrate,

xxvii) the Δ6-desaturase has at least about a 5-fold greater Δ6-desaturase activity or at least 10-fold greater activity, on ALA-CoA as fatty acid substrate than on ALA joined to the *sn*-2 position of PC as fatty acid substrate,

xxviii) the desaturase is a front-end desaturase, and

xxix) the Δ6-desaturase has no detectable Δ5-desaturase activity on ETA.

11. The process of claim 9 or claim 10, wherein the plant part ~~or the microbial cell~~ further comprises an exogenous polynucleotide encoding a diacylglycerol acyltransferase (DGAT), monoacylglycerol acyltransferase (MGAT), glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase (LPAAT) preferably an LPAAT which can use a C22 polyunsaturated fatty acyl-CoA substrate such as DHA-CoA and/or DPA-CoA, acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT), phospholipase A_2 (PLA_2), phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD), CDP-choline diacylglycerol choline phosphotransferase (CPT), phoshatidylcholine diacylglycerol acyltransferase (PDAT), phosphatidylcholine:diacylglycerol choline phosphotransferase (PDCT), acyl-CoA synthase (ACS), or a combination of two or more thereof.

12. The process according to any one of claims 9 to 11, wherein the exogenous polynucleotides are covalently linked in a DNA molecule, preferably a T-DNA molecule, integrated into the genome of cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ and preferably where the number of such DNA molecules integrated into the genome of the cells of the plant part ~~or the microbial cell~~ is not more than one, not more than two or three, or is two or three.

13. The process according to any one of claims 5 to 12, wherein the total oil content of the plant part ~~or the microbial cell~~ comprising the exogenous polynucleotides is at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, between about 50% and about 80%, or between about 80% and about 100% of the total oil content of a corresponding plant part ~~or microbial cell~~ lacking the exogenous polynucleotides.

14. The process according to any one of claims 5 to 13 which further comprises treating the lipid to increase the level of DHA and/or DPA as a percentage of the total fatty acid content, wherein the treatment comprises one or more of fractionation, distillation or transesterification such as the production of methyl- or ethyl-esters of DHA and/or DPA.

15. An oilseed plant or part thereof comprising

a) lipid in its seed, the lipid comprising fatty acids in an esterified form, and

b) exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

ii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

wherein each polynucleotide is operably linked to one or more seed-specific promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in developing seed of the plant, wherein the fatty acids comprise oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA) and optionally γ-linolenic acid (GLA), ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and optionally eicosapentaenoic acid (EPA) and/or eicosatetraenoic acid (ETA), and wherein the level of DHA in the total fatty acid content of the lipid of the seed is between 20.1% and 30%, or between 20.1% and 35%, and wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the lipid is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the lipid, if present, is less than 1%.

16. An oilseed plant comprising lipid in its seed, or part thereof~~, or a microbial cell~~, comprising

a) lipid comprising fatty acids in an esterified form, and

b) exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

ii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

iii) a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

iv) a ω3-desaturase and/or Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

wherein each polynucleotide is operably linked to one or more seed-specific promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in developing seed of the plant~~, or one or more promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in the microbial cell~~, wherein the fatty acids comprise oleic acid, palmitic acid, ω6 fatty acids which comprise linoleic acid (LA),

ω3 fatty acids which comprise α-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), and docosapentaenoic acid (DPA), and optionally docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and/or eicosatetraenoic acid (ETA), and wherein the level of palmitic acid in the total fatty acid content of the lipid of the seed is between about 2% and 16%, and wherein the level of myristic acid (C14:0) in the total fatty acid content of the lipid of the seed, if present, is less than 1%, and wherein the level of DPA in the total fatty acid content of the lipid of the seed ~~or microbial cell~~ is between 7% and 35%.

17. A *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant which is capable of producing seed comprising DHA and/or DPA, wherein mature, harvested seed of the plant has a DHA and/or DPA content of at least about 28mg per gram seed, preferably at least about 32mg per gram seed, at least about 36mg per gram seed, at least about 40mg per gram seed, more preferably at least about 44mg per gram seed or at least about 48mg per gram seed, about 80 mg per gram seed, or between about 30mg and about 80mg per gram seed.

18. A plant cell of claim 15 or claim 16 comprising the exogenous polynucleotides.

19. A plant part, preferably a seed, ~~or a microbial cell~~ which has one or more of the following features

i) is from a plant according to any one of claims 15 to 17,

ii) comprises lipid as defined in any one of claims 1 to 4, or

iii) can be used in a process according to any one of claims 5 to 14.

