



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 491**

51 Int. Cl.:

A01H 5/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08010783 .2**

96 Fecha de presentación : **13.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2002711**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2008**

54 Título: **Nuevo sistema híbrido para *Brassica napus*.**

30 Prioridad: **13.06.2007 EP 07290741**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73 Titular/es: **SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.**
Schwarzwaldallee 215
4058 Basel, CH

72 Inventor/es: **Stiewe, Günther;**
Pleines, Stephan;
Coque, Marie y
Gielen, Jan

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Nuevo sistema híbrido para brassica napus

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un sistema de esterilidad masculina condicional nuclear en *Brassica napus*. Realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para la producción de la línea femenina (estéril masculina) prebásica (MsMsrfrrf), la línea mantenedora (fértil masculina) (msmsrfrf), la línea femenina (estéril masculina) básica (Msmsrfrf), y líneas híbridas. Realizaciones adicionales de la presente invención se refieren a marcadores asociados con los alelos de esterilidad, de fertilidad y mantenedores, respectivamente, y al uso de esos marcadores para proporcionar el sistema híbrido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La cosecha que sirve para la producción de aceite a partir de plantas de Brassica es una cosecha cada vez más importante. Como fuente de aceite vegetal, actualmente figura sólo detrás de habas de soja y palma en importancia comercial, y es comparable a girasoles. El aceite se usa tanto como aceite de ensaladas como aceite para cocinar, y desempeña un papel cada vez más importante en biocombustibles (biodiésel).

En su forma original, el aceite de Brassica, conocido como aceite de colza, era nocivo para los seres humanos debido a su nivel relativamente elevado de ácido erúico. El ácido erúico está presente habitualmente en variedades de cultivo nativas en concentraciones de 30-50% en peso basado en el contenido total de ácido graso. Este problema se resolvió cuando los científicos de las plantas identificaron un germoplasma con bajo contenido de ácido erúico (Stefansson, 1983). Aunque estas variedades con menos de 2% de ácido erúico en su perfil de ácido graso total (calidad cero individual) produjeron aceite comestible, la presencia continuada de compuestos de azufre, denominados glucosinolatos (GSL), en la harina con contenido proteico elevado, siguió siendo un obstáculo importante para la expansión posterior en el mercado. La amplia aceptación de harina de colza para la nutrición animal está impedida por la presencia de los GSL en la semilla. Además, los glucosinolatos también son indeseables puesto que pueden conducir a la producción de productos de ruptura antinutricionales (por ejemplo, tiocianatos, isotiocianato y nitrito) con la escisión enzimática durante la extracción del aceite y digestión cuando son atacados por la enzima endógena mirosinasa durante la trituration. En consecuencia, se desarrollaron las denominadas variedades "doblemente bajas" (bajas en ácido erúico en el aceite, así como bajas en glucosinolatos en la harina sólida tras la extracción del aceite), que tienen un contenido de ácido erúico menor que 2% en peso basado en el contenido total de ácido graso, y un contenido de glucosinolatos menor que 30 μ moles/gramo de la harina libre de aceite. Estas formas de alta calidad de la colza, desarrolladas por primera vez en Canadá, son conocidas como cánola. Actualmente, el umbral máximo establecido por la ley europea es 25 μ moles de glucosinato (GSL) total por gramo (g) de semilla a una humedad de 8,5%, según se mide mediante HPLC (decreto de la UE 2294/92). Las variedades de cánola de primavera doblemente bajas, cultivadas en Canadá, necesitan tener niveles de GSL menores que 30 μ moles de GSL por gramo de harina libre de aceite secada al aire a una humedad de 0%, según se mide mediante TMS. Los niveles de GSL de las variedades de colza doble cero cultivadas habitualmente en Europa y Canadá varían significativamente por debajo de los niveles umbral a 60% del nivel umbral oficial o incluso inferior. Sin embargo, muchos países están solicitando niveles incluso más bajos de glucosinolatos a fin de registrar variedades de cánola.

Además, los científicos de plantas han intentado mejorar el perfil de ácidos grasos para el aceite de colza (Röbbelen, 1984; Ratledge et al., 1984; Röbbelen, 1975; Rakow y McGregor, 1973).

Especialmente, la colza de invierno (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.), Brassicaceae) es una cosecha importante para la producción de semilla para la obtención de aceite en regiones agrícolas templadas. En Alemania, en el 2006, aproximadamente 1,5 millones de hectáreas (12% del área agrícola total) se sembraron con colza.

La colza es una cosecha predominantemente autopolinizada, con alrededor de un tercio de exogamia (Becker et al., 1992). La reproducción de plantas de colza se ha centrado en semillas polinizadas de forma abierta aprovechando la elevada afinidad por la autocompatibilidad de dichas plantas. La heterosis significativa para el rendimiento de las semillas en colza ha creado interés en el desarrollo de variedades de cultivo híbridas (Riaz et al., 2001). La heterosis significa la ventaja de crecimiento y rendimiento de híbridos en comparación con sus progenitores obtenida mediante el cruzamiento de dos genotipos homocigotos genéticamente diferentes (Shull, 1922). Los híbridos de

colza muestran siempre una heterosis significativa en el rendimiento. Diversos autores han dado a conocer una considerable heterosis para el rendimiento de las semillas en híbridos F1 de colza (*Brassica napus* L.) al comienzo de la reproducción híbrida en colza (Schuster, 1969; Röbbelen, 1985; Grant y Beversdorf, 1985; Lefort-Buson et al., 1987; Brandle y McVetty, 1989; Paulmann y Frauen, 1991; Stefansson, 1983; Brandle y McVetty, 1990; Shen, 2005). Principalmente, el nivel de heterosis en colza de tipo primavera puede ser tan elevado como 20% a 30%, y en colza de tipo invierno alrededor de 30% a 40%.

Una producción eficaz de semillas híbridas requiere tanto la identificación de grupos heteróticos (patrimonios genéticos distintos; Melchinger y Gumber, 1998, Becker y Link, 2000) como un método para el cruzamiento seleccionado de esos grupos heteróticos.

En colza de invierno, las primeras variedades híbridas que se registraron en Europa son asociaciones de líneas híbridas que usan el sistema INRA Ogura e híbridos completamente restaurados usando el sistema MSL (véase más abajo para detalles). Sin embargo, en comparación con líneas consanguíneas de élite, el efecto de la heterosis es todavía moderado. Sin embargo, la ganancia de rendimiento relativamente baja no está provocada por la ineficacia del sistema híbrido, sino por la falta de acervos genéticos diversos en colza como consecuencia de décadas de consanguinidad y regulaciones gubernamentales (por ejemplo, contenido de glucosinolatos o de ácido erúico), que todavía provocan una variabilidad del germoplasma limitada.

Acervos genéticos más diversos conducirán a mayores efectos heteróticos, pero su desarrollo se inició sólo recientemente. No obstante, un sistema híbrido comercialmente funcional es el requisito previo predominante para lograr incrementos significativos de rendimiento en el futuro en la colza. Esos incrementos no sólo se necesitan por el incremento de demanda para fines alimentarios, sino por la demanda que crece rápidamente de biocombustibles (biodiésel).

Además de la esterilidad masculina inducida químicamente (CHA), se han explorado tres principios de sistemas híbridos a base de genética en variedades de Brassica: los reproductores usan plantas de Brassica autocompatibles (SI), estériles masculinas citoplásmicas (CMS), y estériles masculinas nucleares (NMS; antiguamente también esterilidad masculina genética, GMS) como el progenitor femenino (para un repaso de sistemas híbridos en vegetales, véase Kumar et al., 2004). Las plantas SI no son capaces de autopolinizarse debido a su constitución genética, y las plantas femeninas CMS así como NMS son incapaces de producir polen. De este modo, todas estas plantas se deben de polinizar de forma cruzada mediante un progenitor fértil masculino. Usando estas plantas, los reproductores están intentando mejorar la eficiencia de la producción de semillas y la calidad de los híbridos F1 y reducir los costes de la reproducción. Cuando la hibridación se realiza sin usar plantas SI, CMS o NMS, es más difícil obtener y aislar los rasgos deseados en la progenie (generación F1), debido a que los progenitores son capaces de sufrir tanto polinización cruzada como autopolinización.

Un sistema de control de la polinización simple y eficaz es la etapa clave para utilizar heterosis en la producción de semillas híbridas comerciales. Si uno de los progenitores es una planta SI, CMS o NMS que no es capaz de autopolinizarse, o es incapaz de producir polen, sólo se producirá la polinización cruzada. Eliminando el polen de una variedad parental en un cruzamiento, el reproductor de plantas se asegura que se obtenga una semilla híbrida de calidad uniforme, con la condición de que los progenitores sean de calidad uniforme y el reproductor lleve a cabo un único cruzamiento.

Sistemas de autocompatibilidad: Hasta ahora no se ha desarrollado ningún sistema SI comercialmente utilizable para colza. La patente canadiense CA 2.143.781 describe un método de reproducción híbrido para plantas de cosechas en la familia Brassicaceae, en el que se produce una semilla F1 cruzando el progenitor femenino de una línea estéril masculina autoincompatible con un progenitor masculino. Sin embargo, la cuestión principal para SI es la reproducción de líneas progenitoras SI a gran escala, lo que hace a este sistema difícil para aplicaciones comerciales.

Esterilidad masculina citoplásmica (CMS): CMS es un fenómeno heredado maternalmente, cuyos determinantes genéticos están localizados en el genoma de los orgánulos citoplasmáticos, la mitocondria. Tales plantas están gravemente impedidas en su capacidad para producir granos de polen funcionales. Los genes restauradores para los sistemas CMS son genes nucleares dominantes, que suprimen efectos estériles masculinos del citoplasma. La expresión de esterilidad masculina CMS es el resultado de la incompatibilidad entre el gen nuclear recesivo (denominado alelo mantenedor; *rf*) y el genoma citoplasmático específico estéril masculino.

Los sistemas CMS usados en la producción comercial de híbrido F1 de plantas de colza

son el sistema Polima (pol; Fu, 1981), Kosena, y el Ogura (Ogura, 1968; Makaroff, 1989; Pelland-Delourme et al., 1987; documentos US 5.254.802; US 20040237141, US 20020032918, EP 0.599.042; US 6.229.072).

El sistema de esterilidad masculina citoplásmica Polima (Pol CMS) se ha usado principalmente en la producción de colza híbrida en China. Sin embargo, debido a sus limitaciones inherentes, tales como inestabilidad de la esterilidad, el número limitado de restauradores y la influencia negativa potencial del citoplasma, el uso de híbridos con citoplasma CMS individual sobre grandes áreas no es ideal. La principal desventaja de pol CMS es la inestabilidad de la esterilidad masculina a temperatura elevada. Las líneas estériles masculinas podrían hacerse parcialmente fértiles en situaciones de temperatura relativamente baja o alta (Yang y Fu, 1987).

El sistema Ogura (ogu; Ogura, 1968; Pelletier et al., 1983; Heyn, 1976) y el Kosena se basan ambos en un gen CMS derivado de rábano. Se ha transferido un restaurador de la fertilidad para plantas estériles masculinas citoplásmicas Ogura desde *Raphanus sativus* (rábano) hasta *Brassica* (Pelletier et al., 1987), debido a que la colza carece de un alelo Rf que corresponde a dicho gen CMS. El sistema Ogura se describe en los documentos EP 0.599.042, EP 0.671.121, y WO 2005/074671. El alelo restaurador que se origina a partir de rábano está descrito fenotípicamente (documento WO 92/05251; Delourme et al., 1991). El material restaurador Ogura inicial mostró una fertilidad femenina reducida y un contenido elevado de glucosinolatos estrechamente relacionado con su gen restaurador de la fertilidad, lo que se solucionó a través de un retrocruzamiento prolongado (Delourme et al., 1991, Renard et al., 1997). El documento EP 1.493.328 describe un método para producir líneas restauradoras doblemente bajas de *Brassica napus* para esterilidad masculina citoplásmica Ogura. Aunque el contenido de glucosinolatos se reduce en esas líneas tras un retrocruzamiento laborioso, parece que hay algunos problemas inherentes asociados con los alelos Rf tales como disminución del rendimiento a mayores temperaturas, un conjunto reducido de semillas, y un número reducido de óvulos por silicua (Pelland-Delourme y Renard, 1988; Delourme et al., 1994), menores rendimientos de semillas, peores resistencias a enfermedades y susceptibilidad al encamado. Algunas de esas propiedades tienen una relación estrecha con el alelo restaurador (Delourme et al., 1994, 1995), y los datos sugieren que algunas de esas propiedades pueden ser endógenas al alelo restaurador y pueden no ser capaces de superarse mediante enfoques de reproducción o incluso transgénicos con el alelo restaurador aislado.

Una desventaja inherente del sistema CMS es la propagación de una línea CMS femenina homocigota. Puesto que la línea A CMS femenina, estéril masculina, no se puede autopolinizar, se debe mantener cruzando dicha línea A con una línea B mantenedora que es fértil masculina y genéticamente idéntica a la línea A. El resultado de este cruzamiento es una línea A CMS estéril masculina.

Esterilidad masculina nuclear (NMS): La esterilidad masculina nuclear (primitivamente denominada como esterilidad masculina génica, gms) está controlada por el gen o genes del compartimiento nuclear. La mayoría de los mutantes estériles masculinos de origen natural o inducidos son de naturaleza recesiva, con unas pocas excepciones en vegetales de col (por ejemplo, repollo y brócoli) y líneas estériles masculinas genéticamente transformadas (Kaul, 1988, Williams et al., 1997). Aunque se produce polen funcional, el polen de ciertos mutantes no se autofertiliza, debido a la falta de dehiscencia de polen o a la morfología especial de las flores de las plantas, por ejemplo esterilidad posicional en el tomate (Atanassova, 1999) y esterilidad masculina funcional en berenjena (Phatak y Jaworski, 1989). La aparición de esterilidad masculina predominantemente recesiva indica que la gms es el resultado de la mutación de cualquier gen o genes que controlan la microesporogénesis (proceso de desarrollo del polen), desarrollo del estambre o microgametogénesis (proceso de desarrollo de gametos masculinos).

Los sistemas NMS tienen la ventaja de una esterilidad completa y estable sin casi ningún efecto citoplasmático negativo. Se han descrito varios tipos de mutantes de NMS en *Brassica napus*, y se ha dado a conocer que la esterilidad de estos mutantes está controlada por un gen (Takagi, 1970; Mathias, 1985; Hu, 2000), dos genes (Li et al., 1985, 1988, 1993, 1995; Hou et al., 1990; Tu et al., 1997a), tres genes (Chen et al., 1998; Wang et al., 2001), y un gen con múltiples alelos (Song, 2005). Sin embargo, los sistemas son prácticamente difíciles de manipular y a menudo demuestran una elevada sensibilidad a efectos medioambientales tales como, por ejemplo, el calor. De este modo, en comparación con el sistema CMS, la aplicación del método NMS dominante en la producción de colza está muy por detrás, principalmente debido a la herencia de fertilidad complicada y a las dificultades en distinguir los diferentes genotipos en una población segregante. El procedimiento de reproducción para una línea de dos tipos homocigota es muy complicado, y la identificación de los diferentes genotipos (*Ms Rf*) con rasgos esperados en generaciones de retrocruzamiento o autogeneradas es

laboriosa y consume tiempo con la metodología de reproducción tradicional.

En China, se han usado tres sistemas NMS en la reproducción híbrida, y se han registrado unos pocos híbridos. Aunque un NMS recesivo tiene ventajas (sólo necesita dos líneas), también tiene el fatal inconveniente de ser difícil de conducir a una población estéril masculina completa. Puesto que gms se mantiene a lo largo del retrocruzamiento, en la producción de semillas híbridas en el campo es necesario que se identifiquen 50% de segregantes fértiles masculinos (*Msms*) y que se eliminen antes de que desprendan polen. La eliminación del 50% de plantas fértiles masculinas de las líneas femeninas se puede realizar, por ejemplo, mediante selección asistida por marcadores (Tu et al., 1999). Sin embargo, estos métodos son caros, de gran trabajo y comercialmente no competitivos. Debido al proceso de mantenimiento más tedioso y a la no disponibilidad de un gen marcador adecuado entre las cosechas vegetales, la utilización de gms está restringida a sólo unos pocos vegetales. Hasta ahora no se ha desarrollado ningún sistema en colza. La identificación de citoplasma fertilizante para gen estéril masculino nuclear específico (Homer y Palmer, 1995) es un área de investigación interesante, la cual, al tener éxito, puede proporcionar la oportunidad para la utilización más eficaz de líneas, como la línea cms.

Una forma especial de los sistemas de ms nuclear es el sistema de esterilidad masculina transgénica, para el cual se realizaron desarrollos primitivos al comienzo de los años 1990 (Mariani, 1992). Estos sistemas han sido posibles debido al aislamiento, clonación y caracterización de genes específicos de anteras o de polen y secuencias promotoras (Williams et al., 1997). Sin embargo, los sistemas transgénicos tienen que sufrir un proceso de aprobación gubernamental largo y costoso, que coloca a esos sistemas en desventaja competitiva significativa en comparación con otros sistemas.

Sistemas de esterilidad masculina sensible al entorno (enms): Ciertas líneas de nms en plantas son mutantes condicionales, lo que quiere decir con ello que, en un entorno particular, las plantas mutantes estériles masculinas se convierten en fértiles masculinas. Tras la determinación del entorno crítico (habitualmente temperatura o fotoperíodo) para la expresión de esterilidad y fertilidad, tales mutantes GMS se clasifican como líneas estériles masculinas nucleares sensibles al entorno (enms). En cosechas vegetales, se han dado a conocer líneas enms mayoritariamente sensibles a la temperatura (Tabla 1). Desde un punto de vista de aplicación práctica, es necesario identificar la temperatura o fotoperíodo crítico para la expresión de fertilidad/esterilidad en sistemas de esterilidad masculina genética sensibles a temperatura y a fotoperíodo, respectivamente.

Tabla 1: Mutantes de esterilidad masculina sensible al entorno en vegetales

Vegetal	Mutante	Referencia
Berza	TGMS, PGMS	Rundfeldt, 1961
Col de Bruselas	TGMS	Nieuwhof, 1968
Brócoli	TGMS	Dickson, 1970
Pimiento	TGMS, TCMS	Daskalov, 1972; Shiffriss, 1997*
Zanahoria	TGMS	Kaul, 1988
Tomate	TGMS	Rick, 1948; Sawhney, 1983
TGMS-Esterilidad masculina génica termosensible		
PGMS-Esterilidad masculina génica sensible a fotoperíodo		
*TCMS- Esterilidad masculina citoplásmica termosensible		
Tabla de Kumar et al., 2004		

La producción de semillas híbridas usando líneas enms es más atractiva debido a la facilidad en la multiplicación de semillas de la línea estéril masculina. Las semillas de las líneas enms se pueden multiplicar en un entorno en el que expresan el rasgo de fertilidad masculina, mientras que las semillas híbridas se pueden producir en otro entorno en el que expresan esterilidad masculina.

Sistema MSL de NPZ (“Norddeutsche Pflanzenzucht Lembke”): El sistema MSL (Lembke de esterilidad masculina) es un sistema proporcionado por NPZ/Lembke, que actualmente se comercializa en Europa (Pinochet et al., 2000). En el año 2006, los híbridos producidos con este sistema cubrieron un área de alrededor de 1,15 millones de hectáreas en Europa (de las cuales 850.000 hectáreas en Alemania (Frauen et al., 2007)). Se afirma que el sistema MSL se basa en una mutación y selección espontánea en la estación de reproducción NPZ en 1984 (Frauen, 1999; Paulmann y Frauen, 1999). En Alemania, las primeras variedades híbridas MSL restauradas fueron aprobadas en 1996 (Frauen y Baer, 1996) y demostraron un rendimiento incrementado de aproximadamente 12% en comparación con las variedades no híbridas convencionales de élite. El sistema se describe como un sistema CMS alternativo (Frauen, 1999; “Hybridrapsflebel”, material de promoción Rapool), que usa una línea mantenedora fértil para la propagación de una línea madre estéril para derivar híbridos completamente restaurados. Todas las variedades de cultivo en línea de colza convencionales conocidas son líneas restauradoras para este sistema de esterilidad masculina. Este hecho y la afirmación de que el sistema se origina a partir de una mutación espontánea sugiere que es diferente de otros sistemas de esterilidad conocidos. Ninguna de las líneas parentales del sistema MSL ni el método de la preparación de la semilla híbrida son conocidos por el público, sino que se mantienen en secreto de marca. Esto limita el uso del sistema MSL y sus aplicaciones a un espectro más amplio de variedades de colza.

