



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 166 676**

② Número de solicitud: 009902552

⑤ Int. Cl.⁷: C07C 57/12

A01H 5/10

A23D 9/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **19.11.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2002**

Fecha de concesión: **24.06.2003**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2003**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.07.2003

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Haro Bailón, Antonio de;
Fernández-Martínez, José María;
Río Celestino, Mercedes del y
Velasco Varo, Leonardo**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico.**

㉑ Resumen:

Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico.

La presente invención se refiere a un aceite de semilla de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A. Braun) carente de ácido erúico (menos de 2 % en peso respecto al contenido total en ácidos grasos del aceite) y con un contenido en ácido oleico entre el 60 % y el 80 % en peso del total de ácidos grasos. Este tipo de aceite no es producido en la naturaleza por plantas de mostaza etíope y ha sido obtenido mediante un procedimiento biotecnológico. El aceite es muy estable frente a la oxidación y las altas temperaturas, lo que hace que sea especialmente indicado en alimentación humana y también en la industria de aceites lubricantes.

ES 2 166 676 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un aceite de semilla de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A.Braun) carente de ácido erúxico (menos de 2% en peso respecto al contenido total en ácidos grasos del aceite) y con un contenido en ácido oleico entre el 60% y el 80% en peso del total de ácidos grasos. Este tipo de aceite no es producido en la naturaleza por plantas de mostaza etíope y ha sido obtenido mediante un procedimiento biotecnológico. El aceite de mostaza etíope carente de ácido erúxico y con alto contenido en ácido oleico objeto de la presente invención es heredable y se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo.

15 **Estado de la técnica**

La mostaza etíope es una especie vegetal autóctona de Etiopía, donde se cultiva a pequeña escala como verdura y como planta oleaginosa, debido a que sus semillas contienen alto contenido en aceite. Este aceite posee un bajo contenido en ácido oleico, entre el 8% y el 13%, y un alto porcentaje de ácido erúxico, entre el 38% y el 45% (A. Getinet "Review on breeding of Ethiopian mustard, *Brassica carinata* A.Braun", Proceedings 7th International Rapeseed Conference, pag. 593-597, 1987). A finales de los años 50 se planteó la posible existencia de efectos perjudiciales derivados del empleo de aceites ricos en ácido erúxico en alimentación humana, planteamiento que se acentuó a raíz de una serie de estudios realizados durante los años 70, y que pusieron de manifiesto que los ácidos grasos C22:1 resultaban cardiotóxicos en animales, y por tanto, potencialmente tóxicos para el hombre. Por este motivo, aceites con alto contenido en ácido erúxico no deben destinarse a consumo humano. (FAO/OMS, "Las grasas y aceites en la nutrición humana", Estudio FAO: Alimentación y Nutrición, n° 3, FAO, Roma, 1977).

Se han desarrollado hasta la fecha dos tipos de semillas de mostaza etíope que producen aceite con bajo contenido en ácido erúxico, potencialmente utilizables en alimentación humana. El primer tipo se obtuvo a través de un programa de cruzamientos entre diferentes plantas de mostaza etíope con niveles intermedios de este ácido graso (L.C. Alonso y col, "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170-176, 1991). El segundo tipo se obtuvo mediante cruzamientos interespecíficos entre plantas de mostaza etíope con alto contenido en ácido erúxico y plantas de mostaza india (*Brassica juncea* [L.] Czern.) carentes de ácido erúxico (A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793-795, 1994). La composición en ácidos grasos de ambos tipos de semillas, así como del tipo normal, se presenta en la Tabla 1. El contenido en ácido oleico de ambos tipos de semillas de mostaza etíope carentes de ácido erúxico fue inferior al 40%.