20. Mature, harvested *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* seed comprising DHA and/or DPA and a moisture content of between about 4% and about 15% by weight, preferably between about 6% and about 8% by weight or between about 4% and about 8% by weight, wherein the DHA and/or DPA content of the seed at least about 28mg per gram seed, preferably at least about 32mg per gram seed, at least about 36mg per gram seed, at least about 40mg per gram seed, more preferably at least about 44mg per gram seed or at least about 48mg per gram seed, about 80 mg per gram seed, or between about 30mg and about 80mg per gram seed.

21. A method of producing a plant ~~or a microbial cell~~ which can be used to produce extracted plant lipid ~~or extracted microbial lipid~~ according any one of claims 1 to 4, the method comprising

a) assaying the level of DHA and/or DPA in lipid produced by one or more plant parts ~~or microbial cells~~ from a plurality of plants ~~or microbial cells~~, each plant ~~or microbial cell~~ comprising one or more exogenous polynucleotides encoding one of the following sets of enzymes;

i) an ω3-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

ii) a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

iii) a Δ12-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

iv) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase,

v) an ω3-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

vi) a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elngase and a Δ5-elongase,

vii) a Δ12-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

viii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ4-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

ix) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and a Δ5-elongase,

x) an ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and a Δ5-elongase,

xi) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ6-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ6-elongase and an Δ5-elongase, or

xii) a Δ12-desaturase, a ω3-desaturase or a Δ15-desaturase, a Δ8-desaturase, a Δ5-desaturase, a Δ9-elongase and an Δ5-elongase,

wherein each polynucleotide is operably linked to one or more promoters that are capable of directing expression of said polynucleotides in a cell of a plant part ~~or microbial cell~~, and

b) identifying a plant ~~or microbial cell~~, from the plurality of plants ~~or microbial cells~~, which can be used to produce extracted plant lipid ~~or microbial lipid~~ according to any one of claims 1 to 4 in one or more of its parts, and

c) optionally, producing progeny plants ~~or microbial cells~~ from the identified plant ~~or microbial cell~~, or seed therefrom.

22. A method of producing seed, the method comprising,

a) growing a plant according to any one of claims 15 to 17, or a plant which produces a plant part of claim 19, or which produces a seed of claim 20, preferably in a field as part of a population of at least 1000 or 2000 or 3000 such plants or in an area of at least 1 hectare or 2 hectares or 3 hectares planted at a standard planting density,

b) harvesting seed from the plant or plants, and

c) optionally, extracting lipid from the seed, preferably to produce oil with a total DHA and/or DPA yield of at least 60kg or 70kg or 80kg DHA and/or DPA/hectare.

23. The plant, plant cell, plant part or seed~~, or microbial cell,~~ of any one of claims 15 to 20, which has one or more of the following features

i) comprises oil is as defined in claim 3 or claim 4, and

ii) the plant part or seed ~~or microbial cell~~ is capable of being used in a process according to any one of claims 5 to 14.

24. Lipid, or oil, produced by, or obtained from, using the process according to any one of claims 5 to 14, the cell according to claim 18, the oilseed plant of claim 15 or claim 16, ~~the microbial cell of claim 16,~~ the *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant of claim 17, the plant part of claim 19, or the seed of claim 20.

25. Seedmeal obtained from seed of claim 20, or obtained from the plant of any one of claims 15 to 17.

26. A composition comprising one or more of the lipid or oil of claim 24, the cell according to claim 18, the plant cell ~~or microbial cell~~ of claim 23, the seed of claim 20, or the seedmeal of claim 25.

27. Feedstuffs, cosmetics or chemicals comprising one or more of the lipid or oil of claim 24, the cell according to claim 18, the oilseed plant of claim 15 or claim 16, the

plant cell ~~or microbial cell~~ of claim 23, the *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant of claim 17, the plant part of claim 23, the seed of claim 20, the seedmeal of claim 25, or the composition of claim 26.

28. A method of producing a feedstuff, the method comprising mixing one or more of the lipid or oil according to any one of claims 1 to 4, the cell according to claim 18, the oilseed plant of claim 15 or claim 16, the plant cell ~~or microbial cell~~ of claim 23, the *Brassica napus, B. juncea* or *Camelina sativa* plant of claim 17, the plant part of claim 23, the seed of claim 20, the seedmeal of claim 25, or the composition of claim 26, with at least one other food ingredient.

29. Use of one or more of the lipid or oil according to any one of claims 1 to 4, the cell according to claim 18, the plant cell ~~or microbial cell~~ of claim 23, the plant part of claim 23, the seed of claim 20, the seedmeal of claim 25, or the composition of claim 26, for the manufacture of a medicament for treating or preventing a condition which would benefit from a PUFA.

REIVINDICACIONES

1. Lípido vegetal extraído, que comprende ácidos grasos en forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido αlinolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístco (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído, si está presente, es menor que 1 %, y donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %.