MS Takagi: Takagi (1970) indujo en la variedad japonesa “Murasaki natane” esterilidad masculina mediante mutagénesis por irradiación con rayos gamma. Este sistema fue descrito por Takagi como recesivo monogén. Theis (1990) describe en su tesis doctoral (p. 14-18) que MS Takagi está controlada por dos genes, uno de los cuales es un gen de esterilidad masculina recesivo homocigoto, y uno de los cuales es un “gen modificador” dominante. Theis describe que MS Takagi es estéril en condiciones de campo normales, pero puede volver a ser fértil bajo un tratamiento de temperatura de una semana (temperatura diurna de 38°C/temperatura nocturna de 18°C) después de 7 a 10 días (p. 49). Theis propone además la producción de una línea parental 100% fértil mediante polinización de plantas estériles con polen de plantas estériles tratadas con temperatura (p. 55). Sin embargo, no se conoce en el público el uso comercial de este sistema, y no se ha desarrollado ningún sistema híbrido comercialmente viable del mismo. Ni Takagi ni Theis describen líneas homocigotas para el gen de esterilidad o el “gen modificador”. Cuando explica sistemas de esterilidad masculina nuclear, Denis et al. (1993) describe, con referencia al sistema de Takagi, que una razón para las dificultades relacionadas con este sistema es la ausencia de genes marcadores que no permite la clasificación de plantas estériles masculinas o fértiles masculinas en la progenie, lo que se requiere para proporcionar líneas homocigotas (para una explicación detallada, véase también más abajo).

Como se ha mencionado anteriormente, actualmente sólo se emplean comercialmente dos sistemas híbridos: (1) el sistema NPZ MSL, para el cual no se conoce la genética, y (2) el sistema de Ogura, el cual, debido a ciertas desventajas agronómicas relacionadas con el alelo restaurador, tampoco es óptimo. El sistema de cánola híbrido InVigor™ disponible adicionalmente (Bayer CropScience) es un sistema transgénico y por lo tanto está ligado a costes de regulación elevados y problemas públicos. Sin embargo, estos pocos sistemas están limitados en número. De este modo, sistemas adicionales serían beneficiosos no sólo desde una perspectiva económica, sino también por razones agrícolas: un gran uso de un sistema híbrido individual en una cosecha como colza haría vulnerable a la población frente a enfermedades que se pueden propagar más fácilmente en poblaciones genéticas uniformes. La utilización de varios sistemas híbridos en paralelo permitiría una mayor variación genética y reduciría esta vulnerabilidad.

Por lo tanto, el problema a resolver por la presente invención es proporcionar un nuevo sistema híbrido de esterilidad masculina nuclear alternativo comercialmente viable en colza, que produzca harina y aceite de colza comercialmente viables y sea un método conveniente y económicamente eficaz para producir semillas híbridas (preferiblemente con un contenido de glucosinolato no mayor que 25 µmoles por gramo de semilla seca al aire a una humedad de 9%), que no tenga además las desventajas de los sistemas usados actualmente.

El problema se resuelve mediante la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1: Herencia del sistema híbrido restaurado (RHS) y desarrollo de la variedad. Esquema de reproducción para la fijación de la línea Ms y la línea mantenedora, y el esquema de cruzamiento subsiguiente para el sistema híbrido. La parte superior del esquema describe la fijación del genotipo MsMsrrfrf (línea femenina prebásica) y el genotipo msmsrrfrf (línea mantenedora). La parte inferior describe el esquema de

- 5 cruzamientos para proporcionar semilla híbrida proporcionando el primer lugar una línea femenina básica (Msmsrfrf) cruzando la línea femenina prebásica (MsMsrfrf) y la línea mantenedora (msmsrfrf), y proporcionando después la semilla híbrida cruzando la línea femenina básica (Msmsrfrf) con una línea restauradora (msmsRfRf).
- Fig. 2:** Fotos que demuestran el fenotipo de rayas blancas/manchado de blanco de las plantas condicionalmente estériles masculinas (tras la refertilización inducida por temperatura) en comparación con flores de las plantas fértiles masculinas.
- 10 A: Fenotipo de rayas blancas/manchado de blanco de una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina tras la refertilización inducida por temperatura elevada.
- B: Comparación de flores de rayas blancas/manchadas de blanco (planta de *Brassica napus* estéril masculina; flor izquierda) con flores normales de la planta de *Brassica napus* fértil masculina (flor derecha).
- 15 C: Igual que A, con áreas blancas marcadas por secciones sombreadas a trazos superpuestas.
- D: Igual que B, con áreas blancas marcadas por secciones sombreadas a trazos superpuestas.
- E: Flor de planta de *Brassica napus* fértil masculina.
- Fig. 3:** Fotos que demuestran el fenotipo de aborto de la yema de las plantas de *Brassica napus* condicionalmente estériles masculinas.
- A: Brotes estériles de plantas estériles masculinas con aborto de la yema.
- B-D: Brotes de plantas estériles masculinas tras el tratamiento térmico que tienen flores estériles y fértiles en el mismo brote.
- 25 E: Brotes de plantas estériles masculinas con vainas tras la fertilización mediante tratamiento térmico y autofecundación.
- Fig. 4:** A: Perfil de un marcador candidato de BSA que presenta un polimorfismo ligado a la esterilidad y después a la segregación del alelo Ms (alt: 1). El tamaño del fragmento presentado en los agrupamientos fértiles masculinos es el mismo que el observado para el progenitor fértil masculino. Mientras tanto, los agrupamientos estériles masculinos presentaron dos fragmentos: el observado para el progenitor estéril masculino, y el observado para el progenitor fértil masculino. Esta observación es consistente con lo esperado, debido a que las plantas estériles masculinas pueden ser tanto homocigotas como heterocigotas para el alelo Ms.
- 30 B: Perfil en agarosa de los productos de amplificación obtenidos en las líneas fértil masculina (F) y estéril masculina (S) por la combinación de los cebadores HiNK6702 y 6707 (SEC ID NO: 13 y 14, respectivamente).
- Fig. 5:** Gráfica de SNP típica obtenida para el marcador SR0002A con plantas estériles homocigotas (MsMs), estériles heterocigotas (Msms), o fértiles homocigotas (msms) que segregan en tres nubes diferentes según el tipo de transmisión de fluorescencia y su intensidad.
- 40 **Fig. 6:** Secuencia marcadora NR1116. Están subrayados los cebadores directo e inverso para la amplificación de SSR. La propia SSR está en letra negrita. En el extremo 5' de la secuencia no se pudieron identificar claramente algunos nucleótidos, y están marcados con "N", que puede representar A, T, C o G.
- 45 **Fig. 7:** Secuencia marcadora NR2525. Están subrayados los cebadores directo e inverso para la amplificación de SSR. La propia SSR está en letra negrita.
- Fig. 8:** Secuencia marcadora NR2219. Están subrayados los cebadores directo e inverso para la amplificación de SSR. La propia SSR está en letra negrita.

Fig. 9: A: Secuencia 1 de Consenso de SNP (SEC ID NO: 3).

B: Secuencia 2 de Consenso de SNP (SEC ID NO: 6).

Se muestran las secuencias de consenso para los alelos fértil y estéril. Las áreas mutadas están entre paréntesis, y presentan los nucleótidos para el haplotipo tanto fértil como estéril (véanse los ejemplos para más detalle). Las letras en negrita en el extremo 5' de la Secuencia 1 de Consenso marcan el extremo 3' de la repetición SSR.

Fig. 10: Principio básico del ensayo de TaqMan (de: Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol; Part Number 4312214 Rev. C 5/2005; Applied Bio-systems)

Fig. 11: Posición cartográfica de los homólogos de Arabidopsis de 23 genes candidatos de Brassica a través de los cinco cromosomas de *Arabidopsis thaliana*. La distancia física expresada en pares de bases se especifica en el lado izquierdo de la barra; la ID de referencia de los genes de *Arabidopsis thaliana* se especifica en el lado derecho de la barra.

Fig. 12: Resultado de GeneMapper para el marcador SSCP derivado de PUT-161 a-Brassica_napus-59218 que muestra un ejemplo de un individuo de una planta estéril homocigota (rfrf), fértil homocigota (RfRf) y fértil heterocigota (Rfrrf).

DEFINICIONES

Se entenderá que esta invención no está limitada a la metodología particular, protocolos, estirpes celulares, especies o géneros vegetales, constructos, y reactivos descritos aquí como tales. También se entenderá que la terminología usada aquí es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado sólo por las reivindicaciones anejas. Se debe observar que, como se usa aquí y en las reivindicaciones anejas, las formas singulares “un”, “y”, y “el/la” incluyen la referencia en plural excepto que el contexto dicte claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a “una planta” es una referencia a una o más plantas, e incluye equivalentes de la misma conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Como se usa aquí, la palabra “o” significa un miembro cualquiera de una lista particular, y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista (es decir, incluye también “y”).

La expresión “alrededor de”, como se usa aquí, significa aproximadamente, apenas, cercano a, o en la región de. Cuando la expresión “alrededor de” se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, la expresión “alrededor de” se usa aquí para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor señalado por una varianza de 20 por ciento, preferiblemente 10 por ciento arriba o abajo (mayor o menor). Con respecto a una temperatura, la expresión “alrededor de” significa $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, preferiblemente $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Cuando la expresión alrededor de se usa en el contexto de esta invención (por ejemplo, en combinaciones con valores de temperatura o de peso molecular), se prefiere el valor exacto (es decir, sin “alrededor de”).

El término “alelo(s)” significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen, alelos todos los cuales se relacionan con al menos un rasgo o característica. En una célula diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan loci correspondientes en un par de cromosomas homólogos. En algunos casos (por ejemplo, para QTL), es más exacto referirse a “haplotipo” (es decir, un alelo de un segmento cromosómico) en lugar de “alelo”; sin embargo, en esos casos, se debe entender que el término “alelo” comprende el término “haplotipo”. Si dos individuos poseen el mismo alelo en un locus particular, los alelos se denominan “idénticos por filiación” si los alelos se heredaron de un ancestro común (es decir, los alelos son copias del mismo alelo parental). La alternativa es que los alelos sean “idénticos por estado” (es decir, los alelos parecen ser los mismos pero derivan de dos copias diferentes del alelo). La información de identidad por linaje es útil para estudios de ligamiento; la información tanto de identidad por linaje como de identidad por estado se puede usar en estudios de asociación tales como los descritos aquí, aunque la información de identidad por linaje puede ser particularmente útil.

El término “retrocruzamiento” se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a un proceso en el que una progenie híbrida se retrocruza repetidamente con uno de los progenitores.

El término “**Brassica**” significa el género *Brassica*, muy particularmente la especie *napus* (colza), *campestris* (remolacha), *oleracea* cv Tastié (repollo) *oleracea* cv Snowball Y (coliflor) y *oleracea* cv Emperor (brócoli).

La expresión “**Brassica napus**” o “**colza**” significa plantas, semillas, partes vegetales, y células de *Brassica napus*, y comprende la colza de tipo primavera anual, tipo invierno bianual, y la colza de tipo intermedio bianual. En este contexto, anual o bianual indica si la variedad se hace crecer durante el período de invierno vegetativo. Generalmente, la colza de tipo invierno se hace crecer en el Norte de Europa Occidental, mientras que los tipos de primavera se hacen crecer principalmente en Canadá, China, India, Australia y América del Sur. La colza deriva de la hibridación interespecífica de *B. oleracea* y *B. campestris*. En consecuencia, el término también comprende cualquier resíntesis realizada a partir de estas dos especies. Una colza de tipo primavera preferida es la colza de tipo cánola. Las variedades de colza de invierno representativas que incluyen el medio genético para la expresión de un contenido bajo de glucosinolatos y que están comercialmente disponibles en Europa incluyen, por ejemplo, CAPITOL, cv. CAMPALA, cv. CALIFORNIUM (disponible de Dekalb, marca de Monsanto), cv. LORENZ, cv. OASE (disponible de RAPOOL). Las variedades de colza de primavera representativas que incluyen el medio genético para la expresión de un bajo contenido de glucosinolatos y que están comercialmente disponibles en Canadá incluyen, por ejemplo, cv. BULLET, cv. GARRISON y cv. KRISTANA (cada una disponible de Svalof Weibull). Otras variedades de colza de invierno que incluyen los medios genéticos para la expresión de un bajo contenido de glucosinolatos y que están comercialmente disponibles en Europa incluyen cv. APEX, cv. NK FAIR, cv. VIKING, cv. BILLY, cv. LADOGA, y cv. CASTILLE. Tales niveles bajos de glucosinolatos en la colza *Brassica* sirven para impartir un valor comercial aumentado a la harina.

La expresión “**secuencia de ADN específica de Brassica napus**” indica una secuencia polinucleotídica que tiene una homología de secuencia nucleotídica de más de 80%, preferiblemente más de 85%, más preferiblemente más de 90%, incluso más preferiblemente más de 95%, todavía más preferiblemente más de 97%, lo más preferible más de 99% con una secuencia del genoma de la especie *Brassica napus* (o cualquiera de las dos especies *Brassica napus* se generó (sintetizó) a partir de, a saber, *Brassica rapa* y *Brassica oleracea*) que muestra la mayor similitud con ella.

El término “**cánola**” significa una *Brassica napus* que produce aceite que contiene menos de 2% de ácido erúico, y el componente sólido de la semilla debe contener menos de 30 micromoles de uno cualquiera o cualquier mezcla de 3-butenil glucosinolato, 4-pentenil glucosinolato, 2-hidroxi-3-butenil glucosinolato, y 2-hidroxi-4-pentenil glucosinolato por gramo de sólido secado al aire, libre de aceite.

El término “**cromosoma**” se usa aquí como se reconoce en la técnica para significar la estructura genética autorreplicante en el núcleo celular que contiene el ADN celular y que posee en su secuencia nucleotídica el conjunto lineal de genes.

La expresión “**condicionalmente estéril masculina**” significa un fenotipo de esterilidad masculina (es decir, una incapacidad para producir polen fértil), que puede ser inducido y/o reprimido por ciertas condiciones. En consecuencia, una planta se puede “cambiar” de un fenotipo estéril masculino a un fenotipo fértil masculino aplicando dichas algunas condiciones. La esterilidad masculina puede estar provocada por diversos factores, y se puede expresar por ejemplo como una falta completa de órganos masculinos (anteras), polen degenerado, polen infértil, etc. Basándose en la intensidad de la condición, el “cambio” de esterilidad masculina a fertilidad masculina puede ser completo o incompleto. Lo más preferible, en el contexto de la presente invención, la expresión “condicionalmente estéril masculina” significa una esterilidad masculina dependiente de la temperatura, y de ese modo significa un fenotipo estéril masculino nuclear, en el que la esterilidad depende de la temperatura y se puede invertir a fertilidad a una temperatura de más de 35°C (preferiblemente entre 35°C y 43°C, más preferiblemente entre 37°C y 40°C, lo más preferible a alrededor de 39°C; preferiblemente con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente, como se define aquí).

Un “**gen**” se define aquí como una unidad hereditaria que consiste en una secuencia de ADN que ocupa una localización específica en un cromosoma, y que contiene la instrucción genética para una característica o rasgo particular en un organismo.

“**Manipulación genética**”, “**transformación**” y “**modificación genética**” se usan todas aquí como sinónimos para la transferencia de genes aislados y clonados en el ADN, habitualmente el ADN cromosómico o genoma, de otro organismo.

El término “**genotipo**” se refiere a la constitución genética de una célula u organismo. Un “genotipo de un individuo para un conjunto de marcadores genéticos” incluye los alelos específicos, para uno o más loci marcadores genéticos, presentes en el individuo. Como se sabe en la técnica, un genotipo se puede relacionar con un único locus o con múltiples loci, tanto si los loci están relacionados o no y/o están ligados o no. En algunas realizaciones, un genotipo del individuo se refiere a uno o más genes que están relacionados por cuanto el uno o más de los genes están implicados en la expresión de un fenotipo de interés (por ejemplo, un rasgo cuantitativo como se define aquí). De este modo, en algunas realizaciones, un genotipo comprende una suma de uno o más alelos presentes en un individuo en uno o más loci genéticos de un rasgo cuantitativo. En algunas realizaciones, un genotipo se expresa en términos de un haplotipo (definido aquí más abajo).

El término “**germoplasma**” se refiere a la totalidad de los genotipos de una población u otro tipo de individuos (por ejemplo, una especie). El término “germoplasma” también se puede referir a material vegetal; por ejemplo, un grupo de plantas que actúa como depósito para diversos alelos. La frase “germoplasma adaptado” se refiere a materiales vegetales de superioridad genética demostrada, por ejemplo, para un entorno o área geográfica dada, mientras que las frases “germoplasma no adaptado”, “germoplasma bruto”, y “germoplasma exótico” se refiere a materiales vegetales de valor genético desconocido o no probado, por ejemplo, para un entorno o área geográfica dada; como tal, la frase “germoplasma no adaptado” se refiere, en algunas realizaciones, a materiales vegetales que no son parte de una población de reproducción establecida, y que no tienen una relación conocida con un miembro de la población de reproducción establecida.

El término “**glucosinolatos**” significa compuestos a base de azufre que quedan en el componente sólido de la semilla – la harina sólida – después de que la semilla ha sido molida y se ha extraído su aceite. Su estructura incluye glucosa en combinación con hidrocarburos alifáticos (3-butenil glucosinolato, 4-pentenil glucosinolato, 2-hidroxi-3-butenil glucosinolato, y 2-hidroxi-4-pentenil glucosinolato) o hidrocarburos aromáticos (3-indoilmetil glucosinolato, 1-metoxi-3-indoilmetil glucosinolato). Los glucosinolatos alifáticos también son conocidos como alquenil glucosinolatos. Los glucosinolatos aromáticos también son conocidos como indoles. La expresión “**contenido total de glucosinolatos**” significa la suma de todos los glucosinolatos comprendidos en el material indicado, por ejemplo en la harina o en la semilla seca. El contenido total de glucosinolatos se puede indicar en μ moles (glucosinolatos) por gramo de semilla (o semilla secada al aire a, por ejemplo, 9% de humedad) o harina.

El término “**haplotipo**” se refiere al conjunto de alelos que un individuo heredó de un progenitor. De este modo, un individuo diploide tiene dos haplotipos. El término “haplotipo” se puede usar en un sentido más limitado para referirse a marcadores genéticos físicamente ligados y/o no ligados (por ejemplo, polimorfismos de secuencia) asociados con un rasgo fenotípico. La frase “bloque de haplotipos” (algunas veces también citada en la bibliografía simplemente como un haplotipo) se refiere a un grupo de dos o más marcadores genéticos que están ligados físicamente en un único cromosoma (o una porción del mismo). Típicamente, cada bloque tiene unos pocos haplotipos comunes, y se puede escoger un subconjunto de los marcadores genéticos (es decir, una “etiqueta haplotípica”) que identifica de forma única cada uno de estos haplotipos.

Los términos “**homología**”, “**similitud de secuencia**” o “**identidad de secuencia**” de secuencias nucleotídicas o de aminoácidos significan un grado de identidad o similitud de dos o más secuencias, y se pueden determinar convencionalmente usando programas de ordenador o software tales como los programas de comparación por pares BestFit o Gap (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BestFit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de identidad o similitud entre dos secuencias. La comparación de secuencias entre dos o más secuencias polinucleotídicas o de poliaminoácidos se lleva a cabo generalmente comparando porciones de las dos secuencias a lo largo de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La ventana de comparación tiene generalmente alrededor de 20 a 200 nucleótidos contiguos. Gap realiza alineamientos globales: todos de una secuencia con todos de otra secuencia similar usando el método de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970). Cuando se usa un programa de alineamiento de secuencias tales como BestFit para determinar el grado de homología, similitud o identidad de la secuencia del ADN, se puede usar el ajuste por defecto, o se puede seleccionar una matriz de puntuación apropiada para optimizar las puntuaciones de identidad, similitud u homología. De forma similar, cuando se usa un programa tal como BestFit para determinar la identidad, similitud u homología de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos diferentes, se puede usar el ajuste por defecto, o se puede seleccionar una matriz de puntuación apropiada, tal como blosum45 o blosum80, para optimizar las puntuaciones de identidad, similitud u homología.