40 TABLA 1

Ácidos grasos en aceite de mostaza etíope

| Variedad | 16:0 ¹ | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:1 | 22:1 |
|---------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| Normal ² | 3.7 | 1.0 | 8.9 | 20.5 | 14.7 | 8.1 | 39.0 |
| Cero erúxico ³ | 5.8 | 1.2 | 39.0 | 29.5 | 22.2 | 1.1 | 0.2 |
| Cero erúxico ⁴ | 6.0 | 1.7 | 28.3 | 38.1 | 22.9 | 1.1 | 0.1 |

(1) 16:0=ácido palmítico; 18:0=ácido esteárico; 18:1=ácido oleico; 18:2=ácido linoleico; 18:3=ácido linolénico; 20:1=ácido eicosenoico; 22:1=ácido erúxico.

(2) A. Getinet "Review on breeding of Ethiopian mustard, *Brassica carinata* A.Braun", Proceedings 7th International Rapeseed Conference, pag. 593-597, 1987

(3) L.C. Alonso y col. "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170-176, 1991

(4) A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793-795, 1994.

En la actualidad se buscan aceites vegetales que posean un elevado contenido en ácido oleico, tanto para su empleo en alimentación humana como para su uso industrial. En alimentación humana, un aceite con alto contenido en ácido oleico presenta varias ventajas. En primer lugar, este tipo de aceite es muy estable frente a la oxidación. Durante la misma, se producen sustancias que confieren sabor y olor desagradables, lo que reduce considerablemente la vida media del aceite en el mercado. Asimismo, algunas de las sustancias producidas como consecuencia de la oxidación del aceite están relacionadas con la formación de peróxidos, causantes de la formación de radicales libres que a su vez se han relacionado con procesos cancerígenos (Vles y Gottembos "Nutritional characteristics and food uses of vegetable oils" Oil Crops of the World, McGraw-Hill, EE.UU, pag. 63-86, 1989). En segundo lugar, estudios clínicos han demostrado que aceites ricos en ácido oleico reducen los niveles de colesterol total y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre (Mattson y Grundy "Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man" J. Lipid Res. 26:194-202, 1985). En tercer lugar, el aceite rico en ácido oleico es altamente termoestable, por lo que su uso en frituras es aconsejable (M.C. Dobarganes y col. "Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oils" J. Agr. Food. Chem. 41:678-681, 1993). En el campo industrial, los aceites con alto contenido en ácido oleico son muy demandados, especialmente por parte de la industria de aceites lubricantes, precisamente por su alta termoestabilidad (S. Harold y col. "Varieties of rapeseed oil and derived products for use in fuels and lubricants" Proceedings 9th International Rapeseed Conference, pag. 1341-1344, 1995).

Se han desarrollado variedades de colza (*Brassica napus* L.) (US-5955623; US-5625130; US-5840946; US-5638637) y napina (*Brassica rapa* L.= *Brassica campestris* L.) (US-5638637; US-5840946) con una composición modificada de ácidos grasos, que contienen al menos un 80 % en peso de ácido oleico y menos de un 0.1 % en peso de ácido erúxico, siempre referido al contenido total de ácidos grasos. Sin embargo, no existen en la actualidad plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A.Braun) cuyas semillas produzcan un aceite con las características de bajo contenido en ácido erúxico y alto contenido en ácido oleico que muestran las plantas objeto de la presente invención.

Explicación de la invención

Uno de los objetos de la invención es un aceite vegetal obtenido de semillas de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A.Braun) modificadas biotecnológicamente. Este aceite carece de ácido erúxico (menos del 2 % en peso), lo que le permite ser usado en alimentación humana. Asimismo, este aceite vegetal presenta un alto contenido en ácido oleico, comprendido entre el 60 % y el 80 % en peso del total de ácidos grasos. Los restantes ácidos grasos presentes en el aceite de mostaza etíope objeto de la presente invención están comprendidos entre el 2 % y el 10 % en peso de ácido palmítico; entre el 0.5 % y el 5 % en peso de ácido esteárico; entre el 3 % y el 25 % en peso de ácido linoleico; entre el 4 % y el 12 % en peso de ácido linolénico; e inferior al 4 % en peso de ácido eicosenoico. El contenido de otros ácidos grasos menores (mirístico, palmitoleico, behénico, nervónico) es siempre inferior al 2 % en peso.

