



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 232 276**

② Número de solicitud: 200300860

⑤ Int. Cl.:  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**A01H 5/10** (2006.01)  
**A01H 1/06** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **10.04.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2005**

Fecha de la concesión: **28.08.2006**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2006**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2006**

⑦ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Velasco Varo, Leonardo y  
Fernández-Martínez, José M.**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Aceite de semilla de girasol con alto contenido en  $\beta$ -tocoferol.**

⑤ Resumen:

Aceite de semilla de girasol con alto contenido en beta-tocoferol.

La presente invención se refiere a un aceite de semillas de girasol modificadas genéticamente a través de dos ciclos de inducción artificial de mutaciones seguidos en cada caso por procesos de identificación de individuos mutantes que poseen el carácter deseado. Dicho aceite se caracterizan por poseer entre el 51% y el 85% de los tocoferoles en forma de beta-tocoferol. Esta elevada producción de beta-tocoferol está determinada por el genotipo de las semillas, que ha sido modificado con este objetivo, y se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo, tratándose por tanto de un carácter heredable. No existen en la actualidad semillas de girasol que produzcan niveles de beta-tocoferol tan elevados.

ES 2 232 276 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Aceite de semilla de girasol con alto contenido en beta-tocoferol.

5 **Sector de la técnica**

La invención se enmarca en el sector de la agricultura, tratándose de semillas con elevado contenido en beta-tocoferol. El aceite extraído de las semillas posee una gran estabilidad oxidativa y es óptimo para usos alimentarios e industriales (biocombustibles y lubricantes). Este aceite y sus subproductos pueden emplearse para extracción de beta-tocoferol, con numerosas aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

**Estado de la técnica**

Los tocoferoles son los principales compuestos naturales con propiedades antioxidantes presentes en los aceites de semillas. Al ser liposolubles, pasan al aceite durante el proceso de extracción y ejercen una importante actividad antioxidante, tanto en el aceite envasado como en los alimentos que contienen aceite vegetal (F.B. Padley y col., 1994; Occurrence and characteristics of oils and fats. En *The Lipid Handbook*, ed. F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley, London: Chapman & Hall, pp 47-223). De los cuatro tipos de tocoferoles que existen (alfa-, beta-, gamma-, y delta-tocoferol), la máxima actividad antioxidante *in vitro*, es decir, fuera del organismo humano, corresponde a beta-, gamma-, y delta-tocoferol, mientras que alfa-tocoferol presenta una actividad *in vitro* notablemente inferior a los otros tres tocoferoles (G. Pongracz y col., Tocopherole, Antioxidanten der Natur. *Fat Science and Technology* 97: 90-104, 1995).

Las semillas de girasol estándar presentan una fracción de tocoferoles dominada por alfa-tocoferol, que representa aproximadamente el 95% del total de tocoferoles, estando el resto constituido por beta-tocoferol y gamma-tocoferol, que se encuentran presentes en proporciones inferiores al 5% del total de tocoferoles (F.B. Padley y col., 1994, obra citada). Debido a la predominancia de alfa-tocoferol en las semillas de girasol, su aceite presenta una menor protección frente a la oxidación que otros aceites vegetales extraídos a partir de semillas que contienen mayores proporciones de beta-, gamma-, y/o delta-tocoferol, que ejercen una mayor actividad antioxidante *in vitro*. La Tabla 1 presenta la composición en tocoferoles de los principales aceites de semillas.

TABLA 1

*Composición media en tocoferoles en los principales aceites de semillas*

Aceite	% Tocoferol			
	Alfa	Beta	Gamma	Delta
Algodón	43	2	55	0
Cacahuete	44	2	52	2
Colza	26	9	64	1
Cártamo	90	8	2	0
Girasol	95	4	1	0
Lino	1	0	99	0
Maíz	20	3	73	4
Ricino	6	6	23	65
Soja	6	1	66	27