“Recombinación homóloga” es el intercambio (“cruzamiento”) de fragmentos de ADN entre dos moléculas de ADN o cromátidas de cromosomas emparejados en una región de secuencias nucleotídicas idénticas. Un “suceso de recombinación” se entiende aquí que significa un cruzamiento meiótico.

5 El término **“heterocigoto”** significa una condición genética que existe cuando diferentes alelos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos.

El término **“homocigoto”** significa una condición genética que existe cuando alelos idénticos residen en loci correspondientes en cromosomas homólogos.

10 Los términos **“híbrido”**, **“planta híbrida”**, y **“progenie híbrida”**, en el contexto de reproducción vegetal, se refiere a una planta que es la descendencia de progenitores genéticamente diferentes producida cruzando plantas de diferentes líneas o razas o especies, incluyendo pero sin limitarse al cruzamiento entre dos líneas consanguíneas (por ejemplo, un individuo genéticamente heterocigoto o mayoritariamente heterocigoto). La frase **“híbrido F₁ de un solo cruzamiento”** se refiere a un híbrido F₁ producido a partir de un cruzamiento entre dos líneas consanguíneas.

15 El término **“híbrido”**, en el contexto de ácidos nucleicos, se refiere a una molécula de ácido nucleico bicatenaria, o dúplex, formada mediante el enlace de hidrógeno entre bases nucleotídicas complementarias. Los términos **“hibridar”** o **“emparejar”** se refieren al proceso mediante el cual hebras sencillas de secuencias de ácidos nucleicos forman segmentos bihelicoidales a través de enlace de hidrógeno entre bases complementarias.

20 La frase **“línea consanguínea”** se refiere a una población genéticamente homocigota o casi homocigota. Una línea consanguínea, por ejemplo, se puede derivar a través de varios ciclos de reproducciones de hermanos/hermanas o de autofecundación. En algunas realizaciones, líneas consanguíneas se reproducen verdaderamente para uno o más rasgos fenotípicos de interés. Un “consanguíneo”, “individuo consanguíneo” o “progenie consanguínea” es un individuo que se toma como muestra de una línea consanguínea. El término “consanguíneo” significa un individuo o línea sustancialmente homocigota.

25 Los términos **“introgresión”**, **“introgresado”** e **“introgresamiento”** se refiere a un proceso tanto natural como artificial mediante el cual regiones genómicas de una especie, variedad o variedad de cultivo se mueven al genoma de otra especie, variedad o variedad de cultivo, mediante cruzamiento de esas especies. El proceso se puede completar opcionalmente retrocruzando el progenitor recurrente.

30 El término **“ligamiento”**, y sus variantes gramaticales, se refiere a la tendencia de alelos en diferentes loci en el mismo cromosoma a segregarse juntos más a menudo que lo que sería de esperar por casualidad si su transmisión fuese independiente, en algunas realizaciones como consecuencia de su proximidad física.

35 La frase **“desequilibrio de ligamiento”** (también denominada “asociación alélica”) se refiere a un fenómeno en el que alelos particulares en dos o más loci tienden a permanecer juntos en grupos de ligamiento cuando se segregan de los progenitores en descendencia con una frecuencia mayor de la esperada a partir de sus frecuencias individuales en una población dada. Por ejemplo, un alelo marcador genético y un alelo QTL pueden mostrar desequilibrio de ligamiento cuando aparecen juntos con frecuencias mayores que las predichas a partir de las frecuencias de los alelos individuales. El desequilibrio de ligamiento se puede producir por varias razones, incluyendo, pero sin limitarse a, que los alelos estén en estrecha proximidad en un cromosoma.

40 La expresión **“grupo de ligamiento”** se refiere a todos los genes o rasgos genéticos que están localizados en el mismo cromosoma. Dentro del grupo de ligamiento, esos loci que están suficientemente próximos mostrarán ligamiento en cruzamientos genéticos. Puesto que la probabilidad del cruzamiento aumenta con la distancia física entre genes en un cromosoma, los genes cuyas localizaciones son eliminados entre sí dentro de un grupo de ligamiento pueden no mostrar ningún ligamiento detectable en ensayos genéticos directos. La expresión “grupo de ligamiento” se usa mayoritariamente para referirse a loci genéticos que muestran un comportamiento ligado en sistemas genéticos en los que todavía no se han realizado asignaciones cromosómicas. De este modo, en el presente contexto, la expresión “grupo de ligamiento” es sinónimo de (la entidad física de) cromosoma.

45 El término **“locus”** se refiere a una posición (por ejemplo, de un gen, un marcador genético, o similar) en un cromosoma de una especie dada.

Los términos “**marcador molecular**” o “**marcador genético**” se refieren a un indicador que se usa en métodos para visualizar diferencias en características de secuencias de ácidos nucleicos. Se refiere a una característica de un genoma del individuo (por ejemplo, una secuencia nucleotídica o polinucleotídica que está presente en un genoma del individuo) que está asociada con uno o más loci de interés. En algunas realizaciones, un marcador genético es polimórfico en una población de interés o en locus ocupado por el polimorfismo, dependiendo del contexto. Los marcadores genéticos incluyen, por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), indels (es decir, inserciones/supresiones), repeticiones de secuencias simples (también denominadas marcadores de microsatélites; SSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), marcadores de secuencias polimórficas amplificadas escindidas (CAPS), marcadores de tecnología de chips de diversidad (DART), y polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), entre muchos otros ejemplos. Los marcadores adicionales incluyen mutaciones de inserción, regiones amplificadas caracterizadas por secuencias (SCAR), o marcadores de isozimas o combinaciones de los marcadores descritos aquí que definen una localización genética y cromosómica específica. Los marcadores genéticos se pueden usar, por ejemplo, para localizar loci genéticos que contienen alelos que contribuyen a la variabilidad en la expresión de rasgos fenotípicos en un cromosoma. La frase “**marcador genético**” también se puede referir a una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sondas. Un marcador genético puede estar físicamente localizado en una posición en un cromosoma que está dentro o fuera del locus genético con el que está asociado (es decir, es intragénico o extragénico, respectivamente). Dicho de otra manera, mientras que los marcadores genéticos se emplean típicamente cuando la localización en un cromosoma del gen que corresponde al locus de interés no se ha identificado y hay una tasa no nula de recombinación entre el marcador genético y el locus de interés, la materia objeto descrita aquí también puede emplear marcadores genéticos que están físicamente dentro de los límites de un locus genético (por ejemplo, dentro de una secuencia genómica que corresponde a un gen tal como, pero sin limitarse a, un polimorfismo en un intrón o un exón de un gen). En algunas realizaciones de la presente invención, el uno o más marcadores genéticos comprenden entre uno y diez marcadores, y en algunas realizaciones el uno o más marcadores genéticos comprenden más de diez marcadores genéticos.

La expresión “**selección a base de marcadores**” se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere al uso de marcadores genéticos para detectar uno o más ácidos nucleicos a partir de la planta, en el que el ácido nucleico está asociado con un rasgo deseado para identificar plantas que poseen genes para rasgos deseables (o indeseables), de forma que esas plantas se pueden usar (o evitar) en un programa de reproducción selectiva.

La expresión “**marcador de microsatélites o SSR (repeticiones de secuencias simples)**” se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a un tipo de marcador genético que consiste en numerosas repeticiones de secuencias cortas de bases de ADN, que se encuentran en el loci a lo largo del ADN de la planta y tiene la posibilidad de ser altamente polimórfico.

La frase “**ácido nucleico**” se refiere a cualquier cadena física de unidades monoméricas que se puede corresponder con una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un polímero de ADN o ARN típico), oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas para ARN o ADN biológico, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados), y similares. En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario, multcatenario, o sus combinaciones. Excepto que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular de la presente invención comprende o codifica opcionalmente secuencias complementarias, además de cualquier secuencia explícitamente indicada.

La frase “**rasgo fenotípico**” se refiere a la aparición u otra característica detectable de un individuo, que resulta de la interacción de su genoma con el entorno.

El término “**pluralidad**” se refiere a más de una entidad. De este modo, una “pluralidad de individuos” se refiere a al menos dos individuos. En algunas realizaciones, el término pluralidad se refiere a más de la mitad del conjunto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una “pluralidad de una población” se refiere a más de la mitad de los miembros de esa población.

El término “**progenie**” se refiere al descendiente o descendientes de un cruzamiento particular. Típicamente, la progenie resulta de la reproducción de dos individuos, aunque algunas especies (particularmente algunas plantas y animales hermafroditas) se pueden autofecundar (es decir, la misma planta actúa como el donante de gametos tanto masculinos como femeninos). El descendiente o descendientes pueden ser, por ejemplo, de la generación F_1 , la F_2 , o cualquier generación subsiguiente.

La frase “**rasgo cualitativo**” se refiere a un rasgo fenotípico que está controlado por uno o unos pocos genes que muestran efectos fenotípicos importantes. Debido a esto, los rasgos cualitativos se heredan típica y simplemente. Los ejemplos en plantas incluyen, pero no se limitan a, color de flor, color de mazorca, y resistencia a enfermedades tales como, por ejemplo, resistencia al tizón norteño del maíz.

“**PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**” se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a un método para producir cantidades relativamente grandes de regiones específicas de ADN, haciendo posible de ese modo diversos análisis que se basan en esas regiones.

“**Fenotipo**” se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a una característica o características distinguibles de un rasgo genéticamente controlado.

Una “**planta**” es cualquier planta en cualquier etapa de desarrollo, particularmente una planta de semillas.

Una “**célula vegetal**” es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o una célula cultivada, o como parte de una unidad más organizada, tal como, por ejemplo, tejido vegetal, un órgano vegetal, o una planta completa.

“**Cultivo de célula vegetal**” se refiere a cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivos celulares, células en tejidos vegetales, polen, tubos de polen, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas etapas de desarrollo.

“**Material vegetal**” se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutas, polen, células de huevos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos celulares o de tejidos, o cualquier otra parte o producto de una planta.

Un “**órgano vegetal**” es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta, tal como una raíz, tallo, hoja, capullo de flor, o embrión.

“**Tejido vegetal**”, como se usa aquí, significa un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta *in planta* o en cultivo. Esta expresión incluye, pero no se limita a, plantas completas, órganos vegetales, semillas de plantas, cultivo tisular y cualesquiera grupos de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de esta expresión conjuntamente con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal como se enumera anteriormente o se abarca de otro modo por esta definición no pretende ser exclusivo de cualquier otro tipo de tejido vegetal.

La expresión “**parte vegetal**” indica una parte de una planta, incluyendo células individuales y tejidos celulares tales como células vegetales que están intactas en plantas, racimos de células y cultivos tisulares a partir de los cuales se pueden generar plantas. Los ejemplos de partes vegetales incluyen, pero no se limitan a, células individuales y tejidos procedentes de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutas, brotes de tallos, y semillas; así como polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, tallos, brotes, púas, rizomas, semillas, protoplastos, callos, y similares.

“**Polimorfismo**” se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a la presencia en una población de dos o más formas diferentes de un gen, marcador genético, o rasgo heredado.

El término “**población**” se refiere a una colección genéticamente heterogénea de plantas que comparten una derivación genética común.

La expresión “**predominantemente estéril masculina**” significa que, en una población de al menos 100 plantas, no más de 10%, preferiblemente no más de 5%, más preferiblemente no más de 1% de las flores en todas esas plantas tienen órganos masculinos funcionales que producen polen fértil. Se ha de entender que una planta individual puede tener flores tanto fértiles como estériles. En realizaciones preferidas, no más de 10%, preferiblemente no más de 5%, más preferiblemente no más de 1% de las flores en una planta individual tienen órganos masculinos funcionales que producen polen fértil.

El término “**sonda**” se refiere a una secuencia oligonucleotídica monocatenaria que formará un dúplex enlazado mediante hidrógeno con una secuencia complementaria en un analito de secuencia de ácido nucleico diana o su derivado de ADNc.

El término “**cebador**”, como se usa aquí, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de emparejarse con la diana de amplificación, permitiendo que se una una ADN polimerasa, que sirve de ese modo como punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión del cebador, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador (de la amplificación) es preferiblemente monocatenario para la eficiencia máxima en la amplificación. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de tensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la composición (contenido de A/T y G/C) del cebador. Un par de cebadores bidireccionales consiste en un cebador directo y un cebador inverso como se usa habitualmente en la técnica de amplificación de ADN, tal como en la amplificación mediante PCR. Se entenderá que “cebador”, como se usa aquí, se puede referir a más de un cebador, particularmente en el caso en el que existe cierta ambigüedad en la información con respecto a la secuencia o secuencias terminales de la región diana a amplificar. Por tanto, un “cebador” incluye una colección de oligonucleótidos cebadores que contienen secuencias que representan las variaciones posibles en la secuencia, o incluye nucleótidos que permiten un emparejamiento de bases típico. Los cebadores oligonucleotídicos se pueden preparar mediante cualquier método adecuado. Los métodos para preparar oligonucleótidos de secuencia específica son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas, y la síntesis química directa. Los métodos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el método de fosfo di- o triéster, el método de fosforamidato dietílico, y el método de soporte sólido descrito en, por ejemplo, el documento US 4.458.066. Los cebadores se pueden marcar, si se desea, incorporando medios detectables, por ejemplo, por medios espectroscópicos, de fluorescencia, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. La extensión dependiente del molde del cebador o cebadores oligonucleotídicos está catalizada por un agente polimerizante en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, es decir, los dNTP) o análogos, en un medio de reacción que comprende las sales apropiadas, cationes metálicos, y el sistema tamponante del pH. Los agentes polimerizantes adecuados son enzimas que se sabe que catalizan la síntesis de ADN dependiente del cebador y del molde. Las ADN polimerasas conocidas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de E. coli o su fragmento de Klenow, la T4 ADN polimerasa, y la Taq ADN polimerasa. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con estas ADN polimerasas son conocidas en la técnica. Los productos de la síntesis son moléculas dúplex que consisten en las hebras molde y las hebras de extensión del cebador, que incluyen la secuencia diana. A su vez, estos productos sirven como molde para otra ronda de replicación. En la segunda ronda de replicación, la hebra de extensión del cebador del primer ciclo se hibrida con su cebador complementario; la síntesis produce un producto “corto”, que está unido en los extremos tanto 5' como 3' mediante secuencias de cebador o sus complementos. Los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación del cebador, y extensión dan como resultado la acumulación exponencial de la región diana definida por los cebadores. Se llevan a cabo ciclos suficientes para lograr la cantidad deseada de polinucleótido que contiene la región diana de ácido nucleico. La cantidad deseada puede variar, y está determinada por la función para la que va a servir el polinucleótido producto. El método de la PCR está bien descrito en libros de texto, y es conocido por la persona experta. Tras la amplificación mediante PCR, los polinucleótidos diana se pueden detectar mediante hibridación con un polinucleótido sonda que forma un híbrido estable con el de la secuencia diana en condiciones de hibridación y de lavado restrictivas a moderadamente restrictivas. Si se espera que las sondas serán esencial y completamente complementarias (es decir, alrededor de 99% o mayor) a la secuencia diana, se usarán condiciones restrictivas. Si se espera algún desemparejamiento, por ejemplo si se esperan cepas variantes con el resultado de que la sonda no será completamente complementaria, la restricción de la hibridación se puede suavizar. Sin embargo, se escogen condiciones que descarten la unión no específica/adventicia. Las condiciones, que afectan a la hibridación, y que se seleccionan frente a la unión no específica, son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, 2001. Generalmente, una concentración más baja de sal y una mayor temperatura incrementan la restricción de las condiciones de hibridación. “Cebador de PCR” se entiende preferiblemente dentro del alcance de la presente invención que se refiere a fragmentos relativamente cortos de ADN monocatenario usados en la amplificación mediante PCR de regiones específicas de ADN.

La expresión “**planta descendiente**” se refiere a cualquier planta que resulta como progenie de una reproducción vegetativa o sexual de una o más plantas progenitoras o sus descendientes. Por ejemplo, una planta descendiente se puede obtener clonando o autofecundando una planta progenitora, o cruzando dos plantas progenitoras, e incluye autofecundaciones así como generaciones F₁ o F₂ o incluso posteriores. Una F₁ es una descendencia de primera generación producida a partir de progenitores, al menos uno de los cuales se usa por primera vez como donante

de un rasgo, mientras que los descendientes de segunda generación (F_2) o generaciones subsiguientes (F_3 , F_4 , etc.) son especímenes producidos a partir de autofecundaciones de F_1 , F_2 , etc. Una F_1 puede ser de este modo (y habitualmente es) un híbrido que resulta de un cruce entre dos progenitores de reproducción verdadera (reproducción verdadera es homocigota para un rasgo), mientras que una F_2 puede ser (y habitualmente es) una descendencia que resulta de la autopolinización de dichos híbridos F_1 .

“**Recombinación**” es el intercambio de información entre dos cromosomas homólogos durante la meiosis. La frecuencia de la recombinación doble es el producto de las frecuencias de los recombinantes individuales. Por ejemplo, se puede encontrar un recombinante en un área de 10 cM con una frecuencia de 10%, y se encuentran recombinantes dobles con una frecuencia de $10\% \times 10\% = 1\%$ (1 centimorgan se define como una progenie recombinante de 1% en un cruce de ensayo).

El término “**RHS**” o “**sistema híbrido restaurado**” significa el sistema híbrido de esta invención basado en esterilidad masculina nuclear. Las frases “**sexualmente cruzado**” y “**reproducción sexual**”, en el contexto de la presente invención, se refieren a la fusión de gametos para producir progenie (por ejemplo, mediante fertilización, tal como para producir semilla mediante polinización en plantas). En algunas realizaciones, un “cruce sexual” o “fertilización por cruce” es la fertilización de un individuo por otro (por ejemplo, polinización cruzada en plantas). En algunas realizaciones, el término “autofecundación” se refiere a la producción de semilla mediante autofertilización o autopolinización; es decir, el polen y el óvulo proceden de la misma planta.

“**Reproducción selectiva**” se entiende dentro del alcance de la presente invención que se refiere a un programa de reproducción que usa plantas que poseen o presentan rasgos deseables como progenitores.

Las expresiones “**condiciones restrictivas**” o “**condiciones de hibridación restrictivas**” incluyen referencia a condiciones en las que un polinucleótido se hibridará a su secuencia diana en un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces con respecto al fondo). Las condiciones restrictivas dependen de las secuencias, y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la restricción de las condiciones de hibridación y/o de lavado, se pueden identificar secuencias diana que son 100% complementarias a la sonda (sondaje homólogo). Como alternativa, las condiciones de restricción se pueden ajustar para permitir cierto desemparejamiento en las secuencias de forma que se detecten menores grados de similitud (sondaje heterólogo). Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,5 M de ion Na, típicamente 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos alrededor de 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos alrededor de 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Las condiciones de baja restricción ejemplares incluyen hibridación con una disolución tampón de formamida al 30 a 35%, NaCl 1 M, SDS al 1% (p/v; dodecilsulfato de sodio) a 37°C, y un lavado en 1 X a 2 X SSC (20 X SSC = 3,0 M de NaCl/≈,3 M de citrato trisódico) a 50 a 55°C. Las condiciones de restricción moderada ejemplares incluyen la hibridación en formamida a 40 a 45°C, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,5X a 1 X SSC a 55 a 60°C. Las condiciones de restricción elevada ejemplares incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1 X SSC a 60 a 65°C. La especificidad es típicamente la función de lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la disolución final del lavado. Para híbridos de ADN-ADN, la T_m se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (Anal. Biochem., 138:267-284, 1984): $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\%form) - 500/L$, en la que M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, %form es el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. T_m se reduce en alrededor de 1°C por cada 1% de desemparejamiento; de este modo, T_m , las condiciones de hibridación y/o de lavado se pueden ajustar para hibridarse a secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con aproximadamente 90% de identidad, la T_m se puede disminuir 10°C. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean alrededor de 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones muy restrictivas pueden utilizar hibridación y/o lavado a 1, 2, 3, ó 4°C menores que el punto de fusión térmico (T_m); las condiciones moderadamente restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9, ó 10°C menores que el punto de fusión térmico (T_m); las condiciones de baja restricción pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15, ó 20°C menores que el punto de fusión térmico (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y

de lavado, y la T_m deseada, los expertos normales entenderán que se describen inherentemente variaciones en la restricción de las disoluciones de hibridación y/o de lavado. Si el grado deseado de desemparejamiento da como resultado una T_m menor que 45°C (disolución acuosa) o 32°C (disolución de formamida), se prefiere incrementar la concentración de SSC de forma que se pueda usar una mayor temperatura. En Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte 1, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y. (1993); y en *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel, et al., eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995), se encuentra una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos. Los métodos de hibridación respectiva son conocidos en la técnica, cuyas condiciones se pueden calcular por medios conocidos en la técnica. Esto se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Cold Spring Harbor, N.Y. y en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al, eds., John Wiley and Sons, Inc., 2000. Los métodos para determinar el porcentaje de identidad de secuencia son conocidos en la técnica, un ejemplo de los cuales es el software de análisis de secuencias por ordenador de GCG (GCG, Inc, Madison Wis.)