Asimismo, las semillas y las plantas modificadas genéticamente que dan lugar al aceite libre de ácido erúxico y con alto contenido en ácido oleico, así como el procedimiento de obtención de dichas plantas, constituyen otro objeto de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Para la obtención de las plantas modificadas genéticamente cuyas semillas producen el aceite objeto de la presente invención se ha llevado a cabo un largo proceso de mejora genética consistente en (1) programa de mutagénesis química, (2) programa de cruzamientos interespecíficos, y (3) programa de recombinación genética entre productos obtenidos en el programa de mutagénesis química y productos obtenidos en el programa de cruzamientos interespecíficos.

El programa de mutagénesis química consistió en el tratamiento de semillas normales con un producto químico con propiedades mutagénicas, esto es, capaz de inducir mutaciones en el ADN de la planta. Para que estas mutaciones resulten útiles, deben ser heredables, por lo que al tratamiento mutagénico siguió un proceso de varios años consistente en la identificación y fijación de aquellas mutaciones heredables que eran transmitidas de generación en generación. Como resultado de este programa se obtuvieron plantas de mostaza etíope cuyas semillas presentaban un incremento en el contenido en ácido oleico respecto a las semillas de plantas normales, aunque mantenían un contenido en ácido erúxico similar al de semillas de plantas normales. El programa de mutagénesis se llevó a cabo durante cinco generaciones, al cabo de las cuales se demostró la estabilidad genética del carácter alto oleico en fondo alto erúxico, independiente de las condiciones de cultivo de las plantas.

El programa de cruzamientos interespecíficos consistió en la transferencia de los genes responsables de la ausencia de ácido erúxico desde material público de colza (nombre científico *Brassica napus* L.) y de mostaza india (nombre científico *Brassica juncea* [L.] Czern.) libres de ácido erúxico (menos del 2 % en peso de ácido erúxico) a una línea seleccionada de mostaza etíope. El programa de cruzamientos interespecíficos se llevó a cabo mediante tres subprogramas: (a) cruzamiento interespecífico entre material de colza libre de ácido erúxico y una línea seleccionada de mostaza etíope, seguido de una generación de retrocruzamiento hacia el parental de mostaza etíope y tres generaciones adicionales de autofecundación; (b) cruzamiento interespecífico entre material de mostaza india libre de ácido erúxico Y una línea seleccionada de mostaza etíope, seguido de una generación de retrocruzamiento hacia el parental de mostaza etíope y tres generaciones adicionales de autofecundación; (c) recombinación genética entre plantas de mostaza etíope procedentes de cruzamientos interespecíficos con material de colza libre de ácido erúxico y plantas de mostaza etíope procedentes de cruzamientos interespecíficos con material de mostaza india libre de ácido erúxico. Dicha recombinación genética se llevó a cabo durante seis generaciones, al cabo de las cuales se demostró la estabilidad del carácter cero erúxico, independiente de las condiciones de cultivo de las plantas.

El programa recombinación genética entre productos obtenidos en el programa de mutagénesis química y productos obtenidos en el programa de cruzamientos interespecíficos se llevó a cabo durante cuatro generaciones, tras las que se demostró la estabilidad de los caracteres cero erúxico y alto oleico, independientes de las condiciones de cultivo de las plantas.