2. Lípido vegetal extraído que comprende ácidos grasos en forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosapentaenoico (DPA) y opcionalmente uno o más ácidos estearidónicos (SDA), ácidos

eicosapentaneoicos (EPA), y ácidos eicosatetranoicos (ETA), donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído, si está presente, es menor que 1 %, y donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 7 % y 35 %.

3. El lípido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene una o más de las siguientes características:

i) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 15 % o entre alrededor de 3 % y alrededor de 10 %,

ii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de alrededor de 0.1 %,

iii) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 1 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 3 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 6 % y alrededor de 30 %, entre 1 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 60 %, alrededor de 45 % a alrededor de 60 %, alrededor de 30% o entre alrededor de 15 % y alrededor de 30 %,

iv) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 4 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 4 % y alrededor de 17 % o entre alrededor de 5 % y alrededor de 10 %,

v) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 40 %, entre alrededor de 7 % y alrededor de 40 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 4 % y 16 % o entre alrededor de 2 % y 16 %,

vi) el nivel de ácido γ-linolénico (GLA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que 4 %, menor que alrededor de 3 %, menor que alrededor de 2 %, menor que alrededor de 1 %, menor que alrededor de 0.5 %, entre 0.05 % y 7 %, entre 0.05 % y 4 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

vii) el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que alrededor de 10 %, menor que alrededor de 8 %, menor que alrededor de 7 %, menor que alrededor de 6 %, menor que alrededor de 4 %, menor que alrededor 3 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 7 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 6 %, entre 0.05 % y alrededor de 4 %, entre

alrededor de 0.05 % y alrededor de 3 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 10 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

viii) el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que alrededor de 6 %, menor que alrededor de 5 %, menor que alrededor de 4 %, menor que alrededor de 1 %, menor que alrededor de 0.5 %, entre alrededor de 0.05 % y alrededor de 6 %, entre 0.05 % y alrededor de 5 %, entre 0.05 % y alrededor de 4 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2%,

ix) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que 4 %, menor que alrededor de 2 %, menor que alrededor de 1 %, entre 0.05 % y 4 %, entre 0.05 % y 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 % o entre 0.05 % y alrededor de 1 %,

x) el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 4 % y 15 %, menor que 4 %, menor que alrededor de 3 %, menor que alrededor de 2 %, entre 0.05 % y 10 %, entre 0.05 % y 5 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

xi) si el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %, el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el

contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que 4 %, menor que alrededor de 3 %, menor que alrededor de 2 %, entre 0.05 % y 8 %, entre 0.05 % y 5 %, entre 0.05 % y alrededor de 3 %, entre 5 % y 15 %, entre 5 % y 10 % o entre 0.05 % y alrededor de 2 %,

xii) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de alrededor de 22 %, alrededor de 24 %, alrededor de 26 %, alrededor de 28 %, alrededor de 31 %, entre 20.1 % y 29 %, entre 20.1 % y 28 %, entre 20.1 % y alrededor de 27 %, entre 20.1 % y alrededor de 26 %, entre 20.1 % y alrededor de 25 %, entre 20.1 % y alrededor de 24 %, entre 21 % y 35 %, entre 21 % y 30 %, entre 21 % y 28 %, entre 21 % y alrededor de 26 % o entre 21 % y alrededor de 24 %,

xiii) el lípido comprende ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácidos grasos,

xiv) el lípido comprende menos que 0.1 % de ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácido graso,

xv) el lípido comprende menos que 0.1 % de uno o más o todos de SDA, EPA y ETA en su contenido de ácidos grasos,

xvi) el nivel total de ácidos grasos saturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 25 %, entre alrededor

de 4 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 6 % y alrededor de 20 % o entre alrededor de 6 % y alrededor de 12 %,

xvii) el nivel total de ácidos grasos monoinsaturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 4 % y alrededor de 40 %, entre alrededor de 4 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 8 % y alrededor de 25 %, entre 8 % y alrededor de 22 %, entre alrededor de 15 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 15 % y alrededor de 35 %,

xviii) el nivel total de ácidos grasos poliinsaturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 20 % y alrededor de 75 %, entre 30 % y 75 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 75 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 % o entre alrededor de 60 % y alrededor de 75 %,

xix) el nivel total de ácidos grasos ω6 en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 35 % y alrededor de 50 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 6 % y 20 %, menor que 20 %, menor que alrededor de 16%, menor que alrededor de 10 %, entre alrededor de 1 % y alrededor de 16 %, entre alrededor de 2 % y alrededor de 10 % o entre alrededor de 4 % y alrededor de 10 %,