"**Planta de ensayo**" se entiende dentro del alcance de la presente invención que se refiere a una planta usada para caracterizar genéticamente un rasgo en una planta a ensayar. Típicamente, la planta a ensayar se cruza con una planta "de ensayo", y se puntúa la relación de segregación del rasgo en la progenie del cruce.

La expresión "**de ensayo**" se refiere a una línea o individuo con un genotipo estándar, características conocidas, y comportamiento establecido. Un "progenitor de ensayo" es un individuo procedente de una línea de ensayo que se usa como progenitor en un cruce sexual. Típicamente, el progenitor de ensayo no está relacionado con o es genéticamente diferente del individuo con el que se cruza. Un progenitor de ensayo se usa típicamente para generar la progenie F_1 cuando se cruza con individuos o líneas consanguíneas para evaluación fenotípica.

La frase "**combinación de cruce superior**" se refiere al proceso de cruzar una línea de ensayo individual con múltiples líneas. El fin de producir tales cruces es determinar el comportamiento fenotípico de la progenie híbrida, esto es, evaluar la capacidad de cada una de las múltiples líneas para producir fenotipos deseables en la progenie híbrida derivada de la línea mediante el cruce de ensayo.

Las expresiones "**variedad**" o "**variedad de cultivo**" significan un grupo de plantas similares que, mediante rasgos estructurales o genéticos y/o comportamiento, se pueden distinguir de otras variedades dentro de la misma especie.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona un sistema comercialmente viable para la producción de semilla híbrida de *Brassica napus*. Este sistema emplea un gen de fertilidad masculina nuclear dominante. La fertilidad se puede restaurar mediante un alelo restaurador dominante. Las contribuciones inventivas comprenden, pero no se limitan a:

1. Proporcionar una línea condicionalmente estéril masculina nuclear, que comprende el gen de esterilidad masculina en una forma homocigota (genotipo MsMs^{srfrf}). La provisión de esta línea es posible por la provisión de un marcador genético para el gen de esterilidad masculina como parte de esta invención.
2. Proporcionar un método para propagar la línea condicionalmente estéril masculina en una forma sin cambiar induciendo fertilidad vía un tratamiento térmico específico.
3. Proporcionar una línea mantenedora de *Brassica napus*, que ni comprende el gen de esterilidad masculina nuclear ni una copia funcional del alelo restaurador (genotipo msms^{srfrf}).

Puesto que la propagación de la línea femenina en todos los sistemas híbridos es la principal etapa costosa y limitante de la cantidad, el sistema actual proporciona la línea femenina en un procedimiento de 2 etapas: en primer lugar, se encontró que el presente sistema es un sistema de esterilidad masculina nuclear sensible al entorno (enms). Aunque la mayoría de estos sistemas no son comercialmente viables, debido a que la esterilidad se puede perder accidentalmente en condiciones de crecimiento en campo, el sistema actual se puede activar y desactivar mediante un tratamiento de temperatura elevada, lo que es improbable que ocurra en condiciones en las que normalmente se hace crecer la colza. La utilización de este sistema proporciona cantidades suficientes de la línea femenina prebásica mediante un procedimiento de autofecundación inventivo que utiliza las

propiedades de enms.

En una segunda etapa, la línea femenina prebásica se cruza con la línea mantenedora (msmsrfrf) para producir una línea femenina básica estéril masculina que comprende el gen de esterilidad masculina en una forma heterocigota (genotipo Msmsrfrf).

5 La expresión “**femenina prebásica**”, como se usa aquí, se refiere, por ejemplo, a una línea de *Brassica napus* condicionalmente (por ejemplo, modulada por temperatura elevada) estéril masculina con el genotipo MsMsrfrf, genotipo el cual es obtenible, por ejemplo, a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 (véase la sección 1, “Método para proporcionar la planta y semilla femenina prebásica”, más abajo), en la que dicha planta de *Brassica napus* femenina es

- i. homocigota para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480,
- ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481,
- 15 iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y
- iv. revierte a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C.

20 Además, la expresión “**femenina básica**”, como se usa aquí, se refiere, por ejemplo, a una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf (véase la sección 2, “Producción de semilla básica”, más abajo), en la que dicha planta de *Brassica napus* femenina es

- i. heterocigota para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480,
- 25 ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481,
- iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y
- iv. revierte a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C.

30

Tanto las líneas femeninas estériles masculinas prebásicas como básicas son adecuadas como líneas femeninas en la producción de semilla híbrida.

35 Finalmente, la expresión “**línea mantenedora**”, como se usa aquí, se refiere a una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrfrf, genotipo el cual está presente en la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 (véase la sección 2.1, “Línea mantenedora”, más abajo), en la que dicha planta de *Brassica napus* es

- i. homocigota para el alelo de fertilidad (alelo ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481,
- 40 ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y
- iii. predominantemente fértil masculina.

45 Es una ventaja especial del sistema híbrido de la presente invención que virtualmente cada línea de colza disponible comprende un alelo restaurador funcional y se puede usar como una línea fértil masculina para ser combinada con la línea femenina (estéril masculina) para producir semilla híbrida.

Una de las dificultades más obstaculizadoras a la hora de proporcionar un sistema híbrido de esterilidad masculina nuclear comercialmente factible es la propagación y multiplicación de la planta femenina (estéril masculina). En la mayoría de los sistemas, sólo es factible la propagación que

parte de una planta heterocigota para el alelo Ms. Esto conduce a la necesidad de extraer todas aquellas plantas que, como consecuencia de la autofecundación, carecen completamente del alelo Ms. De este modo, es ventajoso proporcionar un sistema de esterilidad condicional, en el que la fertilidad/esterilidad se puede activar/desactivar basándose en un factor que no está presente en condiciones de crecimiento normales, y en el que la distribución de la fertilidad/esterilidad es casi completa. Hasta ahora no se ha descrito tal sistema, el cual es comercialmente factible.

Ahora se encontró sorprendentemente que ciertos componentes comprendidos en la semilla híbrida MSL se podrían utilizar para obtener un sistema gms comercial. Durante el trabajo, se observó una notable, y sorprendente, similitud con el sistema de Takagi. Aunque las genéticas del sistema híbrido de la presente invención se aislaron a partir de líneas híbridas (de hecho, las plantas estériles masculinas se seleccionaron inicialmente a partir de la línea híbrida NPZ "Panther" comercialmente disponible; véase el Ejemplo 3), que no se pudieron ligar claramente a un germoplasma de Takagi (y de hecho se describen como pertenecientes a un sistema cms), existen algunas indicaciones fenotípicas (tales como la sensibilidad al calor) para suponer al menos una similitud de las genéticas. Basándose en el material MSL, se han desarrollado marcadores (véanse los Ejemplos), y, mediante el uso de estos marcadores, se han aislado los elementos del sistema de la presente invención. Sin embargo, las semillas de las líneas de Takagi originales ya no están disponibles, de manera que no fue posible realizar una comparación detallada. Incluso si las genéticas en el germoplasma de Takagi fuesen idénticas a la descrita aquí, ni la descripción original de Takagi ni el trabajo subsiguiente relacionado de Theis (1990) proporcionan una descripción factible para la invención descrita aquí debajo. Sin comprender la genética exacta de un sistema híbrido, no es factible su reducción a un proceso comercialmente viable.

Theis describe el sistema de Takagi como sigue: sólo estaban presentes las plantas estériles masculinas, si las plantas homocigotas para el gen de esterilidad masculina (ms) recesivo también comprenden el denominado gen modificador (md) en una forma recesiva no homocigota. Como consecuencia, Theis postula un gen de esterilidad masculina recesivo y un gen modificador dominante. Sin embargo, los hallazgos de los presentes inventores son completamente diferentes: la separación de los dos genes subyacentes en el sistema de Takagi, que fue posible por la provisión de marcadores, demostró un gen de esterilidad masculina (Ms) dominante y un alelo restaurador recesivo (alelo rf). La restauración de la fertilidad es posible por un alelo restaurador dominante (alelo Rf), que está presente en todas las líneas no basadas en Takagi (virtualmente todas las líneas de *Brassica napus* públicamente disponibles). Obviamente, Theis nunca segregó los dos genes ni proporcionó líneas, que fueron homocigotas para los genes (según se demuestra por los patrones de segregación en sus experimentos de cruzamientos). El gen que Theis denominó erróneamente el "alelo ms" no es – como se demuestra en el contexto de la presente invención – capaz como tal de proporcionar un fenotipo estéril masculino. Por el contrario, sólo es la forma inactiva de un gen restaurador (rf). El gen que Theis denominó el "gen modificador" es de hecho el gen de esterilidad masculina. Esto no es sorprendente basándose en el hecho de que sin los marcadores tal análisis de segregación puede ser muy difícil. Otras propiedades fenotípicas ligadas al alelo Ms no son adecuadas para diferenciar entre la forma heterocigota y homocigota. De este modo, Theis proporciona información errónea que habría impedido a la persona experta en la técnica desarrollar un sistema híbrido comercialmente disponible. Además, un gen de esterilidad masculina recesivo está ligado a muchas dificultades en un sistema híbrido comercial. También desde este ángulo, Theis se aleja en su enseñanza de una aplicación comercial del sistema de Takagi.

Además, la provisión de una línea estéril masculina homocigota todavía no conduciría a un sistema comercialmente viable. Es necesario resolver dos problemas importantes: en primer lugar, el problema de la propagación de la línea estéril masculina (Ms) homocigota (denominada en el contexto de la presente invención como plantas femeninas prebásicas), que hace a todos los otros sistemas de esterilidad masculina nuclear conocidos hasta hoy comercialmente no viables. En segundo lugar, existe el problema de aumento de escala hasta una escala comercial. El problema de la propagación de la línea Ms homocigota ha sido resuelto por la presente invención proporcionando un procedimiento de refertilización condicionalmente inducible por calor. Este procedimiento permite una propagación fácil de la línea prebásica estéril masculina.

Aunque las plantas femeninas prebásicas se pueden emplear principalmente de forma directa como una femenina para la producción de semillas híbridas, el procedimiento de tratamiento térmico no sería adecuado para proporcionar cantidades suficientes de dicha línea. Por lo tanto, el método de la presente invención emplea una etapa de aumento de escala, en la que la línea condicionalmente estéril masculina (femenina prebásica) se cruza con una línea mantenedora para proporcionar nuevamente semillas estériles masculinas. Esta semilla es heterogénea para el gen de esterilidad masculina, pero todavía tiene el fenotipo condicionalmente estéril masculino. Esta

propagación sólo ha sido posible proporcionando una línea mantenedora, que no tiene un alelo ms funcional ni un alelo restaurador funcional. Este procedimiento de aumento de escala es necesario para un sistema comercialmente viable.

De forma interesante y siendo una característica especial inventiva y ventajosa de la presente invención, el gen restaurador de la fertilidad está presente en todas las líneas no Takagi, es decir, en virtualmente todas las líneas de *Brassica napus* disponibles. Esto es beneficioso debido a que esto significa que virtualmente todas las líneas se pueden usar como líneas masculinas en el proceso de producción de semillas híbridas sin la necesidad de introgresar un alelo restaurador. Esto es una ventaja significativa en comparación con, por ejemplo, el sistema de Ogura, y una similitud notable con el sistema NPZ MSL, cuya genética es públicamente desconocida, aunque se afirma que el sistema NPZ MSL es un sistema de esterilidad masculina citoplasmático (cms) (Frauen, 1999).

1. Método para proporcionar la planta y semilla femenina prebásica

Una primera realización de la presente invención se refiere a un método para producir o multiplicar semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina (modulada mediante temperatura elevada) con el genotipo MsMsrfrrf (adecuada como línea femenina prebásica para la producción de semillas híbridas de *Brassica napus*), comprendiendo dicho método las etapas de

a) proporcionar una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf, genotipo el cual está presente en la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, en el que dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina es

i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 4148, y

iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y

iv. vuelve a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C, y

b) exponer dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina durante al menos 4 horas a una temperatura mayor que 35°C, y

c) exponer la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina tratada térmicamente obtenida en la etapa (b) a una temperatura menor que 33°C hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas, y

d) permitir la autopolinización de las plantas de *Brassica napus* que tienen dichas flores fértiles masculinas obtenidas en la etapa (c), dejar que se desarrollen las semillas, y cosechar las semillas, en el que las semillas cosechadas se caracterizan porque son semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf.

La expresión “**genotipo MsMsrfrrf**” significa una planta homocigota para el alelo Ms dominante, y homocigota para el alelo mantenedor recesivo (también denominado como alelo restaurador disfuncional o alelo rf). Este genotipo puede estar presente en cualquier antecedente genético de una planta de *Brassica*, preferiblemente una planta de *Brassica napus*, con la condición de que no está presente ninguna copia de un alelo restaurador funcional (alelo Rf).

En una realización preferida de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina proporcionada en la etapa (a) del método para producir o multiplicar semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf descrito anteriormente se caracteriza además por ser

iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura preferiblemente menor que 25°C, más preferiblemente a una temperatura menor que 20°C, pero al menos a una temperatura que permita el crecimiento normal, tal como al menos 12°C, preferiblemente al menos 14°C, más preferiblemente al menos 16°C, y

- iv. vuelve a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura de preferiblemente entre 35°C y 43°C, más preferiblemente a una temperatura de entre 37°C y 40°C, lo más preferible a una temperatura de alrededor de 39°C; lo más preferible, con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica más abajo (por ejemplo, en la etapa b)) y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente, como se define más abajo (por ejemplo, en la etapa c)).

En una realización preferida de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina se expone en la etapa (b) del método para producir o multiplicar semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf descrito anteriormente antes y/o durante la floración durante al menos 4 horas, preferiblemente durante al menos 8 ó 12 horas, más preferiblemente durante al menos 24 ó 36 horas, incluso más preferiblemente durante al menos 48 ó 96 horas, y lo más preferible durante al menos 112 horas a una temperatura de alrededor de 35°C a alrededor de 43°C, preferiblemente a una temperatura de alrededor de 36 a alrededor de 42°C, más preferiblemente a una temperatura de alrededor de 37°C a alrededor de 41°C, incluso más preferiblemente a una temperatura de alrededor de 38 a alrededor de 40°C, y lo más preferible a una temperatura de alrededor de 39°C.

En una realización adicional preferida de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina se expone en la etapa (c) del método para producir o multiplicar semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf descrito anteriormente a una temperatura menor que 30°C, preferiblemente a una temperatura menor que 28°C, más preferiblemente a una temperatura entre 16 y 25°C, incluso más preferiblemente a una temperatura de entre 18 y 20°C, hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas.

La planta de *Brassica napus* homocigota para el alelo Ms representa una contribución de la presente invención. De este modo, otra realización de la presente invención se refiere a una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf, genotipo el cual es obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, en la que dicha planta de *Brassica napus* femenina condicionalmente estéril masculina es

- i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480,
- ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481,
- iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C,
- iv. vuelve a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C.

En el contexto de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf como se describe anteriormente también se denomina como “línea femenina prebásica” o “femenina prebásica”.

Preferiblemente, dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf es obtenible a partir de la semilla producida por el método para la producción de semilla femenina prebásica de la presente invención. Otra realización de la presente invención se refiere a semillas, que crecen para formar dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf, partes de dicha planta, y al uso de dicha planta en un proceso de producción de semillas híbridas. Preferiblemente, el antecedente genético de dicha planta no es un híbrido; más preferiblemente, es una línea de *Brassica napus* consanguínea. Preferiblemente, dicha parte vegetal se selecciona del grupo que comprende semillas, microesporas, protoplastos, células, óvulos, polen, partes vegetativas, cotiledones, cigotos.

En una realización preferida de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf, genotipo el cual es obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, se caracteriza además por ser

- iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura preferiblemente menor que 25°C, más preferiblemente a una temperatura menor

que 20°C, pero al menos a una temperatura que permite el crecimiento normal, tal como al menos 12°C, preferiblemente al menos 14°C, más preferiblemente al menos 16°C, y

- iv. vuelve a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura preferiblemente entre 35°C y 43°C, más preferiblemente a una temperatura entre 37°C y 40°C, lo más preferible a una temperatura de alrededor de 39°C; preferiblemente con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente, como se define aquí.

En una realización preferida de la presente invención, la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 se usa para obtener una planta de *Brassica napus* estéril masculina con el genotipo MsMsrrf (es decir, la femenina prebásica como se describe aquí). En una realización adicional preferida de la presente invención, se puede usar cualquier semilla producida por la Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) en Alemania basado en su sistema MSL, para obtener una planta de *Brassica napus* estéril masculina con el genotipo MsMsrrf. Los ejemplos de tales semillas incluyen, pero no se limitan a, semillas de las líneas Joker, Pronto, Panther, Artus, Baldur, Elan, Marcant, Mendel, Talent, Taurus, Tenno, Titan, Trabant, Zeppelin, Visby, Horus, y Siesta. Otros ejemplos de semillas a partir de las cuales se puede obtener la planta de *Brassica napus* estéril masculina con el genotipo MsMsrrf incluyen, pero no se limitan a, semillas como Alkido, Mika, Fangio, Elektra, y Libretto. En una realización adicional preferida de la presente invención, las semillas depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41480 se usan en un método para producir o multiplicar semillas de una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrrf, por ejemplo en un método como se describe anteriormente.

La línea estéril masculina prebásica de la presente invención tiene preferiblemente un contenido total de glucosinolatos no mayor que 50 µmoles por gramo de semilla secada al aire a 9% de humedad (menor que 40 µmoles, más preferiblemente entre 5 y 35 µmoles, lo más preferible entre 10 y 25 µmoles por gramo). Se ha de señalar que el tratamiento térmico utilizado en la propagación de la línea femenina prebásica (por ejemplo en condiciones de cámara térmica) incrementa el contenido de glucosinolatos hasta niveles que en algunos casos superan los 30 µmoles por gramo. También, el híbrido F₁ cosechado a partir de la línea femenina básica estéril puede superar 30 µmoles de GSL debido al bajo conjunto de semillas en la producción de semillas. Sin embargo, esto no es un resultado de las genéticas de la línea sino debido al estrés medioambiental, mientras que los niveles de glucosinolatos en el grano producido a partir de las plantas híbridas de la presente invención (semilla F₂) están a niveles comerciales (teniendo un contenido total de glucosinolatos no mayor que 25 µmoles por gramo de semilla secada al aire a 9% de humedad (preferiblemente entre 1 y 22 µmoles, más preferiblemente entre 5 y 20 µmoles, lo más preferible entre 8 y 17 µmoles por gramo)).

1.1 El alelo Ms, su fenotipo y marcador asociados

El término “**obtenible**” con respecto a un depósito hecho bajo las regulaciones del Tratado de Budapest, y referido al alelo Ms, Rf, ms, rf o a cualquier genotipo que comprende una combinación de los mismos, significa que estos genes o genotipos se pueden obtener a partir de dicho material depositado, pero también se pueden obtener a partir de otro material. La secuencia de los genes obtenidos a partir de otro material puede variar con respecto a la secuencia del gen en el material depositado (“variante”). De este modo, la expresión “**alelo Ms**” comprende el gen obtenible a partir del material depositado, pero también variantes del mismo. En consecuencia, en una realización preferida de la presente invención, el alelo Ms es el alelo Ms presente en la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 o una variante génica del mismo, que confiere esencialmente el mismo fenotipo que el alelo Ms presente en la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480. En una realización preferida de la presente invención, las semillas depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41480 se usan para obtener el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms). En una realización adicional preferida de la presente invención, el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) también se puede obtener a partir de semillas producidas por la Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) en Alemania basándose en su sistema MSL. Los ejemplos de tales semillas incluyen, pero no se limitan a, semillas de las líneas Joker, Pronto, Panther, Artus, Baldur, Elan, Marcant, Mendel, Talent, Taurus, Tenno, Titan, Trabant, Zeppelin, Visby, Horus, y Siesta. Otros ejemplos de semillas a partir de las cuales se puede obtener el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) incluyen, pero no se limitan a, semillas como Alkido, Mika, Fangio, Elektra, y Libretto. Adicionalmente, el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) también se puede obtener a partir de semillas producidas por Syngenta (o una de sus filiales), tales como, por ejemplo, pero sin restringirse a, semillas de las líneas NK Petrol, NK Karibik, NK Speed, NK Octans, NK Kick, NK Technik, NK Picolo, NK Caravel.