Modo de realización de la invención

Primero. Programa de mutagénesis química

Semillas de mostaza etíope de la línea C-101, con 8.5% de ácido oleico, fueron sumergidas en agua a temperatura ambiente durante 16 horas para promover el ablandamiento de la cubierta externa y, por tanto, favorecer la penetración del agente mutagénico. Pasado este tiempo, se sumergieron por un período de 2 horas a temperatura ambiente y con una agitación continua a 75 r.p.m. en una solución del agente mutagénico metil-sulfonato de etilo (EMS), preparada a una concentración del 1% (vol/vol) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7. Tras el tratamiento mutagénico las semillas se lavaron durante 10 horas en agua corriente, se secaron, y se sembraron en campo. Las plantas correspondientes se cosecharon individualmente, y las semillas de cada una de las plantas cosechadas se sembraron en campo. Las plantas correspondientes se cosecharon individualmente y sus semillas se analizaron para conocer su composición en ácidos grasos. A partir de estos análisis, se seleccionó una planta con un contenido anormalmente alto en ácido oleico (19.3%). En sucesivas generaciones se realizó selección para aumentar y estabilizar su contenido en ácido oleico. Finalmente, se obtuvo una línea en la quinta generación con valores máximos y mínimos de 27.9% y 17.0%, respectivamente, de ácido oleico. La línea se denominó N2-3591. Su composición media en ácidos grasos, comparada con la línea a partir de la que se obtuvo, C-101, se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2
Ácidos grasos en %

| Variedad | 16:0 ¹ | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:1 | 22:1 |
|----------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| C-101 | 3.7 | 1.1 | 8.5 | 20.6 | 11.6 | 7.4 | 43.5 |
| N2-3591 | 3.2 | 1.0 | 23.3 | 8.3 | 6.6 | 9.6 | 47.2 |

(1) 16:0=ácido palmítico; 18:0=ácido esteárico; 18:1=ácido oleico; 18:2=ácido linoleico; 18:3=ácido linolénico; 20:1=ácido eicosenoico; 22:1=ácido erúxico.

Segundo. Programa de cruzamientos interespecíficos

Las plantas de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A.Braun) tienen un genoma en el núcleo de sus células que es de configuración BBCC. Las plantas de mostaza india (nombre científico *Brassica juncea* [L.] Czern) tienen un genoma en el núcleo de sus células que es de configuración AABB. Las plantas de colza (nombre científico *Brassica napus* L.) tienen un genoma en el núcleo de sus células que es de configuración AACC. Para conseguir plantas de genoma BBCC con el aceite de sus semillas

ES 2 166 676 B1

carente de ácido erúcico, se realizó un programa de cruzamientos interespecíficos entre una planta de material público de colza cero erúcico, con menos del 2% en peso de ácido erúcico (*B. napus* L. cv. “Duplo”), una planta de material público de mostaza india cero erúcico, con menos del 2% en peso de ácido erúcico (*B. juncea* cv. “Zem-1”), y una planta de mostaza etíope con niveles normales de ácido erúcico, entre 39% y 49% en peso de ácido erúcico (*B. carinata* cv. “C-101”). Este programa se realizó mediante tres subprogramas:

2.1. Subprograma de cruzamientos entre C-101 y Duplo

Una planta de mostaza etíope C-101 se cruzó con una planta de colza Duplo. Las semillas obtenidas de este cruzamiento se sembraron en macetas y varias de las plantas resultantes se cruzaron de nuevo con plantas de C-101. Las plantas de las semillas resultantes del cruzamiento se autofecundaron durante tres generaciones, tras lo cual se obtuvieron plantas de configuración genómica ABCC, con los genes para cero erúcico procedentes de colza incorporados.

2.2. Subprograma de cruzamientos entre C-101 y Zem-1

Una planta de mostaza etíope C-101 se cruzó con una planta de mostaza india Zem -1. Las semillas obtenidas de este cruzamiento se sembraron en macetas y varias de las plantas resultantes se cruzaron de nuevo con plantas de C-101. Las plantas de las semillas resultantes del cruzamiento se autofecundaron durante tres generaciones, tras lo cual se obtuvieron plantas de configuración genómica BBAC, con los genes para cero erúcico procedentes de mostaza india incorporados.