xx) el nivel de ácidos grasos ω6 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es menor que alrededor de 10 %, menor que alrededor de 8 %, menor que alrededor de 6 %, menor que 4 %, entre alrededor de 1 % y alrededor de 20 %, entre alrededor de 1 % y alrededor de 10 %, entre 0.5 % y alrededor de 8 %, o entre alrededor de 0.5 % y 4 %,

xxi) el nivel total de ácidos grasos ω3 en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 36 % y alrededor de 65 %, entre 36 % y alrededor de 70 %, entre 40 % y alrededor de 60 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 60 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 60 %, entre 40 % y alrededor de 65 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 65 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 65 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 % o alrededor de 70 %,

xxii) el nivel de ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 21 % y alrededor de 45 %, entre 21 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 23 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 25 % y alrededor de 35 %, entre alrededor de 27 % y alrededor de 35 %, alrededor de 23 %, alrededor de 25 %, alrededor de 27 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 % o alrededor de 45 %,

xxiii) la relación de total de ácidos grasos ω6:total de ácidos grasos ω3 en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 1.0 y alrededor de 3.0, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 1, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 0.5, menor que alrededor de 0.50, menor que alrededor de 0.40, menor que alrededor de 0.30, menor que alrededor de 0.20, menor que alrededor de 0.15, alrededor de 1.0, alrededor de 0.1, de alrededor de 0.10 a alrededor de 0.4 o alrededor de 0.2,

xxiv) la relación de ácidos grasos ω6 nuevos:ácidos grasos ω3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 1.0 y alrededor de 3.0, entre alrededor de 0.02 y alrededor de 0.1, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 1, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 0.5, menor que alrededor de 0.50, menor que alrededor de 0.40, menor que alrededor de 0.30, menor que alrededor de 0.20, menor que alrededor de 0.15, alrededor de 0.02, alrededor de 0.05, de alrededor de 0.1 a alrededor de 0.2 o alrededor de 1.0,

xxv) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por Δ12-desaturasa de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 98%, entre alrededor de 70 % y alrededor de 95

% o entre alrededor de 75 % y alrededor de 90 %,

xxvi) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a SDA mediante Δ6-desaturasa de al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 70 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 60 % o entre alrededor de 50 % y alrededor de 70 %,

xxvii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA mediante Δ6-elongasa de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 88 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 85 %,

xxviii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ETA a EPA mediante Δ5-desaturasa de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 99 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 99 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 98 %,

xxix) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de EPA en DPA mediante Δ5-elongasa de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, entre alrededor de 50% y alrededor

de 99 %, entre alrededor de 85 % y alrededor de 99 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 85 % y alrededor de 95 %,

xxx) si el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %, la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de DPA en DHA mediante Δ4-desaturasa de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 93 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 80 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 85 % y alrededor de 95 %,

xxxi) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico en DPA y/o DHA de al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 50%, entre alrededor de 10 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 25 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

xxxii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de LA en DPA y/o DHA de al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 25 %, al menos

alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, entre alrededor de 15 % y alrededor de 50 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

xxxiii) la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA en DPA y/o DHA de al menos alrededor de 17 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 24 %, al menos alrededor de 30 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, entre alrededor de 22 % y alrededor de 70%, entre alrededor de 17 % y alrededor de 55 %, entre alrededor de 22 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 24 % y alrededor de 40 %,

xxxiv) el total de ácidos grasos en el lípido extraído tiene menos que 1.5 % C20:1, menos que 1 % C20:1 o alrededor de 1 % C20:1,

xxxv) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 99 % o entre alrededor de 90 % y alrededor de 99 %,

xxxvi) el lípido comprende diacilglicerol (DAG), donde dicho

DAG comprende preferentemente DHA y/o DPA,

xxxvii) el lípido comprende menos de alrededor de 10 %, menos de alrededor de 5 %, menos de alrededor de 1 % o entre alrededor de 0.001 % y alrededor de 5 %, ácidos grasos libres (no esterificados) y/o fosfolípido o es esencialmente libre de estos,

xxxviii) al menos 70 %, al menos 72 % o al menos 80 %, del DHA y/o DPA esterificado en forma de TAG está en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG,

xxxix) la especie de TAG que contiene DHA de manera más abundante en el lípido es DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12),

xl) la especie de TAG que contiene DPA de manera más abundante en el lípido es DPA/18:3/18:3 (TAG 56:12),

xli) el lípido comprende TAG con tri-DHA (TAG 66:18), y

xlii) el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 12 %, alrededor de 15 %, alrededor de 18 %, alrededor de 20 %, alrededor de 22 %, alrededor de 24 %, alrededor de 26 %, alrededor de 28 %, alrededor de 31 %, entre alrededor de 7 % y alrededor de 31 %, entre alrededor de 7 % y alrededor de 28 %, entre alrededor de 10 % y 35 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 25 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 22 %, entre

alrededor de 14 % y 35 %, entre alrededor de 16 % y 35 %, entre alrededor de 16 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 16 % y alrededor de 25 % o entre alrededor de 16 % y alrededor de 22 %, opcionalmente donde el nivel de DHA es menor que 0.5 % del contenido total de ácidos grasos del lípido extraído.