“**Esencialmente el mismo fenotipo**”, como se usa aquí, significa la capacidad de conferir un fenotipo condicionalmente (preferiblemente modulado por temperatura elevada) estéril masculino nuclear.

Preferiblemente, si se obtiene de otras fuentes, el origen de dicha otra fuente es la línea mutada proporcionada por Takagi (1970). Se ha de entender que aunque el alelo Ms es obtenible a partir de las semillas de *Brassica napus* depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41480, pueden existir otras fuentes a partir de las cuales se puede obtener dicho alelo Ms (en idéntica forma o en forma variante). La identidad y/o similitud de los genes y genotipos proporcionados en el contexto de la presente invención (ya sea obtenidos del depósito o de otras fuentes) se pueden demostrar por una o más de las propiedades ligadas a dichos genes o genotipos descritos más abajo.

La propiedad más característica y única del alelo Ms utilizado en el contexto de la presente invención es el hecho de que la fertilidad se puede restaurar mediante virtualmente cualquier línea de *Brassica napus* disponible públicamente accesible (distinta de las líneas que resultan de un germoplasma de Takagi), pero no por la línea mantenedora para la cual se depositan semillas con el Número de Depósito NCIMB 41481. La línea mantenedora, como se proporciona mediante la presente invención, comprende el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional) en una forma homocigota (rfrf), mientras que una planta de *Brassica napus* “normal” comprende el restaurador en una forma funcional (RfRf). Excepto para un germoplasma derivado del germoplasma de Takagi, no existen líneas conocidas que no comprendan al menos una copia funcional del alelo Rf. Como consecuencia de esto, se encuentra que virtualmente todas las líneas de colza disponibles hasta la fecha de la invención son líneas restauradoras. La presencia de dos genes Ms y rf, que presumiblemente presentan una mutación doble en el germoplasma de Takagi, es esencial para un sistema híbrido funcional como se describe en la presente invención. Esto también significa que, usando el material depositado, se puede determinar fácilmente la presencia del alelo Ms o del alelo rf. Una línea estéril masculina basada en el alelo Ms se puede “mantener” en su fenotipo estéril masculino cruzándola con la línea mantenedora para la cual se depositan semillas con el Número de Depósito NCIMB 41481, pero también se puede volver a hacer fértil cruzándola con cualquier línea restauradora (véase más abajo para los ejemplos).

En consecuencia, el alelo Ms está ligado a un genotipo estéril masculino que se puede devolver (al menos en parte en la siguiente generación) a la fertilidad por cualquier planta que comprende al menos un alelo Rf dominante (las denominadas “**plantas restauradoras**” como se citan aquí), pero no por las plantas derivadas de las semillas depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41481 (mantenedoras). De este modo, el alelo Ms se caracteriza preferiblemente por conferir un fenotipo estéril masculino nuclear condicional, el cual

a) se devuelve temporalmente a la fertilidad mediante una exposición a una temperatura mayor que 35°C,

b) se devuelve a la fertilidad en al menos parte de las plantas F₁ obtenidas cruzando una planta estéril masculina con el genotipo MsMsrf o Msmsrf con cualquier planta de *Brassica napus* que comprende al menos un alelo Rf dominante, y

c) se mantiene en las plantas F₁ obtenidas cruzando una planta con un fenotipo estéril masculino nuclear referido por dicho alelo Ms con las plantas fértiles masculinas derivadas de semillas depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41481.

En una realización preferida de la presente invención, el alelo Ms se caracteriza preferiblemente por conferir un fenotipo estéril masculino nuclear condicional, el cual

a) se restaura temporalmente a la fertilidad mediante una exposición a una temperatura mayor que 35°C, preferiblemente a una temperatura entre 35°C y 43°C, más preferiblemente a una temperatura entre 37°C y 40°C, lo más preferible a una temperatura de alrededor de 39°C; preferiblemente con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente, como se define aquí,

b) se restaura a la fertilidad en al menos parte de las plantas F₁ obtenidas cruzando una planta estéril masculina con el genotipo MsMsrf o Msmsrf con cualquier planta de *Brassica napus* que comprende al menos un alelo Rf dominante, o en todas las plantas F₁ obtenidas cruzando una planta estéril masculina con el genotipo MsMsrf o Msmsrf con una planta de *Brassica napus* homocigota para el alelo Rf, es decir, con el genotipo RfRf, y

c) se mantienen las plantas F₁ obtenidas cruzando una planta estéril masculina condicional con

el genotipo MsMsrf (por ejemplo, una planta con un fenotipo estéril masculino referido por dicho alelo Ms) con las plantas derivadas de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481.

Una “**restauración temporal de la fertilidad**” significa que sólo las flores inducidas durante el tratamiento a alta temperatura se desarrollan en flores fértiles masculinas, mientras que las flores inducidas antes o después se desarrollan solamente en flores estériles masculinas, incluso si se desarrollan en la misma planta. De este modo, puesto que el tratamiento a temperatura elevada es temporal, también la restauración de la fertilidad es temporal y se correlaciona con la duración y longitud del tratamiento a temperatura elevada.

De este modo, cruzando una planta estéril masculina con

a) cualquier planta de *Brassica napus* consanguínea, fértil masculina, que comprende al menos un alelo Rf, que es preferiblemente homocigota para el alelo Rf (planta restauradora), y

b) las plantas derivadas a partir de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, se puede identificar sin ambigüedad la presencia o ausencia del alelo Ms.

“**Plantas restauradoras**” o “**línea restauradora**” significa cualquier planta de *Brassica napus* consanguínea, fértil masculina, que comprende al menos un alelo Rf, que es preferiblemente homocigota para el alelo Rf. Las plantas restauradoras incluyen todas las líneas de *Brassica napus* fértiles, consanguíneas (polinizadas de forma abierta, no híbridas), comercializadas como semillas para el crecimiento, preferiblemente a la fecha de prioridad de esta invención. No se ha encontrado ninguna excepción por los inventores. Las líneas restauradoras adecuadas también incluyen aquellas en la lista de variedades de OECD de diciembre de 2006 (lista de variedades de OECD apta para la certificación - 2006/2007; Dic. 2006; <http://www.oecd.org/dataoecd/1/44/33999447.PDF>; http://www.oecd.org/document/14/0,2340,en_2649_33909_2485070_1_1_1_1,00.html), preferiblemente líneas no híbridas comercializadas como semillas para crecimiento (para la producción de aceite), más preferiblemente aquellas que no están marcadas como “d” (consanguínea en tanto que representan líneas parentales híbridas) o “b” (híbridas) en dicha lista de OECD.

Aunque esta propiedad es única al sistema híbrido de la presente invención proporcionado aquí más abajo, existen otras propiedades que están ligadas o asociadas con el alelo Ms. En una realización preferida de la presente invención, el fenotipo condicionalmente estéril masculino y/o el alelo Ms está ligado y/o asociado con una o más características seleccionadas del grupo que consiste en

- I. un fenotipo de aborto de la yema en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms,
- II. un fenotipo de pétalos de rayas blancas o manchado de blanco en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms, y
- III. la presencia de un marcador específico del alelo Ms tanto en plantas fértiles masculinas como estériles masculinas que comprenden al menos una copia del alelo Ms.

En otra realización preferida de la presente invención, el fenotipo condicionalmente estéril masculino y/o el alelo Ms está ligado y/o asociado con uno o más marcadores (marcador del alelo Ms) seleccionados del grupo (“**grupo de marcadores del gen MS**”) que consiste en

- I. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos (mutaciones) en la región del marcador NR1116 que consiste en
 - a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 85 en SEC ID NO: 3,
 - b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 87 en SEC ID NO: 3,
 - c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 139 en SEC ID NO: 3,
 - d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 214 en SEC ID NO: 3,

- e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 218 en SEC ID NO: 3,
- f) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 277 en SEC ID NO: 3,
- 5 g) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 286 en SEC ID NO: 3,
- h) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 312 en SEC ID NO: 3,
- 10 i) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 319 en SEC ID NO: 3,
- j) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 359 en SEC ID NO: 3,
- k) la mutación de supresión 5'- TTGGTGAACAATC -3' en la posición correspondiente a 221 en SEC ID NO: 3,
- 15 l) la mutación de inserción 5'- GAA -3' en la posición que corresponde a 328-330 en SEC ID NO: 3,

II. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos (mutaciones) en la región del marcador NR2525 que consiste en

- 20 a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 60 en SEC ID NO: 6,
- b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 92 en SEC ID NO: 6,
- c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 105 en SEC ID NO: 6,
- 25 d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 158 en SEC ID NO: 6,
- e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 431 en SEC ID NO: 6,
- 30 f) la mutación de supresión de un solo nucleótido en la posición que corresponde a la posición 82 en SEC ID NO: 6,
- g) la mutación de supresión 5'- TGAGCAAAA -3' en la posición que corresponde a 17 a 25 en SEC ID NO: 6,

III. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SNP que consiste en

- 35 a) una señal positiva en un ensayo de SNP (preferiblemente un ensayo de SNP a base de TaqMan®) que usa una sonda de SNP (sonda 1 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 12 (sonda específica del alelo estéril HiNK6701), y una señal negativa que usa una sonda de SNP (sonda 2 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 11 (sonda específica del alelo fértil HiNK6700),
- 40 b) una señal positiva en un ensayo de SNP (preferiblemente un ensayo de SNP a base de TaqMan®) que usa una sonda de SNP (sonda 3 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 17 (sonda específica del alelo estéril HiNK6775), y una señal negativa que usa una sonda de SNP (sonda 4 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 18 (sonda específica del alelo fértil HiNK6776),
- 45

IV. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SSR que consiste en:

- a) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 96,7 (+/- 1,0) pb que resulta de

una reacción de PCR con los cebadores descritos por las SEC ID NO: 1 y 2,

b) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 192,8 (+/- 0,3) pb que resulta de una reacción de PCR con los cebadores descritos por las SEC ID NO: 4 y 5, y

5 V. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores ligados a al menos una de las secuencias expuestas como SEC ID NO: 3, 6, 11 y 18,

en los que el uno o más marcadores (marcador del alelo Ms) también incluyen una secuencia nucleotídica aislada seleccionada del grupo que consiste en secuencias las cuales

I. tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con, o

II. se hibridan en condiciones restrictivas con, o

10 III. comprenden al menos 25 nucleótidos consecutivos de

las secuencias marcadoras definidas anteriormente en I. a V.

15 En una realización preferida, el fenotipo condicionalmente estéril masculino y/o el alelo Ms está ligado y/o asociado con marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos (mutaciones) en la región marcadora NR1116 que consisten en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ó 12 de las mutaciones del grupo I., más preferiblemente al menos las mutaciones en las posiciones que corresponden a la posición 214 (T/C) y 218 (T/G) en SEC ID NO: 3. Preferiblemente, hay al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7 mutaciones del grupo II., más preferiblemente al menos las mutaciones en la posición que corresponde a la posición 158 en SEC ID NO: 6.

20 Adicionalmente, uno o más marcadores del grupo V. anterior ligados a y/o asociados con el fenotipo condicionalmente estéril masculino y/o el alelo Ms pueden estar ligados a 1, 2, 3, o a todas las secuencias expuestas como SEC ID NO: 3, 6, 11 y 18.

25 Los marcadores como se describen anteriormente se pueden usar en otros diversos aspectos de la presente invención. Sin embargo, los aspectos de la presente invención no están limitados al uso de los marcadores como se describe en la presente Solicitud. Se enfatiza adicionalmente que estos aspectos pueden también hacer uso de marcadores no descritos explícitamente aquí, o marcadores aún por identificar.

30 El término "SNP" o la expresión "**polimorfismo de un solo nucleótido**" significa una variación de una secuencia nucleotídica (preferiblemente un ADN) que se produce cuando un solo nucleótido (preferiblemente A, T, C, o G) en preferiblemente el genoma (u otra secuencia compartida) difiere entre miembros de una especie o entre cromosomas o alelos emparejados en un individuo. Por ejemplo, dos fragmentos de ADN secuenciados procedentes de diferentes individuos, AAGCTTA a AAGCTTA, contienen una diferencia en un solo nucleótido. En este caso se puede decir que hay dos alelos: C y T. Los polimorfismos de un solo nucleótido pueden caer dentro de las secuencias codificantes de genes, en regiones no codificantes de genes, o en las regiones intergénicas entre genes. Los SNP dentro de una secuencia codificante pueden no cambiar necesariamente la secuencia de aminoácidos de la proteína que se produce, debido a degeneración del código genético. Un SNP en el que ambas formas conducen a la misma secuencia polipeptídica se denomina *sinónimo* (algunas veces denominado mutación silenciosa); si se produce una secuencia polipeptídica diferente, son *no sinónimos*. Los SNP que no están localizados en regiones codificantes de proteínas todavía pueden tener consecuencias para el corte y empalme génico, unión a factores de transcripción, o la secuencia de ARN no codificante. Sin embargo, un SNP como tal puede no tener relevancia funcional en absoluto, sino que puede estar "ligado" o asociado solamente con un cierto fenotipo y/o genotipo (es decir, se segrega con una cierta probabilidad con dicho genotipo y/o fenotipo). La expresión "sonda de SNP" significa una sonda que es adecuada para detectar un SNP, más preferiblemente una sonda marcada, adecuada para la detección automatizada (como se describe más abajo).

45 La frase "**posición que corresponde a la posición X en SEC ID NO: Y**" indica que la secuencia descrita por SEC ID NO: Y es una secuencia de consenso. La secuencia correspondiente en una planta concreta (en la que se va a detectar la presencia o ausencia del SNP) será (en la mayoría de los casos) diferente a dicha secuencia de consenso. Sin embargo, en una realización preferida, se puede determinar la identidad de la secuencia en un alineamiento de dicha secuencia de consenso con dicha secuencia en dicha planta concreta. El alineamiento de secuencias es una forma de disponer las secuencias primarias de nucleótidos (por ejemplo, ADN) para identificar regiones de similitud que pueden ser una consecuencia de relaciones funcionales, estructurales o evolutivas entre

las secuencias. Las secuencias alineadas de los restos nucleotídicos se representan típicamente como filas en una matriz. Entre los restos se insertan saltos de manera que los restos con caracteres idénticos o similares se alinean en columnas sucesivas. Un alineamiento de secuencias se puede producir, por ejemplo, mediante el programa ClustalW o BLAST. Si dos secuencias en un alineamiento comparten un ancestro común, los desemparejamientos se pueden interpretar como mutaciones de punto, y los espacios como indels (esto es, mutaciones de inserción o supresión) introducidos en una o ambas stirpes en el momento desde que divergieron entre sí. En consecuencia, la secuencia en dicha planta concreta puede diferir como consecuencia de supresiones y mutaciones en longitud con la secuencia de consenso. Como consecuencia, también la posición absoluta de un SNP específico (según se mide desde el comienzo de la secuencia) puede diferir. Sin embargo, cuando se alinean de forma apropiada, esas posiciones todavía están emparejadas entre sí. La frase "posición que corresponde a la posición X en SEC ID NO: Y" indica este hecho, y de este modo significa que – aunque en la secuencia según se obtiene a partir de una planta concreta – la posición absoluta puede ser diferente, en el alineamiento con la secuencia de consenso ("Y") todavía se emparejará en la posición indicada ("X").

La expresión "**ensayo de SNP**" significa cualquiera de los métodos conocidos en la técnica que es adecuado para detectar o visualizar un polimorfismo de un solo nucleótido. Estos métodos se pueden basar por ejemplo en la hibridación. Se han desarrollado diversas aplicaciones que interrogan los SNP hibridando sondas de ADN complementario al sitio del SNP (Rapley y Harbron, 2004). Tales métodos incluyen hibridación dinámica específica de alelo (DASH). Otros métodos para la detección de SNP incluyen el uso de haces moleculares que usan una sonda oligonucleotídica monocatenaria específicamente manipulada mediante ingeniería que comprende un fluoróforo y un extintor de la fluorescencia (Abravaya et al., 2003). Los SNP también se pueden detectar mediante chips de SNP oligonucleotídicos de alta densidad que comprenden cientos de miles de sondas dispuestas en un pequeño chip, que permiten que se interroge simultáneamente un gran número de los SNP (Rapley y Harbron, 2004). Además, se ha empleado un amplio intervalo de enzimas, incluyendo ADN ligasa, ADN polimerasa y nucleasas, para generar métodos de genotipado de SNP de alta fidelidad. Otro método se basa en el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP). Se han desarrollado diversos métodos de detección de SNP basados en PCR. Tales métodos incluyen el ARMS-PCR de tetracebadores, que emplea dos pares de cebadores para amplificar dos alelos en una reacción de PCR. La Flap endonucleasa (FEN) es una endonucleasa que cataliza la escisión específica de estructuras. Esta escisión es muy sensible a desemparejamientos, y se puede usar para interrogar los SNP con un grado elevado de especificidad (Olivier, 2005). En el ensayo invasor básico, se combina una FEN denominada escindasa con dos sondas oligonucleotídicas específicas, que junto con el ADN diana pueden formar una estructura tripartita reconocida por la escindasa (Olivier, 2005).

La extensión del cebador es un proceso de dos etapas que implica en primer lugar la hibridación de una sonda a las bases inmediatamente en dirección 5' del nucleótido de SNP, seguido de una reacción de "minisequenciación", en la que la ADN polimerasa extiende el cebador hibridado añadiendo una base que es complementaria al nucleótido del SNP. Esta base incorporada se detecta y determina el alelo de SNP (Syvanen, 2001; Rapley Y Harbron, 2004). El ensayo Illumina Incorporated's Infinium es un ejemplo de una tubería de genotipado de genoma completo que se basa en un método de extensión del cebador. En el ensayo Infinium, se pueden genotipar alrededor de 100.000 SNP. El ensayo usa nucleótidos marcados con haptenos en una reacción de extensión del cebador (Gunderson et al., 2006). El ensayo de ligasa oligonucleotídica utiliza ADN ligasa, que cataliza la ligación del extremo 3' de un fragmento de ADN al extremo 5' de un fragmento de ADN directamente adyacente. Este mecanismo se puede usar para interrogar un SNP hibridando dos sondas directamente sobre el sitio polimórfico de SNP (Rapley y Harbron, 2004).

En el contexto de la presente invención, lo más preferido es el uso del ensayo TaqMan® para la detección de los SNP. La expresión "ensayo TaqMan®" significa en general un método de PCR en tiempo real cuantitativo que usa una sonda fluorógena doblemente marcada (sonda TaqMan; Heid et al., 1996). La PCR en tiempo real de TaqMan mide la acumulación de un producto vía el fluoróforo durante las etapas exponenciales de la PCR, en lugar de en el punto final como en la PCR convencional. El incremento exponencial del producto se usa para determinar el ciclo umbral, C_T , es decir, el número de ciclos de PCR al que se detecta un incremento exponencial significativo en la fluorescencia, y que está directamente correlacionado con el número de copias de un molde de ADN presente en la reacción. Diferente de la PCR normal, en la PCR en tiempo real de TaqMan se añade una sonda a la reacción, es decir, un oligonucleótido monocatenario complementario a un segmento de 20-60 nucleótidos dentro del molde de ADN y localizado entre los dos cebadores. A los extremos 5' y 3' de la sonda, respectivamente, se unen covalentemente un informador fluorescente o fluoróforo (por ejemplo, 6-carboxifluoresceína, cuyo acrónimo es FAM, o tetraclorofluoresceína, cuyo acrónimo es TET) y un extintor (por ejemplo, tetrametilrodamina, cuyo acrónimo es TAMRA, o "ligante de surco

menor" tripeptídico dihidrociclopirroloindólico, cuyo acrónimo es MGB) (Kutyavin, 2000). La estrecha proximidad entre el fluoróforo y el extintor unidos a la sonda inhibe la fluorescencia del fluoróforo. Durante la PCR, a medida que comienza la síntesis del ADN, la actividad de la 5' a 3' isonucleasa de la Taq polimerasa degrada aquella proporción de la sonda que se ha emparejado al molde. La degradación de la sonda libera al fluoróforo de ella y rompe la estrecha proximidad al extintor, aliviando así el efecto de extinción y permitiendo la fluorescencia del fluoróforo. Por tanto, la fluorescencia detectada en el ciclador térmico de PCR en tiempo real es directamente proporcional al fluoróforo liberado y a la cantidad de molde de ADN presente en la PCR.