2.3. Subprograma de cruzamientos entre plantas de configuración genómica ABCC y BBAC

Plantas de configuración genómica ABCC y BBAC se cruzaron entre sí. Las semillas procedentes de los cruzamientos se sembraron. Las plantas a las que dieron lugar se autofecundaron y se cosecharon individualmente. Sus semillas fueron analizadas para conocer la composición en ácidos grasos de su aceite. De un total de 507 plantas analizadas, 45 de ellas presentaron un bajo contenido en ácido erúcico (menos del 2% en peso de este ácido graso). Las semillas de cinco de estas plantas fueron sembradas, tras lo que se realizó un proceso de selección durante tres generaciones. La mejor de estas cinco líneas se denominó 25X-1. Su composición en ácidos grasos, en comparación con sus parentales C-101, Duplo, y Zem-1 se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3
Ácidos grasos en %

| Variedad | 16:0 ¹ | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:1 | 22:1 |
|----------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| 25X-1 | 5.0 | 1.3 | 38.6 | 42.9 | 10.2 | 1.2 | 0.2 |
| C-101 | 3.7 | 1.1 | 8.5 | 20.6 | 11.6 | 7.4 | 43.5 |
| Duplo | 4.1 | 1.5 | 45.3 | 37.2 | 8.7 | 1.7 | 0.2 |
| Zem-1 | 4.1 | 1.2 | 45.4 | 36.8 | 9.5 | 1.9 | 0.3 |

(1) 16:0=ácido palmítico; 18:0=ácido esteárico; 18:1=ácido oleico; 18:2=ácido linoleico; 18:3=ácido linolénico; 20:1=ácido eicosenoico; 22:1=ácido erúcico.

Tercero. Programa de cruzamientos entre N2-3591 y 25X-1

Plantas del mutante alto oleico en fondo alto erúcico, N2-3591, se cruzaron con plantas de la línea cero erúcico 25X-1. Las semillas obtenidas del cruzamiento se sembraron en macetas y las correspondientes plantas se autofecundaron y se cosecharon individualmente. Las semillas procedentes de estas plantas se analizaron para la composición en ácidos grasos de su aceite. De un total de 300 semillas analizadas se identificaron cinco que combinaban el carácter cero erúcico con el carácter alto oleico. Estas semillas se sembraron y autofecundaron, procediéndose a una selección durante dos generaciones para alto contenido en ácido oleico y bajo contenido en ácido erúcico. Al cabo de esta selección se obtuvo la línea IAS-3, que contiene menos del 2% en peso de ácido erúcico y entre el 60% y 80% en peso de ácido oleico. La composición en ácidos grasos de IAS-3, comparada con las líneas a partir de las que se obtuvo y con otras líneas de mostaza etíope cero erúcico desarrolladas hasta la fecha, se muestra en la Tabla 4.

ES 2 166 676 B1

TABLA 4
Ácidos grasos en %

| Variedad | 16:0 ¹ | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:1 | 22:1 |
|---------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| IAS-3 | 3.6 | 1.6 | 74.4 | 10.6 | 7.7 | 1.5 | 0.2 |
| 25X-1 | 5.0 | 1.3 | 38.6 | 42.9 | 10.2 | 1.2 | 0.2 |
| N2-3591 | 3.2 | 1.0 | 23.3 | 8.3 | 6.6 | 9.6 | 47.2 |
| Cero erúxico ² | 5.8 | 1.2 | 39.0 | 29.5 | 22.2 | 1.1 | 0.2 |
| Cero erúxico ³ | 6.0 | 1.7 | 28.3 | 38.1 | 22.9 | 1.1 | 0.1 |

(1) 16:0=ácido palmítico; 18:0=ácido esteárico; 18:1=ácido oleico; 18:2=ácido linoleico; 18:3=ácido linolénico; 20:1=ácido eicosenoico; 22:1=ácido erúxico.