La predominancia de alfa-tocoferol en las semillas de girasol es prácticamente universal, habiéndose descrito únicamente cuatro líneas de girasol que presentan niveles modificados de tocoferoles, y que se pueden agrupar en dos clases:

a) *Alto contenido en gamma-tocoferol*

Se trata de dos líneas que poseen más del 85% de los tocoferoles en forma de gamma-tocoferol, siendo el resto alfa-tocoferol. Una de ellas, denominada LG-17, fue desarrollada en Rusia (Y. Demurin, Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds, *Helia* 16:59-62, 1993), mientras que la segunda fue desarrollada en España y se denominó T2100 (L. Velasco y col., Registration of T589 and T2100 sunflower germplasms with modified tocopherol profiles, *Crop Science*, en prensa).

b) *Contenido medio en beta-tocoferol*

Se trata de dos líneas que poseen entre el 30% y el 50% de los tocoferoles de la semilla en forma de beta-tocoferol, siendo el resto alfa-T. Una de ellas, denominada LG-15, fue desarrollada en Rusia (Y. Demurin, 1993, obra citada), mientras que la segunda, denominada T589, fue desarrollada en España (L. Velasco y col., en prensa, obra citada).

Mediante cruzamiento entre las líneas LG-15 y LG-17, investigadores rusos y yugoslavos obtuvieron recombinantes con niveles ligeramente elevados de delta- tocoferol, siendo el máximo nivel obtenido de este tocoferol del 25% de todos los tocoferoles presentes en la semilla (Y. Demurin y col. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. Plant Breeding 115:33-36, 1996). En resumen, los niveles máximos de tocoferoles individuales que existen hoy día en semillas de girasol son:

- 95% alfa-tocoferol (composición natural)
- 50% beta-tocoferol
- 95% gamma-tocoferol
- 25% delta-tocoferol

**Explicación de la invención**

Uno de los objetos de la presente invención es el aceite de semillas de girasol con alto contenido en beta-tocoferol, que presentan entre el 51% y el 85% del total de tocoferoles en forma de beta-tocoferol, y los siguientes contenidos de otros tocoferoles: entre el 20% y el 49% del total de tocoferoles en forma de alfa-tocoferol; entre el 0% y el 2% del total de tocoferoles en forma de gamma- tocoferol; entre el 0% y el 25% del total de tocoferoles en forma de delta-tocoferol. Algunos de estos aceites presentan un contenido en beta-tocoferol siempre superior al 60%, 70% y 80% del total de tocoferoles en las semillas. El carácter de alto contenido en beta-tocoferol de las semillas de girasol, a partir de las cuales se obtiene el aceite, es heredable (al ser autofecundadas) y se expresan de forma estable, independientemente de las condiciones ambientales.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un germoplasma de girasol (*Helianthus annuus* L.) caracterizado por poseer un elevado contenido de beta-tocoferol en las semillas. Este tocoferol representa entre el 51% y el 85% del total de tocoferoles en las semillas. Estos elevados niveles de beta-tocoferol no son producidos en la naturaleza por plantas de girasol y han sido obtenidos mediante un proceso complejo consistente en dos ciclos de inducción artificial de mutaciones seguidos de identificación de plantas mutantes y fijación del carácter mutado. El elevado contenido en beta-tocoferol objeto de la presente invención es heredable y se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo.

Para la obtención de las plantas modificadas genéticamente cuyas semillas poseen una elevada concentración de beta-tocoferol, se ha llevado a cabo un largo proceso de mejora genética dirigido a alterar genéticamente la ruta biosintética de tocoferoles. Este proceso ha consistido en cuatro etapas: (1) Inducción de mutaciones artificiales en semillas de una variedad estándar de girasol; (2) Identificación de individuos con alteraciones en la ruta biosintética de tocoferoles producto de las mutaciones inducidas y fijación de los caracteres mutados; (3) Nuevo proceso de inducción de mutaciones artificiales sobre individuos que ya presentaban un primer nivel de alteración en la ruta de biosíntesis de tocoferoles; (4) Identificación de individuos con alteraciones en la ruta biosintética de tocoferoles diferentes a las alteraciones que presentaban los individuos de partida, seguida de fijación del nuevo carácter mutante.

El primer proceso de mutagénesis o inducción artificial de mutaciones consistió en el tratamiento de semillas de una variedad estándar de girasol con un producto con propiedades mutagénicas, esto es, capaz de inducir mutaciones en el ADN de la planta. Debido a la baja frecuencia de mutaciones esperables en los genes responsables de la ruta biosintética de los tocoferoles tras el tratamiento mutagénico, éste fue seguido de un proceso de análisis no destructivo de la composición en tocoferoles en varios miles de semillas individuales.