Más específicamente para la detección de SNP, en el ensayo de Taqman para el genotipado de SNP se usa la actividad de la 5' nucleasa de la Taq ADN polimerasa. El ensayo de Taqman se realiza concurrentemente con una reacción de PCR, y los resultados se pueden leer en tiempo real a medida que transcurre la reacción de PCR (McGuigan y Ralston, 2002). El ensayo requiere cebadores directos e inversos de PCR que amplificarán una región que incluye el sitio polimórfico de SNP. La discriminación alélica se logra usando FRET combinado con una o dos sondas específicas de alelos (las sondas de SNP preferidas, tales como las sondas 1, 2, 3 ó 4 de SNP de la presente invención) que se hibridan al sitio polimórfico de SNP. Las sondas (por ejemplo, las sondas 1, 2, 3 ó 4 de SNP de la presente invención) tendrán preferiblemente un fluoróforo ligado al extremo 5' de su secuencia central de ácido nucleico, y una molécula extintora ligada a su extremo 3'. Aunque la sonda está intacta, el extintor permanecerá en estrecha proximidad al fluoróforo, eliminando la señal del fluoróforo. Durante la etapa de amplificación de PCR, si la sonda específica del alelo es perfectamente complementaria al alelo de SNP, se unirá a la hebra de ADN diana y entonces se degradará por la actividad de la 5' nucleasa de la Taq polimerasa a medida que extiende el ADN a partir de los cebadores de PCR. La degradación de la sonda da como resultado la separación del fluoróforo de la molécula extintora, generando una señal detectable. Si la sonda específica del alelo no es perfectamente complementaria, tendrá una menor temperatura de fusión y no se unirá tan eficazmente. Esto evita que la nucleasa actúe sobre la sonda (McGuigan y Ralston, 2002). El ensayo de Taqman se basa en PCR, y es relativamente simple de implementar. El ensayo de Taqman se puede multiplicar combinando la detección de hasta siete SNP en una reacción. (Syvanen, 2001). Véase también Affymetrix (2007) Genome-Wide Human SNP Array 5.0. [en línea] Dirección: http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/genome_wide/genome_wide_snp_5.affx (recuperado el 27 de febrero de 2007). Existen y se describen reactivos y protocolos detallados para la detección de SNP a base de TaqMan (documento US 5.876.930; Livak et al., 1995; Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol; Part Number 4312214 Rev. C 5/2005; Applied Biosystems).

Ensayos de detección de SNP adicionales son bien conocidos por la persona experta en la técnica, y se basan en propiedades físicas de ADN, polimorfismo de conformación monocatenaria, empleo de electroforesis en gel con gradiente de temperatura, o cromatografía de líquidos de altas prestaciones desnaturalizante, fusión de alta resolución de todo el amplicón, o secuenciación.

La expresión "**fragmento de PCR**" significa un fragmento de ácido nucleico (preferiblemente un fragmento de ADN) obtenido de la amplificación de un ADN diana (por ejemplo, un ADN genómico) utilizando uno o más cebadores, una ADN polimerasa (preferiblemente una ADN polimerasa térmicamente estable) y uno o más ciclos de amplificación. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de bioquímica y biología molecular para amplificar exponencialmente ADN vía replicación enzimática. Puesto que la PCR es una técnica *in vitro*, se puede llevar a cabo sin restricciones sobre la forma de ADN, y se puede modificar ampliamente para llevar a cabo un amplio conjunto de manipulaciones genéticas.

La expresión "**peso molecular aparente**" significa el peso molecular de una molécula (por ejemplo, un fragmento de ADN según se mide en comparación con un patrón de peso molecular. Por ejemplo, el peso se puede medir mediante electroforesis en gel (por ejemplo, agarosa o gel de poliacrilamida) (en geles de perlas planas, capilares o de otro modo como se conoce en la técnica). Preferiblemente, la determinación del peso molecular se lleva a cabo usando un secuenciador de ADN y, como patrón, sondas marcadas para fluorescencia. Más específicamente, como se usa en el contexto de la presente invención, el peso molecular aparente significa el peso determinado en comparación con el patrón de tamaño GeneScan™ 500 ROX™ (un patrón de tamaño marcado con colorante ROX™ para el tamaño reproducible de datos de análisis de fragmentos) usando un analizador de ADN 3700 o equivalente. El GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard se diseña para medir fragmentos de ADN en el intervalo de 35-500 nucleótidos, y proporciona 16 fragmentos marcados monocatenarios de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 nucleótidos. La curva de tamaños generada a partir de estos fragmentos cortos hace al GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard ideal para una variedad de aplicaciones de análisis de

fragmentos tales como microsatélites, polimorfismos de longitud de fragmentos y cuantificación fluorescente relativa. Cada uno de los fragmentos de ADN se marca con el fluoróforo ROX™ que da como resultado un único pico cuando se ejecuta en condiciones desnaturalizantes.

5 En otra realización preferida, el alelo Ms, el alelo ms, y/o el fenotipo estéril masculino se caracterizan además por estar localizados en el cromosoma N7 de *Brassica napus*, preferiblemente entre las secuencias de marcadores NR1116 (por ejemplo, SEC ID NO: 21) y NR2525 (por ejemplo, SEC ID NO: 22), más preferiblemente con una distancia de 2,8 cM a NR1116 y 6,0 cM a NR2525, incluso más preferiblemente entre los marcadores de SNP SR0002A y SR0003B, lo más preferible con una distancia de aproximadamente 2,8 cM a SR0002A y 3,3 cM a SR0003B.

10 La expresión “**secuencia del marcador NR1116**” significa la secuencia como se describe mediante SEC ID NO: 21 y sus variantes que

- i) tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con, o
- ii) se hibridan en condiciones restrictivas a, o
- iii) comprenden al menos 25 nucleótidos consecutivos de

15 la secuencia como se describe mediante SEC ID NO: 21.

La expresión “**secuencia del marcador NR2525**” significa la secuencia como se describe mediante SEC ID NO: 22 y sus variantes que

- i) tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con, o
- ii) se hibridan en condiciones restrictivas a, o
- iii) comprenden al menos 25 nucleótidos consecutivos de

20 la secuencia como se describe mediante SEC ID NO: 22.

La expresión “**marcador de SNP SR0002A**” significa el fragmento que comprende una mutación de SNP según se amplifica mediante el par de cebadores descrito por las SEC ID NO: 8 y 10, que – preferiblemente – da para el alelo fértil una señal negativa en un ensayo de SNP (preferiblemente un ensayo de SNP a base de TaqMan®) que usa la Sonda 1 de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 12 (sonda específica del alelo estéril HiNK6701), y – preferiblemente – una señal positiva usando la Sonda 2 de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 11 (sonda específica del alelo fértil HiNK6700) (y viceversa para el alelo estéril).

30 La expresión “**marcador de SNP SR0003B**” significa el fragmento que comprende una mutación de SNP según se amplifica mediante el par de cebadores descrito por las SEC ID NO: 15 y 16, que – preferiblemente – da para el alelo fértil una señal negativa en un ensayo de SNP (preferiblemente un ensayo de SNP a base de TaqMan®) que usa la Sonda 3 de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 17 (sonda específica del alelo estéril HiNK6775), y – preferiblemente – una señal negativa usando la Sonda 3 de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 18 (sonda específica del alelo fértil HiNK6776) (y viceversa para el alelo estéril).

De este modo, el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) está ligado en forma homocigota a un fenotipo estéril masculino que

- 40 - se puede restaurar a fertilidad cruzándolo con cualquier planta que comprenda al menos un alelo Rf funcional dominante (alelo restaurador), y
- se puede mantener cruzándolo con plantas derivadas de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 (línea mantenedora),

en el que dicho alelo Ms se selecciona del grupo que consiste en

- 45 a) el alelo Ms según se puede obtener a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
- b) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica (es decir, con respecto a la esterilidad masculina).

Más preferiblemente, dicho alelo Ms es el alelo Ms, que en la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 está ligado y/o asociado con una o más características seleccionadas del grupo que consiste en:

- I. un fenotipo de aborto de la yema en una planta con un fenotipo condicionalmente estéril masculino conferido por el alelo Ms,
- II. uno o más de los marcadores seleccionados del grupo de marcadores del gen MS (como se define anteriormente) en plantas tanto fértiles masculinas como estériles masculinas que comprenden al menos una copia del alelo Ms,
- III. un fenotipo de pétalos con rayas blancas o manchas blancas en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms,

o una variante de dicho alelo Ms, que muestra un fenotipo condicionalmente estéril masculino con las mismas propiedades restauradoras.

En consecuencia, en una realización preferida, la planta de *Brassica napus* estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf es homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) ligado a un fenotipo estéril masculino, que

- se puede restaurar a la fertilidad cruzándola con cualquier planta que comprenda al menos un alelo Rf funcional dominante (restaurador), y
- se puede mantener cruzándola con plantas derivadas de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 (mantenedora),

en la que dicho alelo Ms se selecciona del grupo que consiste en

- a) el alelo Ms según se obtiene a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
- b) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica (es decir, esterilidad masculina).

Mientras que el ligamiento al marcador del alelo Ms (característica II. como se define anteriormente) está presente tanto en las plantas fértiles masculinas como las estériles masculinas que comprenden el gen Ms (es decir, independientemente de la presencia o ausencia del alelo Rf), las propiedades fenotípicas de aborto de la yema y pétalos con rayas blancas o manchados de blanco (característica I. y III., respectivamente) sólo son observables en el fenotipo estéril masculino (es decir, en presencia del alelo Rf). Esta observación permite así una discriminación fácil de plantas estériles masculinas y fértiles masculinas.

Se ha de entender que aunque en la semilla depositada el alelo Ms está ligado a un marcador del alelo Ms (característica II. como se define anteriormente) y/o a las propiedades fenotípicas de aborto de la yema y/o pétalos con rayas blancas o manchados de blanco (característica I. y III., respectivamente), puede haber algunas circunstancias en las que dicho ligamiento se puede perder o se rompe intencionadamente o no intencionadamente durante un programa de reproducción. La probabilidad de romper dicho ligamiento depende de la distancia del marcador al alelo Ms. Es bien sabido por la persona experta en la técnica cómo romper el ligamiento entre un marcador y un gen ligado. Sin embargo, es posible mediante análisis de marcadores adicionales, análisis de fenotipos, y/o experimentos de hibridación, demostrar la identidad del alelo Ms en tales líneas modificadas con el alelo Ms en la semilla depositada. Para el fenotipo de pétalos con rayas blancas o manchados de blanco (característica III.), no está nada claro si está causado directamente por el alelo Ms o por un gen estrechamente ligado al mismo. Hay ciertas líneas en las que este fenotipo no se puede observar o no está claramente expresado. Sin embargo, también se sabe que tales fenotipos pueden ser enmascarados por otros fenotipos tales como la expresión con nivel elevado de carotenoides en pétalos. Hasta ahora, no se ha encontrado segregación del fenotipo estéril masculino ni del fenotipo de aborto de la yema (característica I.). Como consecuencia, es probable que este fenotipo esté estrechamente ligado a o directamente provocado por el alelo Ms.

El término “**variante**”, cuando se usa con respecto al alelo Ms o ms, significa variaciones genéticas que preferiblemente no afectan a la funcionalidad del alelo Ms pero que pueden afectar a su secuencia. Durante la propagación de la línea original (por ejemplo, la línea de Takagi original), puede ocurrir que se produzcan en la secuencia genética del alelo Ms sin afectar a su función ciertos polimorfismos de secuencia o variaciones somaclonales. Tales variaciones pueden estar en regiones

funcionalmente no relevantes del gen, tales como intrones. Preferiblemente, la identidad genética de una variante del alelo Ms y/o del alelo ms es mayor que 90%, preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 98%, en comparación con el alelo Ms según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 o el alelo ms según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481. De otro modo, una variante preferiblemente todavía se hibrida en condiciones restrictivas (preferiblemente condiciones restrictivas medias, más preferiblemente condiciones restrictivas elevadas) con el alelo Ms según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480. Puesto que no se puede descartar (de hecho, es probable) que el alelo Ms sea una copia disfuncional del alelo ms (que puede presentar un gen funcional implicado en el desarrollo del polen o de anteras en *Brassica napus*), el término variante, con respecto al alelo Ms, también comprende otras formas disfuncionales del alelo ms (o una variante del mismo como se define anteriormente), en tanto que se puedan mantener en esterilidad por la línea mantenedora según se deposita con el Número de Depósito NCIMB 41481. Tales variaciones pueden variar del alelo Ms según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, por ejemplo mediante mutaciones diferentes, supresiones, truncamientos, etc.

El término “variante”, cuando se usa con respecto al alelo Ms o ms, también se refiere a variantes de los alelos Ms o ms que cartografían en la misma región que el alelo Ms o ms descrito d, es decir, la variante también está siendo localizada en el cromosoma N7 de *Brassica napus*, preferiblemente entre las secuencias de marcadores NR1116 (por ejemplo, SEC ID NO: 21) y NR2525 (por ejemplo, SEC ID NO: 22), más preferiblemente con una distancia de 2,8 cM a NR1116 y 6,0 cM a NR2525, respectivamente, incluso más preferiblemente entre los marcadores de SNP SR0002A y SR20003B, lo más preferible con una distancia de aproximadamente 2,8 cM a SR0002A y 3,3 cM a SR20003B, respectivamente. Este tipo de variante también se hibrida preferiblemente en condiciones restrictivas (preferiblemente condiciones medias de restricción, más preferiblemente condiciones elevadas de restricción) con el alelo Ms según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480. Preferiblemente, la variante del alelo Ms o ms muestra un fenotipo condicionalmente estéril masculino con las mismas propiedades restauradoras como se describen anteriormente para el alelo Ms.

1.2 El alelo rf y su fenotipo

Las expresiones “alelo mantenedor”, “alelo restaurador disfuncional” o “alelo rf” significan la ausencia del alelo restaurador funcional (alelo Rf) y – más específicamente – un alelo rf según se obtiene de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 y/o 41481 y sus variantes. Este alelo rf está ligado preferiblemente a y se caracteriza por las propiedades fenotípicas de

- a) no es capaz de devolver a la fertilidad al fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms, y
- b) es capaz de mantener el fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms.

Se ha de entender que aunque el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf, o rf) es obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 y/o 41481, pueden existir otras fuentes a partir de las cuales se puede obtener dicho alelo rf.

En una realización preferida de la presente invención, la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 o la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, se usan para obtener el alelo mantenedor (alelo rf).

En una realización adicional preferida de la presente invención, el alelo mantenedor (alelo rf) también se puede obtener a partir de semilla producida por la Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) en Alemania basándose en su sistema MSL. Los ejemplos de tales semillas incluyen, pero no se limitan a, semillas de las líneas Joker, Pronto, Panther, Artus, Baldur, Elan, Marcant, Mendel, Talent, Taurus, Tenno, Titan, Trabant, Zeppelin, Visby, Horus, y Siesta. Otros ejemplos de semillas a partir de las cuales se puede obtener el alelo mantenedor (alelo rf) incluyen, pero no se limitan a, semillas como Alkido, Mika, Fangio, Elektra, y Libretto. Además, el alelo mantenedor (alelo rf) también se puede obtener a partir de semilla producida por Syngenta (o una de sus filiales), tal como, por ejemplo, a partir de semillas de las líneas NK Petrol, NK Karibik, NK Speed, NK Octans, NK Kick, NK Technik, NK Picolo, NK Caravel.

El alelo mantenedor (alelo rf) está ligado a un fenotipo que mantiene la esterilidad masculina, el cual en una forma homocigota permite que sea expresado el fenotipo estéril masculino

provocado por el Ms. Dicho fenotipo que mantiene la esterilidad masculina se puede invertir mediante al menos un alelo Rf dominante funcional. Dicho alelo Rf se puede obtener a partir de cualquier germoplasma no basado en Takagi. No se conocen líneas, aparte de un germoplasma derivado del germoplasma de Takagi, que no comprendiese al menos una copia funcional del alelo Rf. Como consecuencia, se encuentra que virtualmente todas las líneas de colza disponibles hasta la fecha de la invención son líneas restauradoras.

En otra realización preferida de la presente invención, el alelo rf, el alelo Rf, y/o el fenotipo que mantiene la esterilidad masculina se caracterizan además por estar localizados en el cromosoma N19 de *Brassica napus*, preferiblemente entre las secuencias de los marcadores NR2219 (por ejemplo, SEC ID NO: 23) y NR3454 (por ejemplo, SEC ID NO: 26), más preferiblemente con una distancia de 10,2 cM a NR2219 y 26,5 cM a NR3454, lo más preferible entre las secuencias de los marcadores NR3454 (por ejemplo, SEC ID NO: 26) y PUT-161a-*Brassica napus*-59218 (por ejemplo, SEC ID NO: 31), más preferiblemente con una distancia de 26,5 cM a NR3454 y 4,1 cM a PUT-161a-*Brassica napus*-59218.

La expresión “**secuencia del marcador NR2219**”, como se usa aquí, significa la secuencia como se describe mediante SEC ID NO: 23 y sus variantes la cual

i) tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con, o

ii) se hibrida en condiciones restrictivas a, o

iii) comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de

la secuencia descrita por SEC ID NO: 23.

La expresión “**secuencia del marcador NR3454**”, como se usa aquí, significa la secuencia como se describe mediante SEC ID NO: 26 y sus variantes la cual

i) tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con, o

ii) se hibrida en condiciones restrictivas a, o

iii) comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de

la secuencia descrita por SEC ID NO: 26.

La expresión “**secuencia del marcador PUT-161 a-*Brassica napus*-59218**”, como se usa aquí, significa la secuencia como se describe mediante SEC ID NO: 31 y sus variantes la cual

i) tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con, o

ii) se hibrida en condiciones restrictivas a, o

iii) comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de

la secuencia descrita por SEC ID NO: 31.

De este modo, el alelo mantenedor (alelo rf) está ligado en una forma homocigota a un fenotipo que mantiene la esterilidad masculina, el cual

a) no es capaz de restaurar la fertilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms,

b) es capaz de mantener la esterilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms,

en el que dicho alelo rf se selecciona del grupo que comprende

a) el alelo rf según se obtiene a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y

b) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica con respecto a la restauración de y al mantenimiento de la esterilidad masculina conferida por el alelo Ms.

En otra realización preferida de la presente invención, el fenotipo que mantiene condicionalmente la esterilidad masculina y/o el alelo rf está ligado y/o asociado a uno o más marcadores seleccionados del grupo (“**grupo de marcadores del alelo rf**”) que consiste en los

marcadores de SSR que consisten en un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 240,8 (+/- 0,4) pb que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen las secuencias como se describen por las SEC ID NO: 19 y 20. Consiguientemente, en una realización preferida, la planta de *Brassica napus* con el genotipo MsMsrfrrf o msmsrfrf es homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) ligado en una forma homocigota a un fenotipo que mantiene la esterilidad masculina el cual

- no es capaz de restaurar la fertilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms,
- es capaz de mantener la esterilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms,
- está ligado a uno o más marcadores seleccionados del grupo de marcadores del alelo rf (como se define anteriormente),

en el que dicho alelo rf se selecciona del grupo que consiste en

a) el alelo rf según se obtiene a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y

b) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica.

En el contexto de la presente invención, una planta de *Brassica napus* con el genotipo msmsrfrf se denomina como “mantenedora” o “planta mantenedora”.