(2) L.C. Alonso y col. "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170 -176, 1991

(3) A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793 -795, 1994

REIVINDICACIONES

1. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico, **caracterizado** porque el contenido en ácido oleico del aceite está comprendido entre el 60 % y el 80 % en peso y el contenido en ácido erúcido es inferior al 2 % en peso respecto al total de ácidos grasos del aceite y adicionalmente, el contenido en ácido linoleico está comprendido entre el 3 % y el 25 % en peso y el contenido en ácido linolénico está comprendido entre el 4 % y el 12 % en peso, referido también al total de ácidos grasos del aceite.
2. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho aceite presenta los siguientes contenidos de otros ácidos grasos, expresados como porcentaje en peso respecto al total de ácidos grasos: ácido palmítico entre el 2 % y el 10 %; ácido esteárico entre el 0.5 % y el 5 %; ácido eicosenoico inferior al 4 %.
3. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el contenido en ácido oleico del aceite está comprendido entre el 70 % y el 80 % en peso respecto al total de ácidos grasos del aceite.
4. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque el contenido en ácido erúcido del aceite es inferior al 0.1 % en peso respecto al total de ácidos grasos del aceite.
5. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el contenido en ácido erúcido del aceite es inferior al 0.05 % en peso respecto al total de ácidos grasos del aceite.
6. Semillas de mostaza etíope que poseen un aceite con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones 1-5.
7. Plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) que al ser autofecundadas producen semillas que poseen un aceite con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones 1-5.
8. Procedimiento de obtención de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun), según la reivindicación 7, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- Tratamiento de semillas normales de mostaza etíope, previamente embebidas en agua durante 16 horas, con una solución del agente mutagénico metil-sulfonato de etilo (EMS), preparada a una concentración comprendida entre el 0.1 % y el 2 % (vol/vol), durante un período de tiempo comprendido entre 0.5 y 6 horas.
 - Cultivo de las semillas tratadas según el apartado a), selección de aquellas que presentan un incremento en el contenido en ácido oleico del aceite en comparación con las semillas de plantas normales, manteniendo un contenido en ácido erúcido similar al de aquellas.
 - Cruzamiento de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) con contenido normal en ácido erúcido del aceite con plantas de una línea colza (*B. napus* L.) con menos del 2 % en peso de ácido erúcido en el aceite de sus semillas, seguido de retrocruzamiento, autofecundación, y selección de plantas de mostaza etíope con menos del 2 % en peso de ácido erúcido en el aceite de sus semillas.
 - Cruzamiento de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) con contenido normal en ácido erúcido del aceite con plantas de una línea de mostaza india (*B. juncea* [L.] Czern.) con menos del 2 % en peso de ácido erúcido en el aceite de sus semillas, seguido de retrocruzamiento, autofecundación, y selección de plantas de mostaza etíope con menos del 2 % en peso de ácido erúcido en el aceite de sus semillas.
 - Cruzamiento de plantas de mostaza etíope obtenidas según el apartado c) con plantas de mostaza etíope obtenidas según el apartado d), seguido de autofecundación y selección de plantas de mostaza etíope procedentes del mencionado cruzamiento con menos del 2 % en peso de ácido erúcido en el aceite de sus semillas.
 - Recombinación genética entre plantas de mostaza etíope obtenidas en el programa de mutagénesis química [etapas a) y b)] y plantas de mostaza etíope obtenidas en el programa de cruzamientos interespecíficos [etapas c), d) y e)], seguida de autofecundación y selección de semillas con bajo contenido en ácido erúcido y alto contenido en ácido oleico.

ES 2 166 676 B1

- g) Siembra de las semillas seleccionadas en la etapa f), seguida de autofecundación y selección para obtener una línea estable de mostaza etíope con bajo contenido en ácido erúxico y alto contenido en ácido oleico.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C07C 57/12, A01H 5/10, A23D 9/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| Y | US 5625130 A (GRANT IAN & CHARNE G. DAVID) 29.04.1997, todo el documento. | 1-8 |
| Y | VELASCO, L. et al. "Isolation of induced mutants in Ethiopian mustard (Brassica carinata Braun) with low levels of erucic acid", Plant Breeding, 114, 5, páginas 454-456. | 1-8 |
| A | VELASCO, L. et al. "Induced variability for C18 unsaturated fatty acids in Ethiopian mustard", Canadian Journal of Plant Science, 77, 1, páginas 91-95. | 1-8 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

15.03.2002

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1