Para que las mutaciones detectadas resulten de utilidad comercial, deben ser heredables y deben expresarse con independencia de las condiciones ambientales en las que se cultivan las plantas. Por este motivo, se realizó un proceso de selección conducente a fijar los caracteres mutantes y a verificar su estabilidad bajo diferentes condiciones ambientales. Tras este proceso, varias de las mutaciones inicialmente detectadas fueron descartadas, mientras que un mutante con elevado contenido en gamma-tocoferol (95% del total de los tocoferoles presentes en las semillas) fue fijado. Este mutante, denominado IAST-1, demostró responder a una base genética diferente a la que poseen otras líneas con elevado contenido en gamma-tocoferol. Así, mientras que los cruzamientos de las líneas LG-17 y T2100 con líneas de composición estándar en tocoferoles producen progenies F<sub>2</sub> que no segregan para niveles intermedios de gamma-tocoferol (Demurin y col., obra citada; L. Velasco y J.M. Fernández-Martínez, Identification and genetic characterization of new sources of beta- and gamma-tocopherol in sunflower germplasm, Helia, en prensa), las progenies F<sub>2</sub> procedentes de cruces entre el mutante IAST-1 y líneas de composición estándar en tocoferoles segregaron ampliamente para niveles intermedios de gamma-tocoferol.

Tras el aislamiento genético del mutante IAST-1, se realizó un segundo proceso de mutagénesis sobre semillas de este mutante, con el objetivo de generar variación adicional para niveles elevados de otros tocoferoles. Este segundo ciclo de mutagénesis estuvo asimismo seguido de un proceso analítico a gran escala para identificación de mutantes, así como de un proceso de fijación de mutantes y confirmación de su expresión con independencia de las condiciones de cultivo. En este segundo ciclo de mutagénesis se identificó y fijó el mutante objeto de la presente invención, que se caracteriza porque sus semillas forman beta-tocoferol como tocoferol mayoritario, estando presente en una concentración comprendida entre el 51% y el 85% del total de tocoferoles en las semillas. Esta elevada proporción de beta-tocoferol en las semillas es un carácter heredable y se expresa de forma estable independientemente de las condiciones de cultivo de las plantas. El aceite extraído de estas semillas presenta el mismo perfil de tocoferoles (51-85% de beta-tocoferol del total de tocoferoles)

### Modo de realización de la invención

#### *Primer ciclo de mutagénesis*

Semillas de girasol de la variedad población Peredovik, con una composición en tocoferoles en las semillas consistente en 96% alfa-tocoferol, 3% beta-tocoferol, y 1% gamma-tocoferol, se embebieron durante 4 horas en agua destilada, a una temperatura de 20°C. Pasado este tiempo, las semillas se transfirieron a una solución del agente mutagénico metilsulfonato de etilo (EMS) con una concentración 70 mM en tampón fosfato 0.1M a pH 7.0 durante 2 horas, manteniendo una agitación constante de 60 rpm. Tras el tratamiento mutagénico, las semillas (generación M<sub>1</sub>) se lavaron durante 16 horas con agua corriente y posteriormente se sembraron en el campo.

Las plantas M<sub>1</sub> se cosecharon individualmente y sus semillas (generación M<sub>2</sub>) se analizaron individualizadamente para composición en tocoferoles mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo el protocolo desarrollado por F. Goffman y col. (Quantitative determination of tocopherols in single seeds of rapeseed [*Brassica napus* L.]. *Fett/Lipid* 101:142-145, 1999). De un total de 1080 plantas M<sub>1</sub> analizadas, una de ellas presentó segregación para niveles elevados de gamma-tocoferol, con un máximo contenido de 95% de los tocoferoles totales en forma de gamma-tocoferol. Semillas con estos niveles de gamma-tocoferol produjeron plantas que expresaron el carácter uniformemente. Al cruzar plantas procedentes de semillas con 95% de gamma-tocoferol con plantas de variedades estándar de girasol, se observó un amplia segregación para contenido en gamma-tocoferol en semillas F<sub>2</sub>, que incluyó niveles de gamma-tocoferol intermedios entre ambos parentales. Esta segregación tan amplia fue completamente inesperada, debido a que materiales con niveles similares de gamma-tocoferol desarrollados previamente (Demurin y col., obra citada; L. Velasco y J.M. Fernández-Martínez, obra citada) no habían producido segregación para niveles intermedios de gamma-tocoferol tras ser cruzadas con variedades estándar de girasol. El mutante así obtenido se denominó IAST-1.