El término “**variante**”, cuando se usa con respecto al alelo rf o Rf, significa variaciones genéticas que preferiblemente no afectan a la funcionalidad del alelo rf pero que pueden afectar a su secuencia. Durante la propagación de la línea original (por ejemplo, la línea de Takagi original), puede ocurrir que se produzcan en la secuencia genética del alelo rf sin afectar a su función ciertos polimorfismos de secuencia o variaciones somaclonales. Tales variaciones pueden estar en regiones funcionalmente no relevantes del gen, tales como intrones. Preferiblemente, la identidad genética de una variante del alelo rf y/o del alelo Rf es mayor que 90%, preferiblemente mayor que 95%, más preferiblemente mayor que 98%, en comparación con el alelo rf según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 o el alelo Rf según se obtiene de cualquier línea restauradora. De otro modo, una variante preferiblemente todavía se hibrida en condiciones restrictivas (preferiblemente condiciones restrictivas medias, más preferiblemente condiciones restrictivas elevadas) con el alelo rf según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480. Puesto que no se puede descartar (de hecho, es probable) que el alelo rf sea una copia disfuncional del alelo Rf (que puede presentar un gen funcional implicado en el desarrollo del polen o de anteras en *Brassica napus*), el término variante, con respecto al alelo rf, también comprende otras formas disfuncionales del alelo Rf (o una variante del mismo como se define anteriormente), en tanto que puedan mantener la esterilidad de una línea Ms estéril masculina según se deposita con el Número de Depósito NCIMB 41480. Tales variaciones pueden variar del alelo rf según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, por ejemplo, mediante diferentes mutaciones, supresiones, truncamientos, etc.

Como ya se afirma anteriormente, el término “variante”, cuando se usa con respecto al alelo rf o Rf, también se refiere a variantes de los alelos rf o Rf que cartografían en la misma región que el alelo rf o Rf descrito anteriormente, es decir, la variante también está siendo localizada en el cromosoma N19 de *Brassica napus*, preferiblemente entre las secuencias de marcadores NR2219 (por ejemplo, SEC ID NO: 23) y NR3454 (por ejemplo, SEC ID NO: 26), más preferiblemente con una distancia de 10,2 cM a NR2219 y 26,5 cM a NR3454, lo más preferible entre las secuencias de marcadores NR3454 (por ejemplo, SEC ID NO: 26) y PUT-161a-*Brassica napus*-59218 (por ejemplo, SEC ID NO: 31), más preferiblemente con una distancia de 26,5 cM a NR3454 y 4,1 cM a PUT-161a-*Brassica napus*-59218. Este tipo de variante también se hibrida preferiblemente en condiciones restrictivas (preferiblemente condiciones medias de restricción, más preferiblemente condiciones elevadas de restricción) con el alelo rf según se obtiene de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481. Preferiblemente, la variante del alelo rf o Rf muestra las mismas características fenotípicas como se describen anteriormente para el alelo rf o Rf.

1.3 Combinación preferida

Además, en una realización especialmente preferida, la invención se refiere a un método para producir o multiplicar semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf (adecuada como femenina prebásica estéril masculina para la producción de semilla híbrida de *Brassica napus*), comprendiendo dicho método las etapas de

a) proporcionar una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf^{rf}, genotipo el cual se puede obtener a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, en el que dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina es

- 5 i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) ligado a un fenotipo estéril masculino que se puede restaurar a fertilidad cruzándola con cualquier planta que comprenda al menos un alelo Rf funcional dominantes (gen restaurador), y que se puede mantener cruzándola con plantas derivadas de la semilla depositada con el
- 10 Número de Depósito NCIMB 41481 (mantenedora), y en la que dicho alelo Ms se selecciona del grupo que consiste en
- i) el alelo Ms obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
- ii) sus variantes, que tienen esencialmente la misma propiedad fenotípica (es decir, confiere un fenotipo nuclear condicionalmente estéril masculino),
- 15 y en la que dicho alelo Ms es preferiblemente el alelo Ms que en la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 está ligado a y/o asociado con una o más características seleccionadas del grupo que consiste en:
- I. un fenotipo de aborto de yema en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms,
- 20 II. la presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo de marcadores genéticos de MS (como se define anteriormente) en plantas tanto fértiles masculinas como estériles masculinas que comprenden al menos una copia del alelo Ms,
- III. un fenotipo de pétalos de rayas blancas o manchados de blanco en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms,
- 25 o una variante del mismo, que confiere un fenotipo nuclear condicionalmente estéril masculino (mantenible por la línea mantenedora (como se define anteriormente), pero restaurable a la fertilidad por cualquier planta que comprenda un alelo Rf; y de este modo que tiene la misma propiedad fenotípica esencial),
- 30 ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf), en el que dicho alelo mantenedor (alelo rf está ligado en una forma homocigota a un fenotipo que mantiene la esterilidad masculina que no es capaz de restaurar la fertilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms, y que es capaz de mantener la esterilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms, y en el que dicho alelo rf se selecciona del grupo que consiste en
- 35 I) el alelo rf según se obtiene de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 o 41481, y
- II) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica,
- y en la que dicho alelo rf es preferiblemente el alelo rf que en la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 está ligada y/o asociada con uno o más
- 40 marcadores seleccionados del grupo de marcadores del alelo rf (como se define anteriormente),
- o una variante de dicho alelo rf, que tiene esencialmente la misma propiedad fenotípica (es decir, mantiene el fenotipo nuclear condicionalmente estéril masculino conferido por el gen Ms),
- 45 iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C (preferiblemente menor que 25°C, más preferiblemente menor que 20°C, pero al menos a una temperatura que permite el crecimiento normal, tal como al menos 12°C, preferiblemente al menos 14°C, más preferiblemente al menos 16°C), y
- 50 iv. revertir a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C (preferiblemente entre 35°C y

43°C, más preferiblemente entre 37°C y 40°C, lo más preferible a alrededor de 39°C; preferiblemente con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí, y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente como se define aquí),

5 b) exponer a dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina antes y/o durante la floración durante al menos 4 horas (preferiblemente al menos 8 ó 12 horas, más preferiblemente al menos 24 ó 36 horas, incluso más preferiblemente al menos 48 ó 98 horas, lo más preferible al menos 112 horas) a una temperatura de alrededor de 35 a 43°C (preferiblemente alrededor de 36°C a alrededor de 42°C, más preferiblemente alrededor de 37°C a alrededor de 41°C, incluso más preferiblemente alrededor de 38°C a alrededor de 40°C, lo más preferible alrededor de 39°C), y

10 c) exponer la planta de *Brassica napus* tratada térmicamente condicionalmente estéril masculina obtenida en la etapa b) a una temperatura menor que 33°C (preferiblemente menor que 30°C, más preferiblemente menor que 28°C, incluso más preferiblemente a una temperatura entre 14°C y 25°C, lo más preferible entre 18°C y 20°C) hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas, y

15 d) permitir la autopolinización de las plantas de *Brassica napus* que tienen dichas flores fértiles masculinas obtenidas en la etapa c), dejar que se desarrollen las semillas, y cosechar la semilla de dicha línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrrf.

20 En el contexto de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrrf como se describe anteriormente se denomina como “femenina prebásica”.

1.4 La etapa de tratamiento térmico

25

La propagación de la línea estéril masculina femenina prebásica (genotipo MsMsrrf) se lleva a cabo con una inducción de la fertilidad inducida por calor.

30 En una realización preferida, el “intercambio” entre fenotipo predominantemente estéril masculino y predominantemente fértil masculino significa preferiblemente que no todas las plantas y/o no todas las flores en una planta individual tienen el mismo fenotipo (esterilidad/fertilidad). De este modo, se pueden producir en cierto grado en la misma planta flores fértiles y estériles en paralelo. Sin embargo, preferiblemente las plantas condicionalmente estériles masculinas de la presente invención (plantas femeninas prebásicas o básicas) tienen en una única planta hasta un grado de más de 80% (preferiblemente más de 90%, más preferiblemente más de 95%, incluso más preferiblemente más de 98%) de flores estériles masculinas a una temperatura menor que 30°C (lo más preferible, no muestran flores fértiles en sustancialmente todas las plantas), pero producen flores fértiles masculinas hasta un grado de más de 20% (preferiblemente más de 40%, más preferiblemente más de 60%, lo más preferible más de 80%) a una temperatura mayor que 35°C. La relación de flores fértiles masculinas a flores estériles masculinas se determina preferiblemente 1 a 2 semanas después de la terminación de la exposición térmica. Si se aplica calor durante alrededor de una semana, la relación se determina preferiblemente alrededor de 2 a 3 semanas después del comienzo de la exposición al calor. El fenotipo estéril masculino de una planta que comprende el alelo Ms (y no el alelo Rf) se puede revertir a un fenotipo fértil masculino mediante exposición a temperaturas elevadas de preferiblemente alrededor de 35 a 43°C (más preferiblemente entre 37°C y 40°C, lo más preferible a alrededor de 39°C). A una temperatura menor que 28°C, preferiblemente menor que 25°C, más preferiblemente 20°C antes y durante la floración, sólo hay un fenotipo estéril masculino. Sin embargo, a una temperatura mayor que 35°C antes y/o durante la floración, se desarrollan flores fértiles. Una relación óptima entre el desarrollo floral y la exposición al calor se encuentra a temperaturas de aproximadamente 39°C, es decir, el daño provocado por el estrés térmico inducido por la temperatura elevada es manejable por la planta, mientras que, por otro lado, se induce suficientemente el desarrollo de flor fértil masculina para obtener las relaciones de flores fértiles masculinas a flores estériles masculinas en la misma planta como se describe anteriormente. La exposición al calor se puede realizar en cámaras aclimatadas (Redeker Kaeltetechnik; D-32791 Lage, Alemania) con control de temperatura (tolerancia $\pm 1^\circ\text{C}$) y de humedad. En una realización preferida adicional, la exposición al calor se realiza en un compartimiento de invernadero, en el que se podría aplicar un régimen de temperatura similar. También se prefiere realizar el tratamiento térmico en el campo en túneles de plástico durante el período de vegetación, aplicándose la temperatura elevada por calefacción natural

o calefacción adicional con cualquier tipo de calefactor. Incluso es posible mantener las plantas estériles masculinas en el campo si el campo de crecimiento proporciona un nivel significativo de temperatura durante el período de floración.

El término “**exposición**”, con relación al tratamiento de temperatura elevada, significa un tratamiento con temperatura elevada, preferiblemente en condiciones de crecimiento de otro modo óptimas tales como humedad elevada (>80%), tratamiento con fertilizantes y de protección de las cosechas, etc. La exposición se lleva a cabo preferiblemente durante al menos 4 horas, preferiblemente durante al menos 8 ó 12 horas, más preferiblemente durante al menos 24 ó 36 horas, incluso más preferiblemente durante al menos 48 ó 96 horas, lo más preferible durante al menos 112 horas (“tiempo de tratamiento térmico”). El tiempo de tratamiento térmico puede ser continuo, o puede estar interrumpido con períodos a temperatura normal (ambiente) (preferiblemente a alrededor de 19°C a 22°C). Preferiblemente, el tiempo de tratamiento térmico se aplica durante un período de 1 a 14 días, más preferiblemente entre alrededor de 3 y 10 días, incluso más preferiblemente entre 4 y 9 días, o entre 5 y 8 días, lo más preferible durante alrededor de 7 días. Como se describe anteriormente, el tratamiento térmico no significa necesariamente un tratamiento a una temperatura elevada durante todo el tiempo. En una realización preferida de la presente invención, el tratamiento térmico para la fertilización de la femenina prebásica se lleva a cabo con una variación de temperatura diurna/temperatura nocturna para evitar el estrés excesivo por temperatura. Esto disminuye el estrés térmico en las plantas. Preferiblemente, durante el tiempo diurno, el calor se incrementa (como se define anteriormente), mientras que en el tiempo nocturno el calor se disminuye hasta una temperatura menor que 33°C, preferiblemente menor que 30°C, más preferiblemente menor que 28°C, incluso más preferiblemente hasta una temperatura entre 16 y 25°C, lo más preferible entre 19 y 22°C. Preferiblemente, el tiempo de tratamiento térmico se distribuye por igual a lo largo del período indicado anteriormente ajustándolo a un régimen de día:noche. La relación de día a noche está entre alrededor de 0,5:1 y alrededor de 3:1, preferiblemente desde alrededor de 1:1 hasta alrededor de 2,5:1, más preferiblemente desde alrededor de 1,2:1 hasta alrededor de 2,0:1, lo más preferible es alrededor de 1,8:1 (preferiblemente con una temperatura de día/noche de 39°C (temperatura diurna) a 21,5°C (temperatura nocturna)). En una realización preferida de la presente invención, el régimen de día:noche se regula mediante luz artificial en una cámara de tratamiento térmico/crecimiento. Preferiblemente, se usa luz diurna artificial de al menos 10000 lux.

Dependiendo de la temperatura y duración de la exposición, una planta puede comprender flores tanto fértiles como estériles. Sin embargo, si la exposición al calor se detiene antes del final del proceso de floración, se pueden desarrollar flores estériles masculinas adicionales además de las fértiles masculinas. Sin embargo, preferiblemente, la temperatura y la duración de la exposición se ajusta para producir plantas prebásicas con más de 30% (preferiblemente más de 50%) de flores fértiles masculinas.

Después de la exposición térmica y después de que se ha inducido el desarrollo de flores fértiles, las plantas se pueden transferir a condiciones “normales” (en general una temperatura menor que 28°C) - por ejemplo en invernaderos) y continuará el desarrollo de estas flores (aunque no se inducirán más flores fértiles, las yemas ya inducidas se abrirán como flores fértiles). Preferiblemente, la planta de *Brassica napus* tratada térmicamente se transfiere a un entorno con una temperatura menor que 33°C, preferiblemente menor que 30°C, más preferiblemente menor que 28°C, incluso más preferiblemente a una temperatura entre 16 y 25°C, lo más preferible entre 18°C y 20°C) hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas. Típicamente, las plantas se mantienen en estas condiciones durante alrededor de 5 a 14 días (preferiblemente 5 a 7 días) hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas. Las plantas prebásicas Ms fértiles masculinas así obtenidas se “autofecundan”, es decir, se dejan autopolinizar. Tal autopolinización se puede producir con o sin ingerencia humana. Sin embargo, es importante que no se produzca polinización cruzada con otras plantas de Brassica. En consecuencia, las plantas o las flores fértiles se mantienen aisladas de diferentes polinizadores. La autofecundación se puede incrementar, por ejemplo, mediante transferencia de polen mediada por cepillo u otros métodos conocidos en la técnica. Tras la polinización exitosa (autofecundación), las plantas “fertilizadas” tratadas térmicamente se pueden usar como una línea masculina (polinizador) en combinación con una línea no tratada térmicamente del mismo genotipo que la línea femenina estéril masculina. Como alternativa, la línea tratada térmicamente se puede emplear como una línea individual, es decir, que representa tanto la línea femenina como la masculina. Ambos procedimientos se entienden aquí como autopolinización basada en el antecedente genético idéntico. Tras la polinización, se deja que las plantas polinizadas desarrollen semillas maduras, que se cosechan como es conocido por la persona experta en la técnica y se almacenan para uso posterior (por ejemplo, para la producción de semilla femenina básica).

Se ha de señalar – y también es una realización preferida de la presente invención – que no

es necesario exponer a todas las plantas de la línea estéril masculina femenina prebásica (genotipo MsMsrrff) al calor para obtener polen de la línea estéril masculina femenina prebásica. A fin de obtener cantidades suficientes de polen, sólo una parte de las plantas de la línea estéril masculina femenina prebásica, o sólo algunas o unas pocas de estas plantas, se trata o se tratan con las temperaturas elevadas. Con el polen obtenido en las plantas tratadas, se polinizará el resto de las plantas de la línea estéril masculina femenina prebásica. El número de plantas que se han de exponer al calor a fin de obtener cantidades suficientes de polen es conocido por la persona experta en la técnica.

2. Producción de semilla básica

Principalmente, la línea femenina prebásica ya sería adecuada como línea femenina (estéril masculina) directamente para la producción de semilla híbrida. Sin embargo, aunque la multiplicación vía la etapa de tratamiento térmico se puede llevar a cabo en una mayor escala (ya sea en cámaras climatizadas o mediante crecimiento en condiciones naturales que proporcionan suficiente calor antes o durante la etapa de desarrollo de la floración para la inducción de la fertilidad masculina), es comercialmente menos atractiva debido a los costes adicionales que resultan del equipo especializado de las cámaras térmicas, o – en condiciones naturales – los rendimientos de semilla bajos y/o incontrolables.

Por lo tanto, es una contribución inventiva de la presente invención proporcionar una etapa de multiplicación del fenotipo, línea y semilla estériles masculinos, sin tratamiento térmico. Esto se puede lograr cruzando la línea femenina (estéril masculina) prebásica con una línea mantenedora, que no comprende el alelo Ms sino que sólo comprende el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; línea mantenedora; genotipo msmsrrff). Tal cruce da como resultado una línea que todavía es estéril masculina, pero comprende sólo una copia del alelo Ms. Este cruce de la femenina prebásica estéril masculina y la mantenedora como masculina se puede usar para proporcionar semilla básica estéril masculina (es decir, semilla de la femenina básica estéril masculina) a escala comercial.

De este modo, otra realización preferida de la presente invención se refiere a un método para producir semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrrff adecuada como femenina básica (estéril masculina) para la producción de semillas híbridas de *Brassica napus*), comprendiendo dicho método las etapas de

a) proporcionar como una planta femenina una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina (prebásica) con el genotipo MsMsrrff, genotipo el cual es obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, en el que dicha planta de *Brassica napus* femenina condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrrff es

i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y

iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y

iv. revierte a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C, y

b) proporcionar como una planta masculina una planta de *Brassica napus* mantenedora fértil masculina con el genotipo msmsrrff, genotipo el cual es obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, en el que dicha planta de *Brassica napus* con el genotipo msmsrrff es

i. homocigota para el alelo de fertilidad (alelo de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y

ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y

iii. predominantemente fértil masculina, y

- 5 c) permitir que la planta masculina de la etapa b) polinice a la planta femenina de la etapa a), dejando que se desarrolle la semilla (preferiblemente hasta madurez), y cosechando la semilla, en el que las semillas cosechadas se caracterizan porque son semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf (es decir, la planta femenina básica).

El alelo Ms y el alelo rf se definen como antes con las mismas preferencias que para la línea femenina prebásica. El alelo de fertilidad (gen de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms) se define más abajo.

- 10 En una realización preferida de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina proporcionada en la etapa (a) del método para producir semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf descrito anteriormente se caracteriza adicionalmente por ser

- 15 a. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura preferentemente menor que 25°C, más preferiblemente a una temperatura menor que 20°C, pero al menos a una temperatura que permita el crecimiento normal, tal como al menos 12°C, preferiblemente al menos 14°C, más preferiblemente al menos 16°C (subetapa iii. De la etapa a) anterior), y

- 20 b. revertir a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura preferiblemente entre 35°C y 43°C, más preferiblemente a una temperatura entre 37°C y 40°C, más preferiblemente a una temperatura de alrededor de 39°C; lo más preferible con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente, como se define aquí.

- 25 En una realización preferida de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina proporcionada en la etapa (b) del método para producir o multiplicar semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf descrito anteriormente tiene opcionalmente un contenido total de glucosinatos de no más de 25 µmoles por gramo (preferiblemente entre 1 y 22 µmoles, más preferiblemente entre 5 y 20 µmoles, lo más preferible entre 8 y 17 µmoles por gramo) de semilla secada al aire a 9% de humedad.

- 30 En una realización preferida del método para producir semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf adecuada como femenina básica (estéril masculina) para la producción de semilla híbrida de *Brassica napus*, la planta de *Brassica napus* (prebásica) condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrf usaba como planta femenina y proporcionada en la etapa a) se hace crecer a partir de la semilla que se ha producido usando el método descrito anteriormente para producir o multiplicar semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrf, es decir,

- 40 a) proporcionando una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrf, genotipo el cual está presente en la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, en la que dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina es

- i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

- 45 ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 4148 y,

- iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y

- 50 iv. revertir a una fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C, y

- b) exponer dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina durante al menos 4 horas a una temperatura mayor que 35°C, y

c) exponer la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina tratada térmicamente obtenida en la etapa (b) a una temperatura menor que 33°C hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas, y

5 d) permitir la autopolinización de las plantas de *Brassica napus* que tienen dichas flores fértiles masculinas obtenidas en la etapa (c), dejar que se desarrollen las semillas, y cosechar la semilla, en el que las semillas cosechadas se caracterizan porque son semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrrf.