4. El lípido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el lípido es un aceite, preferentemente un aceite de una oleaginosa, más preferentemente donde el lípido comprende o es aceite de ***Brassica sp.,*** tal como aceite de ***Brassica napus*** o aceite de ***Brassica juncea,*** aceite de ***Gossypium hirsutum,*** aceite de ***Linum usitatissimum,*** aceite de ***Helianthus sp.,*** aceite de ***Carthamus tinctorius,*** aceite de ***Glycine max,*** aceite de ***Zea mays,*** aceite de ***Elaesis guineenis,*** aceite de ***Nicotiana benthamiana,*** aceite de ***Lupinus angustifolius,*** aceite de ***Camelina sativa,*** aceite de ***Crambe abyssinica,*** aceite de ***Miscanthus x giganteus*** o aceite de ***Miscanthus sinensis.***

5. Un proceso para producir un lípido vegetal extraído que comprende las siguientes etapas:

i) obtener una parte de una planta, donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, donde los

ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más ácidos eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído, si está presente, es menor que 1 %, y donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble en la parte de la planta es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %, y

ii) extraer el lípido de la parte de la planta,

donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 20.1 % y 30 % o entre 20.1 % y 35 %.

6. Un proceso para producir un lípido vegetal extraído, que comprende las siguientes etapas:

i) obtener una parte de una planta que comprende lípidos, donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido

oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído, si está presente, es menor que 1 %, y donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble en la parte de la planta es de entre 7% y 35%, y

ii) extraer el lípido de la parte de la planta ,

donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 7 % y 35 %.

7. El proceso de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, donde el lípido extraído tiene una o más de las características definidas en la reivindicación 3 o la reivindicación 4.

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la parte de la planta es una semilla, preferentemente una oleaginosa tal como ***Brassica sp.*** tal como ***Brassica napus***

o *Brassica juncea, Gossypium hirsutum, Linum usitatissimum, Helianthus sp., Carthamus tinctorius, Glycine max, Zea mays, Elaesis guineenis, Nicotiana benthamiana, Lupinus angustifolius, Camelina sativa, o Crambe abyssinica,* preferentemente una semilla de ***Brassica napus, B. juncea*** o ***C. sativa***.

9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde la parte de la planta comprende polinucleótidos exógenos que codifican una o más de las siguientes enzimas;

i) una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa,una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongase y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iv) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

v) una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vi) una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vii) una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

viii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

ix) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

x) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

xi) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

xii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

y donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de la planta.

10. El proceso de la reivindicación 9, donde la parte de la planta tiene una o más o todas de las siguientes características

i) la Δ12-desaturasa convierte ácido oleico en ácido linoleico en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 90 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 85 %,

ii) la ω3-desaturasa convierte ácidos grasos ω6 en ácidos grasos ω3 en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 65 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 85 %, entre alrededor de 65 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 75 % y alrededor de 91 % o entre alrededor de 80 % y alrededor de 91 %,

iii) la Δ6-desaturasa convierte ALA en SDA en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, entre alrededor de 30 % y alrededor de 70 %, entre alrededor de 35 % y alrededor de 60 % o entre alrededor de 50 % y alrededor

de 70 %,

iv) la Δ6-desaturasa convierte ácido linoleico en ácido γ-linolénico en una o más células de la parte de la planta con una eficacia menor que alrededor de 5 %, menor que alrededor de 2.5 %, menor que alrededor de 1 %, entre alrededor de 0.1 % y alrededor de 5 %, entre alrededor de 0.5 % y alrededor de 2.5 % o entre alrededor de 0.5 % y alrededor de 1 %,

v) la Δ6-elongasa convierte SDA en ETA en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 80 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 80 %,

vi) la Δ5-desaturasa convierte ETA en EPA en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, entre alrededor de 60 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 70 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 75 % y alrededor de 95 %,

vii) la Δ5-elongasa convierte EPA en DPA en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 90