#### *Segundo ciclo de mutagénesis*

Semillas de girasol del mutante IAST-1, con una composición en tocoferoles en las semillas consistente en 5% alfa-tocoferol y 95% gamma-tocoferol, se embebieron durante 4 horas en agua destilada, a una temperatura de 20°C. Pasado este tiempo, las semillas se transfirieron a una solución del agente mutagénico azida sódica con una concentración 4 mM en tampón 0.1 M citrato sódico a pH 3.0 durante 2 horas, manteniendo una agitación constante de 60 rpm. Tras el tratamiento mutagénico, las semillas (generación M<sub>1</sub>) se lavaron durante 16 horas con agua corriente y posteriormente se sembraron en el campo.

Las plantas M<sub>1</sub> se cosecharon individualmente y sus semillas (generación M<sub>2</sub>) se analizaron individualizadamente para composición en tocoferoles mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo el protocolo desarrollado por F. Goffman y col. (obra citada). De un total de 1240 plantas M<sub>1</sub> analizadas, una de ellas presentó segregación para niveles elevados de beta-tocoferol, con un máximo contenido de 65% de los tocoferoles totales en forma de beta-tocoferol. Semillas con estos niveles de beta-tocoferol produjeron plantas que expresaron el carácter uniformemente, con concentraciones de beta-tocoferol comprendidas entre 51% y 85% del total de tocoferoles presentes en las semillas. Estos niveles se mantuvieron en sucesivas generaciones. La nueva línea mutante de girasol cuyas semillas producen niveles de beta-tocoferol comprendidos entre el 51% y el 85% del total de tocoferoles se denominó IAST-2.

# ES 2 232 276 B1

## REIVINDICACIONES

5 1. Aceite de semillas de girasol con alto contenido en beta-tocoferol, **caracterizado** porque posee entre el 51% y el 85% del total de tocoferoles en forma de beta-tocoferol.

10 2. Aceite de semillas de girasol con alto contenido en beta-tocoferol según la reivindicación 1, **caracterizado** porque presenta los siguientes contenidos de otros tocoferoles: entre el 20% y el 49% del total de tocoferoles en forma de alfa-tocoferol; entre el 0% y el 2% del total de tocoferoles en forma de gamma-tocoferol; entre el 0% y el 25% del total de tocoferoles en forma de delta-tocoferol.

15 3. Aceite de semillas de girasol con alto contenido en beta-tocoferol según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el contenido en beta-tocoferol es siempre superior al 60% del total de tocoferoles en el aceite.

20 4. Aceite de semillas de girasol con alto contenido en beta-tocoferol según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el contenido en beta-tocoferol es siempre superior al 70% del total de tocoferoles en el aceite.

25 5. Aceite de semillas de girasol con alto contenido en beta-tocoferol según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el contenido en beta-tocoferol es siempre superior al 80% del total de tocoferoles en el aceite.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 232 276

② Nº de solicitud: 200300860

③ Fecha de presentación de la solicitud: 10.04.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A01H 5/00, 5/10, 1/06

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0010380 A1 (UNIVERSITY OF NEVADA) 02.03.2000, todo el documento.	1-5
A	FR 2778527 A1 (RHONE POULENC AGRO SOCIÉTÉ ANONYME) 19.11.1999, todo el documento.	1-5
A	DEMURIN, Y. et al.: "Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality", Plant Breeding, 1996, Vol. 115, nº 1, páginas 33-36, ISSN: 0179-9541, todo el documento.	1-5
A	VELASCO, L. et al.: "Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids", J. Agric. Sci., 2002, Vol. 139, nº 4, páginas 425-429, ISSN: 0021-8596, todo el documento.	1-5
A	ES 2082717 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.03.1996, todo el documento.	1-5

#### 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 nº:

Fecha de realización del informe

27.04.2005

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1