% o entre alrededor de 85 % y alrededor de 95 %,

viii) la Δ4-desaturasa convierte DPA en DHA en una o más células de la parte de la planta con una eficacia de al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 93 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 95 %, entre alrededor de 80 % y alrededor de 95 % o entre alrededor de 85% y alrededor de 95 %,

ix) la eficacia de conversión de ácido oleico en DHA o DPA en una o más células de la parte de la planta es de al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 25 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 50%, entre alrededor de 10 % y alrededor de 30 %, entre alrededor de 10 % y alrededor de 25 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

x) la eficacia de conversión de LA en DHA o DPA en una o más células de la parte de la planta es de al menos alrededor de 15 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 25 %, al menos alrededor de 30 %, alrededor de 25 %, entre alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, entre alrededor de 15 % y alrededor de 50 %, entre alrededor de 20 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 20 % y alrededor de 30 %,

xi) la eficacia de conversión de ALA en DHA o DPA en una o

más células de la parte de la planta es de al menos alrededor de 17 %, al menos alrededor de 22 %, al menos alrededor de 24 %, al menos alrededor de 30 %, alrededor de 30 %, entre alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, entre alrededor de 17 % y alrededor de 55 %, entre alrededor de 22 % y alrededor de 35 % o entre alrededor de 24 % y alrededor de 35 %,

xii) una o más células de la parte de la planta comprenden al menos alrededor de 25 %, al menos alrededor de 30 %, entre alrededor de 25 % y alrededor de 40 % o entre alrededor de 27.5 % y alrededor de 37.5 %, más de ácidos grasos ω3 que las células correspondientes que carecen de polinucleótidos exógenos,

xiii) la Δ6-desaturasa preferentemente desatura el ácido α-linolénico (ALA) en relación con ácido linoleico (LA),

xiv) la Δ6-elongasa tiene, además, actividad de Δ9-elongasa,

xv) la Δ12-desaturasa tiene, además, actividad de Δ15-desaturasa,

xvi) la Δ6-desaturasa tiene, además, actividad de Δ8-desaturasa,

xvii) la Δ8-desaturasa tiene, además, actividad de Δ6-desaturasa o no tiene actividad de Δ6-desaturasa,

xviii) la Δ15-desaturasa tiene, además, actividad de ω3-desaturasa en GLA,

xix) la ω3-desaturasa tiene, además, actividad de Δ15-

desaturasa en LA,

xx) la ω3-desaturasa desatura ambos LA y/o GLA,

xxi) la ω3-desaturasa preferentemente desatura GLA en relación con LA,

xxii) una o más o todas las desaturasas tienen mayor actividad en un sustrato de acil-CoA que un sustrato de acil-PC correspondiente,

xxiii) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad de Δ6-desaturasa en ALA que en LA como sustrato de ácido graso,

xxiv) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad de Δ6-desaturasa en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA unida a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,

xxv) la Δ6-desaturasa tiene al menos alrededor de una actividad de Δ6-desaturasa 2 veces mayor, al menos una actividad 3 veces mayor, al menos una actividad 4 veces mayor, o al menos actividad 5 veces mayor, en ALA como un sustrato en comparación con LA,

xxvi) la Δ6-desaturasa tiene mayor actividad en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA unida a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,

xxvii) la Δ6-desaturasa tiene al menos alrededor de una actividad de Δ6-desaturasa 5 veces mayor o al menos una actividad 10 veces mayor, en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA unida a la posición *sn*-2 de PC como sustrato

de ácido graso,

xxviii) la desaturasa es una desaturasa del extremo delantero,

xxix) la Δ6-desaturasa no tiene actividad de Δ5-desaturasa detectable en ETA.

11. El proceso de la reivindicación 9 o reivindicación 10, donde la parte de la planta comprende además un polinucleótido exógeno que codifica una diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT), glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT) preferentemente una LPAAT que puede usar un sustrato de acil-CoA de ácido graso poliinsaturado C22 tal como DHA-CoA y/o DPA-CoA, acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT), fosfolipasa A_2 (PLA_2), fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD), CDP colina diacilglicerol colinofosfotransferasa (CPT), fosfatidilcolina diacilglicerol aciltransferasa (PDAT), fosfatidilcolina:diacilglicerol colinofosfotransferasa (PDCT), acil-CoA sintasa (ACS), o una combinación de dos o más de estos.

12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde los polinucleótidos exógenos

se enlazan covalentemente en una molécula de ADN, preferentemente una molécula de ADN-T, integrada al genoma de las células de la parte de la planta y preferentemente donde la cantidad de dichas moléculas de ADN integradas al genoma de las células de la parte de la planta no es más de una, no más de dos o tres, o es dos o tres.

13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, donde el contenido total de aceite de la parte de la planta que comprende polinucleótidos exógenos es de al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, entre alrededor de 50 % y alrededor de 80 %, o entre alrededor de 80 % y alrededor de 100 % del contenido total de aceite de una parte de la planta o correspondiente que carece de polinucleótidos exógenos.

14. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13 que comprende además tratar el lípido para aumentar el nivel de DHA y/o DPA como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos, donde el tratamiento comprende una o más de fraccionamiento, destilación o transesterificación, tal como la producción de ésteres de metilo o etilo de DHA y/o DPA.

15. Una planta oleaginosa o una parte de esta que comprende

a) un lípido en su semilla, donde el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores específicos de la semilla que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla en desarrollo de la planta, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA) y opcionalmente ácido γ-linolénico (GLA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido de la semilla es

de entre 20.1 % y 30 %, o entre 20.1 % y 35 %, y donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido, si está presente, es menor que 1 %.

16. Una planta oleaginosa que comprende lípido en su semilla, o una parte de esta que comprende

a) un que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y

b) polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;

i) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

iv) una ω3-desaturasa y/o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-

elongasa,

donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores específicos de las semillas que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la semilla de la planta en desarrollo, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA) y ácido docosapentaenoico (DPA) y opcionalmente ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre alrededor de 2 % y 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído, si está presente, es menor que 1 %, y donde el nivel de DPA en el contenido total de ácidos grasos del lípido de la semilla es de entre 7 % y 35 %.

17. Una planta ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** que es capaz de producir semillas que comprendan DHA y/o DPA, donde la semilla madura cosechada de la planta tiene un contenido de DHA y/o DPA de al menos alrededor de 28 mg por gramo de semilla, preferentemente al menos alrededor de 32 mg

por gramo de semilla, al menos alrededor de 36 mg por gramo de semilla, al menos alrededor de 40 mg por gramo de semilla, más preferentemente al menos alrededor de 44 mg por gramo de semilla o al menos alrededor de 48 mg por gramo de semilla, alrededor de 80 mg por gramo de semilla, o entre alrededor de 30 mg y alrededor de 80 mg por gramo de semilla.

18. Una célula vegetal de la reivindicación 15 o la reivindicación 16 que comprende los polinucleótidos exógenos.

19. Una parte de una planta, preferentemente una semilla que tiene una o más de las siguientes características

i) es de una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17,

ii) comprende lípido tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o

iii) se puede utilizar en un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14.

20. Semilla cosechada madura de ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** que comprende DHA y/o DPA y un contenido de humedad de entre alrededor de 4 % y alrededor de 15 % en peso, preferentemente alrededor de 6 % y alrededor de 8 % en peso o entre alrededor de 4 % y alrededor de 8 % en peso,

donde el contenido de DHA y/o DPA de la semilla es de al menos alrededor de 28 mg por gramo de semilla, preferentemente alrededor de 32 mg por gramo de semilla, al menos alrededor de 36 mg por gramo de semilla, al menos alrededor de 40 mg por gramo de semilla, más preferentemente al menos alrededor de 44mg por gramo de semilla o al menos alrededor de 48mg por gramo de semilla, alrededor de 80 mg por gramo de semilla, o entre alrededor de 30 mg y alrededor de 80 mg por gramo de semilla.

21. Un método para producir una planta que se puede utilizar para producir el lípido vegetal extraído de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1 a 4, donde el método comprende

a) estudiar el nivel de DHA y/o DPA en el lípido producido por una o más partes de plantas a partir de múltiples plantas, donde cada planta comprende uno o más polinucleótidos exógenos que codifican uno o más conjuntos de enzimas;

i) una ω3-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa,una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongase y una Δ5-elongasa,

ii) una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iii) una Δ12-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

iv) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

v) una ω3-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vi) una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

vii) una Δ12-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

viii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ4-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

ix) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa,

x) una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

xi) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ6-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ6-elongasa y una Δ5-elongasa, o

xii) una Δ12-desaturasa, una ω3-desaturasa o una Δ15-desaturasa, una Δ8-desaturasa, una Δ5-desaturasa, una Δ9-elongasa y una Δ5-elongasa,

donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de una planta, y

b) identificar una planta, a partir de las múltiples plantas, que se puede utilizar para producir el lípido vegetal extraído de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una o más de sus partes, y

c) opcionalmente, producir plantas de progenie de la planta identificada, o semilla de esta.

22. Un método para producir una semilla, donde el método comprende,

a) cultivar una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, o una planta que produce una parte de la planta de la reivindicación 19, o que produce una semilla de la reivindicación 20, preferentemente en un campo como parte de una población de al menos 1000 o 2000 o 3000 de dichas plantas o en un área de al menos 1 hectárea o 2 hectáreas o 3 hectáreas plantadas a una densidad de plantación estándar,

b) cosechar la semilla de la planta o las plantas, y

c) opcionalmente, extraer el lípido de la semilla, preferentemente para producir aceite con un rendimiento total de DHA y/o DPA de al menos 60 kg, 70 kg o 80 kg de DHA y/o DPA/hectárea.

23. La planta, célula vegetal, parte de planta o semilla, de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, con una o más de las siguientes características

i) comprende aceite tal como se define en la reivindicación 3 o la reivindicación 4, y

ii) la parte de la planta se puede utilizar en un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14.

24. Lípido o aceite producido u obtenido al utilizar el proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la planta oleaginosa de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, la planta ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** de la reivindicación 17, la parte de la planta de la reivindicación 19, o la semilla de la reivindicación 20.

25. Polvo de semilla obtenido de la semilla de la reivindicación 20, u obtenida de la planta de cualquiera de

las reivindicaciones 15 a 17.

26. Una composición de uno o más del lípido o el aceite de la reivindicación 24, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la célula vegetal de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación20, o el polvo de semilla de la reivindicación 25.

27. Piensos, cosméticos o productos químicos que comprenden uno o más del lípido o el aceite de la reivindicación 24, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la planta oleaginosa de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, la célula vegetal de la reivindicación 23, la planta ***Brassica napus, B. juncea*** o ***Camelina sativa*** de la reivindicación 17, la parte de la planta de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación 20, el polvo de semilla de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 26.

28. Un método para producir piensos, donde el método comprende mezclar uno o más del lípido o el aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la planta oleaginosa de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, la célula vegetal de la reivindicación 23, la planta ***Brassica napus, B. juncea***

o ***Camelina sativa*** de la reivindicación 17, la parte de la planta de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación 20, el polvo de semilla de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 26, con al menos otro ingrediente alimenticio.

29. Uso de uno o más del lípido o el aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la célula de acuerdo con la reivindicación 18, la célula vegetal de la reivindicación 23, la parte de la planta de la reivindicación 23, la semilla de la reivindicación 20, el polvo de semilla de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 26, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección que se podría beneficiar de un PUFA.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

FB RICE
Level 14, 90 Collins St
Melbourne, Victoria 3000
AUSTRALIE

Date of mailing *(day/month/year)*
09 June 2016 (09.06.2016)

Applicant's or agent's file reference
516028

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/AU2014/050433

International filing date *(day/month/year)*
18 December 2014 (18.12.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION
Limestone Avenue
Campbell, Australian Capital Territory 2612
Australia

State of Nationality: AU
State of Residence: AU
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION
CSIRO Black Mountain Science and Innovation Park, Clunies Ross Street
Acton, Australian Capital Territory
Australia

State of Nationality: AU
State of Residence: AU
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Authorized officer
Biarge-Thurre Marina
e-mail pt04.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 04

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

FB RICE
Level 14, 90 Collins St
Melbourne, Victoria 3000
AUSTRALIE

Date of mailing *(day/month/year)*
20 June 2016 (20.06.2016)

Applicant's or agent's file reference
516028

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/AU2014/050433

International filing date *(day/month/year)*
18 December 2014 (18.12.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
SHRESTHA, Pushkar 3 Selection Street Lawson, Australian Capital Territory 2617 Australia	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Authorized officer
Doherty Fiona
e-mail pt04.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 04

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

FB RICE
Level 14, 90 Collins St
Melbourne, Victoria 3000
AUSTRALIE

Date of mailing *(day/month/year)*
20 June 2016 (20.06.2016)

Applicant's or agent's file reference
516028

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/AU2014/050433

International filing date *(day/month/year)*
18 December 2014 (18.12.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
MCALLISTER, Jason Timothy 114 Geelong Road Portarlington, Victoria 3223 Australia	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Authorized officer
Doherty Fiona
e-mail pt04.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 04

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

FB RICE
Level 14, 90 Collins St
Melbourne, Victoria 3000
AUSTRALIE

Date of mailing *(day/month/year)*
20 June 2016 (20.06.2016)

Applicant's or agent's file reference
516028

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/AU2014/050433

International filing date *(day/month/year)*
18 December 2014 (18.12.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
DEVINE, Malcolm David 219 Dormie Place Vernon, British Columbia V1H 1Y5 Canada	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Authorized officer
Doherty Fiona
e-mail pt04.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 04

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

FB RICE
Level 14, 90 Collins St
Melbourne, Victoria 3000
AUSTRALIE

Date of mailing *(day/month/year)*
20 June 2016 (20.06.2016)

Applicant's or agent's file reference
516028

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/AU2014/050433

International filing date *(day/month/year)*
18 December 2014 (18.12.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
DE FEYTER, Robert Charles 10 Stobie Place Monash, Australian Capital Territory 2904 Australia		
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Authorized officer
Doherty Fiona
e-mail pt04.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 04