10 Preferiblemente, la línea masculina y la línea (estéril masculina) femenina empleadas en la producción de la semilla femenina básica se basan en un antecedente genético idéntico. Más preferiblemente, dicha línea masculina y dichas líneas femeninas (estériles masculinas) se proporcionan mediante introgresión de los genes respectivos para el sistema híbrido en una línea de *Brassica napus* consanguínea, seguido de al menos un (preferiblemente 2, 3 ó 4) retrocruzamiento frente a dicha línea. Por ejemplo, la introgresión puede comprender uno o más métodos seleccionados de un grupo que consiste en el aislamiento y transformación, reproducción convencional, reproducción de pedigrí, cruzamiento, autopolinización, haploidía, tecnología de haploides dobles, rescate de embriones, descendencia de semilla individual, reproducción asistida por marcadores, mutagénesis inducida, y retrocruzamiento.

20 En una realización preferida de la presente invención, la producción de la semilla femenina básica se puede realizar haciendo crecer las plantas femenina (estéril masculina) y masculina respectivas en tiras alternas, en las que el polinizador (la línea fértil masculina) se descarta tras la polinización. Se prefieren buenas condiciones de polinización para un rendimiento suficiente en la línea femenina. La relación de madre a polinizador debería ser preferiblemente 2:1, 3:1, ó 4:1, siendo preferida 3:1. La relación se puede ajustar usando máquinas de siembra con un ajuste de 2/3. Son útiles 3 a 5 colmenas de abeja por hectárea si la producción se lleva a cabo en los campos.

25 Si se pretende producir semilla prebásica con un genotipo Msmsrrf uniforme, preferiblemente si se realiza en el campo, la producción de la semilla femenina básica se lleva a cabo en condiciones y/o localizaciones en las que la temperatura no aumenta más allá de 33°C, preferiblemente 30°C. Para colza de tipo invierno, que se planta a principios de primavera, esto no es normalmente crítico en la mayoría de las localizaciones. Para colza de tipo primavera (por ejemplo, cánola), se prefieren localizaciones con condiciones que tengan una temperatura más ambiental (Suecia, Canadá). Sin embargo, una producción a mayor temperatura no es desventajosa en esta etapa. Sólo provocaría - cuando se supera una temperatura de 35°C - que la línea femenina prebásica se pueda autopolinizarse, y que la semilla básica producida comprenda un cierto nivel de semilla prebásica. Sin embargo, tanto la semilla prebásica como la semilla básica son igualmente muy adecuadas para hacer crecer una planta femenina para la producción de semilla híbrida. En consecuencia, un control de la temperatura para la producción de la línea femenina básica es meramente opcional y está más ligado a un rendimiento de semilla elevado (lo que se consigue reducir a mayor temperatura) que a prevenir la fertilización de la femenina prebásica.

40 Para evitar la polinización cruzada con polen de plantas distintas de la línea mantenedora, el campo para la producción de la semilla básica se mantiene separado de otras plantas de *Brassica napus*, preferiblemente otras plantas de Brassica como tales. Las distancias de aislamiento son al menos 500 metros, preferiblemente 1 km, más preferiblemente 2 km, lo más preferible 5 km.

45 Se ha encontrado que las plantas femeninas (estériles masculinas) se retrasan en la floración en comparación con las plantas fértiles masculinas empleadas en estas etapas de producción. Por lo tanto, para permitir una polinización óptima, se prefiere sincronizar la floración de la planta masculina y la planta femenina (estéril masculina) mediante uno o más de los métodos seleccionados del grupo que consiste en:

50 i. podar la planta fértil masculina (es decir, la parte de floración) para retrasar la floración hasta la floración de la planta femenina (estéril masculina) (preferiblemente, la planta se poda inmediatamente después del comienzo de la floración aproximadamente 30 cm usando un cortador eléctrico o mecánico),

ii. tratar la planta de floración con productos químicos que retrasan el crecimiento y/o la maduración (tales como Folicur™, un fungicida con propiedades reguladoras del crecimiento), y

55 iii. retrasar la siembra del progenitor fértil masculino hasta tres semanas (es decir, las plantas masculinas (fértiles masculinas) se siembran hasta 3 semanas más tarde que las plantas

femeninas (estériles masculinas)).

Se prefiere que la producción de la semilla femenina básica y/o de la semilla híbrida se realice a una temperatura menor que 33°C, preferiblemente menor que 28°C, más preferiblemente menor que 25°C. El efecto de propagación desde la semilla prebásica a la semilla básica es en general aproximadamente 1:500 a 1:1000.

La planta (estéril masculina) femenina básica que resulta de este proceso es preferiblemente una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf, en la que dicha planta de *Brassica napus* (condicionalmente estéril masculina) femenina es

i. heterocigota para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y

iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y

iv. revierte a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C.

La planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf como se describe anteriormente se caracteriza además por ser

i. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración (véase iii. anterior) a una temperatura preferiblemente menor que 25°C, más preferiblemente a una temperatura menor que 20°C, pero al menos a una temperatura que permite el crecimiento normal, tal como al menos 12°C, preferiblemente al menos 14°C, más preferiblemente al menos 16°C, y

ii. por revertir a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura de preferiblemente entre 35°C y 43°C, más preferiblemente a una temperatura entre 37°C y 40°C, lo más preferible a una temperatura de alrededor de 39°C; preferiblemente con una exposición para el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente, como se define aquí (véase iv. anteriormente).

En una realización preferida de la presente invención, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf como se describe anteriormente se caracteriza además por tener un contenido total de glucosinolatos de no más de 25 µmoles por gramo de semilla secada al aire a 9% de humedad, preferiblemente entre 1 y 22 µmoles, más preferiblemente entre 5 y 20 µmoles, lo más preferible entre 8 y 17 µmoles por gramo.

El alelo Ms y el alelo rf son como se definen anteriormente con las mismas preferencias que para la línea femenina prebásica. El alelo de fertilidad (gen de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms) se define a continuación.

Preferiblemente, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf (es decir, la planta femenina básica) es

i. heterocigota para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) ligado a un fenotipo estéril masculino que se puede restaurar a la fertilidad mediante cruzamiento con cualquier planta que comprenda al menos un alelo Rf funcional dominante (restaurador), y se puede mantener mediante cruzamiento con plantas derivadas de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 (mantenedora), y en la que dicho alelo Ms se selecciona del grupo de selección del grupo que consiste en

I) el alelo Ms según se obtiene de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

II) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica (es decir, que confiere un fenotipo nuclear condicionalmente estéril masculino (mantenible por la línea mantenedora como se define anteriormente, pero restaurable a la fertilidad por cualquier planta que comprenda un alelo Rf)),

y en la que dicho alelo Ms está ligado y/o asociado preferiblemente con una o más características seleccionadas del grupo que consiste en:

- I. un fenotipo de aborto de yema en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms, y
 - II. uno o más marcadores seleccionados del grupo de marcadores del gen MS (como se define anteriormente) en plantas tanto fértiles masculinas como estériles masculinas que comprenden al menos una copia del alelo Ms, y
 - III. un fenotipo de pétalos de rayas blancas o manchados de blanco en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms,
- o una variante del mismo, que confiere un fenotipo nuclear condicionalmente estéril masculino (mantenible por la línea mantenedora (como se define anteriormente), pero restaurable a la fertilidad por cualquier planta que comprenda un alelo Rf; y de este modo que tenga la misma propiedad fenotípica esencial),
- ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf), en el que dicho alelo mantenedor (alelo rf) está ligado en forma homocigota a un fenotipo que mantiene la esterilidad masculina que no es capaz de restaurar la fertilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms, y que es capaz de mantener la esterilidad de una planta que comprende al menos un alelo Ms, y en el que dicho alelo rf se selecciona del grupo que consiste en
 - I) el alelo rf según se obtiene de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y
 - II) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica (es decir, mantienen el fenotipo nuclear condicionalmente estéril masculino conferido por el alelo Ms),
- y en la que dicho alelo rf es preferiblemente el alelo rf que en la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 está ligado a y/o asociado con uno o más marcadores seleccionados del grupo de marcadores del alelo rf (como se define anteriormente), o una variante de dicho alelo rf; que tiene esencialmente la misma propiedad fenotípica (es decir, mantiene el fenotipo nuclear condicionalmente estéril masculino conferido por el gen Ms),
- iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C (preferiblemente menor que 25°C, más preferiblemente menor que 20°C, pero al menos a una temperatura que permita el crecimiento normal, tal como al menos 12°C, preferiblemente al menos 14°C, más preferiblemente al menos 16°C), y
 - iv. revierte a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C (preferiblemente entre 35°C y 43°C, más preferiblemente entre 37°C y 40°C, lo más preferible a alrededor de 39°C; preferiblemente con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente como se define más abajo), y
 - v. que tiene opcionalmente un contenido total de glucosinolatos de no más de 25 µmoles por gramo de semilla secada al aire a 9% de humedad (preferiblemente entre 1 y 22 µmoles, más preferiblemente entre 5 y 20 µmoles, lo más preferible entre 8 y 17 µmoles por gramo).

Por otro lado, la planta heterocigota para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 es heterocigota para el alelo de fertilidad (alelo de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms). A continuación se proporciona una definición detallada.

- En una realización preferida de la presente invención, las semillas depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41480 se usan en un método para producir una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrft, es decir, la madre básica según la presente invención. En una realización preferida adicional de la presente invención, la semilla producida por la Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) en Alemania basando en su sistema MSL también se puede usar en un método para producir una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrft. Los ejemplos de tales semillas incluyen,

pero no se limitan a, semillas con las líneas Joker, Pronto, Panther, Artus, Baldur, Elan, Marcant, Mendel, Patent, Taurus, Tenno, Titan, Trabant, Zeppelin, Visby, Horus, y Siesta. Otros ejemplos de semillas que se pueden usar en un método para producir una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf incluyen, pero no se limitan a, semillas como Alkido, Mika, Fangio, Elektra, y Libretto. Además, también se pueden usar semillas producidas por Syngenta (o una de sus filiales), tales como, por ejemplo, a partir de semillas de las líneas NK Petrol, NK Karibik, NK Speed, NK Octans, NK Kick, NK Technik, NK Picolo, NK Caravel, en un método para producir una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsdrf.

Preferiblemente, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf es adecuada como una semilla femenina básica en un sistema de producción para semilla híbrida.

En una realización preferida, dicha planta femenina básica se usa en un proceso de producción de semillas híbridas. Preferiblemente, el antecedente genético de dicha planta femenina básica no es híbrido, más preferiblemente es consanguíneo. Otras realizaciones preferidas de la presente invención se refieren a los componentes vegetales empleados en el sistema de producción de semillas híbridas de la presente invención: la línea femenina prebásica, la línea mantenedora, la femenina básica, las plantas híbridas resultantes, y las semillas que crecen hasta dichas plantas.

La producción de semilla básica (es decir, la semilla que crece hasta plantas femeninas básicas) se realiza preferiblemente en el campo usando la línea femenina prebásica condicionalmente estéril masculina y la línea mantenedora fértil masculina. Preferiblemente, las dos líneas se plantan en tiras (como se describe por Sauermann y Lamp, 1997). Sólo se cosechan las semillas obtenidas en la línea prebásica femenina estéril masculina. La mantenedora se usa sólo como polinizador, y se elimina tras la floración y se desecha.

2.1. Línea mantenedora

La presente invención se refiere además a una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrfrf (también denominada como “mantenedora” en el contexto de la presente invención), genotipo el cual es obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, en la que dicha planta de *Brassica napus* fértil masculina es

i. homocigota para el alelo de fertilidad (alelo de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y

ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y

iii. predominantemente fértil masculina, y

iv. que tiene opcionalmente un contenido total de glucosinolatos de no más de 25 μ moles por gramo (preferiblemente entre 1 y 22 μ moles, más preferiblemente entre 5 y 20 μ moles, lo más preferible entre 8 y 17 μ moles por gramo) de semilla secada al aire a 9% de humedad que produce dicha planta.

El alelo rf es como se define anteriormente con las preferencias correspondientes.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 se usa para obtener una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrfrf (es decir, la línea mantenedora como se describe anteriormente), o para proporcionar el alelo de fertilidad (alelo ms como se describe más abajo en 2.2) y/o el alelo mantenedor (alelo rf como se describe anteriormente en 1.2) para uso en cualquiera de los métodos de la presente invención.

Un aspecto preferido además de la presente invención se refiere al uso de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 para mantener la esterilidad masculina condicional de semillas producidas en el método para producir semilla de una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf (es decir, la femenina prebásica de la presente invención) según la presente invención (es decir, el método como se describe en las secciones 1).

2.2 El alelo ms, su fenotipo y marcador asociados

Las expresiones “alelo ms”, alelo de fertilidad”, o “alelo de esterilidad masculina disfuncional” significan la ausencia del alelo de esterilidad masculina funcional (alelo Ms o gen Ms) y – más específicamente – un alelo ms según se obtiene de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 y variantes de dicho alelo que confieren esencialmente el mismo fenotipo (es decir, un fenotipo fértil masculino). Este alelo ms está preferiblemente ligado a y/o caracterizado por las propiedades fenotípicas de

a) no ser capaz de devolver a la fertilidad al fenotipo estéril masculino provocado por el alelo Ms, y

b) no ser capaz de conferir un fenotipo estéril masculino en ausencia de un alelo Ms.

Mientras que estas propiedades son únicas para el alelo ms, hay otras propiedades que están ligadas a o asociadas con el alelo ms. En una realización preferida de la presente invención, el alelo ms está ligado a uno o más marcadores (“marcador del alelo ms”) seleccionados del grupo (“grupo de marcadores del alelo ms”) que consiste en

I. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos (mutaciones) en la región del marcador NR1116 que consiste en

a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 85 en SEC ID NO: 3,

b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 87 en SEC ID NO: 3,

c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 139 en SEC ID NO: 3,

d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 214 en SEC ID NO: 3,

e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 218 en SEC ID NO: 3,

f) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 277 en SEC ID NO: 3,

g) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 286 en SEC ID NO: 3,

h) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 312 en SEC ID NO: 3,

i) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 319 en SEC ID NO: 3,

j) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 359 en SEC ID NO: 3,

k) la mutación de inserción 5'-TTGGTGAACAATC-3' en la posición correspondiente a 221 en SEC ID NO: 3,

l) la mutación de supresión 5'-GAA-3' en la posición que corresponde a 328-330 en SEC ID NO: 3,

II. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos (mutaciones) en la región del marcador NR2525 que consiste en

a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 60 en SEC ID NO: 6,

b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que

corresponde a la posición 92 en SEC ID NO: 6,

c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 105 en SEC ID NO: 6,

5 d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 158 en SEC ID NO: 6,

e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 431 en SEC ID NO: 6,

f) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 82 en SEC ID NO: 6,

10 g) la mutación de inserción 5'-TGAGCAAAA-3' en la posición que corresponde a 17 a 25 en SEC ID NO: 6,

III. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SNP que consiste en

15 a) una señal positiva en un ensayo de SNP que usa una sonda de SNP (sonda 2 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 11 (sonda específica del alelo fértil HiNK6700), y –preferiblemente- una señal negativa en un ensayo de SNP (preferiblemente un ensayo de SNP a base de TaqMan®) que usa una sonda de SNP (sonda 1 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 12 (sonda específica del alelo estéril HiNK6701), y

20 b) una señal positiva en un ensayo de SNP que usa una sonda de SNP (sonda 4 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 18 (sonda específica del alelo fértil HiNK6776), y –preferiblemente- una señal negativa en un ensayo de SNP (preferiblemente un ensayo de SNP a base de TaqMan®) que usa una sonda de SNP (sonda 3 de SNP) que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 17 (sonda específica del alelo estéril HiNK6775),

25 IV. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SSR que consiste en:

a) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente seleccionado del grupo de pesos moleculares aparentes que consiste en 94 (+/- 0,9) pb, 110,4 (+/- 0,5) pb, 112,3 (+/- 0,4) pb y 116,3 (+/- 0,4) pb, que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen la secuencia descrita como SEC ID NO: 1 y 2,

30 b) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 183,8 (+/- 0,4) pb o un fragmento de PCR asociado a un alelo no fértil que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen la secuencia descrita como SEC ID NO: 4 y 5, y

en los que el uno o más marcadores (marcador del alelo Ms) también incluyen una secuencia nucleotídica aislada seleccionada del grupo que consiste en secuencias las cuales

35 I. tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con, o

II. se hibridan en condiciones restrictivas con, o

III. comprenden al menos 25 nucleótidos consecutivos de

las secuencias marcadoras definidas anteriormente en I. a IV.

40 Preferiblemente, al menos hay 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ó 12 de las mutaciones del grupo I., más preferiblemente al menos las mutaciones en las posiciones que corresponden a la posición 214 (T/C) y 218 (T/G) en SEC ID NO: 3. Preferiblemente, hay al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7 de las mutaciones del grupo II., más preferiblemente al menos las mutaciones en la posición que corresponde a la posición 158 en SEC ID NO: 6. Se ha de señalar que los marcadores asociados con el alelo ms son – contrariamente al alelo Ms – mucho más diversos. Como consecuencia, puede haber una o más bandas con pesos moleculares aparentes diferentes como se indica anteriormente. La razón es bastante simple: mientras que el alelo Ms resulta de una fuente de germoplasma única que no se sometió a modificaciones genéticas subsiguientes frecuentes, el alelo ms es un “alelo natural” de *Brassica napus* que está presente en diferentes antecedentes genéticos, y su entorno genético se vio afectado por numerosas actividades de reproducción. De este modo, existe una variabilidad

45

significativamente mayor de los marcadores asociados.

Como ya se ha afirmado anteriormente, los marcadores se pueden usar en otros diversos aspectos de la presente invención. Sin embargo, estos aspectos de la presente invención no están limitados al uso de los marcadores como se describe en la Solicitud. Se enfatiza que estos aspectos también pueden hacer uso de marcadores no descritos explícitamente aquí o marcadores aún por identificar.

Además, se ha de entender que aunque el alelo de fertilidad (alelo de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms o ms) es obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, pueden existir otras fuentes a partir de las cuales se puede obtener dicho alelo ms. De hecho, la presencia del alelo ms es más bien una regla y no una excepción, y debería estar presente en virtualmente todo germoplasma de *Brassica napus* (distinto del germoplasma derivado del germoplasma de Takagi). En una realización preferida de la presente invención, la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 se usa para obtener el alelo de fertilidad (alelo ms como se define anteriormente).

El alelo de fertilidad (alelo de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms) en una forma homocigota está ligado a un fenotipo fértil masculino. En una forma heterocigota (es decir, en combinación con el alelo Ms), permite que el fenotipo estéril masculino provocado por el Ms sea expresado en presencia de un alelo rf homocigoto (rfrf; o – en otras palabras – en ausencia del alelo Rf). Dicho alelo ms está presente en cualquier germoplasma no basado en Takagi. No existen líneas conocidas distintas de un germoplasma derivado del germoplasma de Takagi que no comprenda al menos una copia funcional del alelo ms. De este modo, el alelo de fertilidad (alelo de fertilidad masculina disfuncional; alelo ms) está ligado en una forma homocigota a un fenotipo estéril masculino, en el que dicho alelo ms se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en

a) el alelo ms como está presente en la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y

b) sus variantes, que tienen la misma propiedad fenotípica.

En una realización preferida de la presente invención, dicha planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrfrf es adecuada como una línea mantenedora en el proceso de producción de semilla femenina básica de la presente invención. Otra realización se refiere al uso de dicha planta en un proceso de producción de semilla híbrida. Preferiblemente, el antecedente genético de dicha planta no es híbrido; más preferiblemente es consanguíneo.

3. Producción de semilla híbrida

Otra realización de la presente invención se refiere a un método para producir semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus*, comprendiendo dicho método las etapas de

a) proporcionar como una planta femenina una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf (madre básica) o MsMsrfrf (femenina prebásica), en la que dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina femenina es

i. heterocigota (madre básica) u homocigota (femenina prebásica) para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

ii. homocigota para el alelo restaurador disfuncional (alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y

iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y

iv. revertir a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C, y

b) proporcionar como una planta masculina una planta de *Brassica napus* fértil masculina ("línea restauradora" como se define más abajo) con el genotipo RfRf, en la que dicha planta de *Brassica napus* fértil masculina es

i. homocigota para el alelo restaurador funcional (alelo Rf), que es obtenible a partir de cualquier línea de *Brassica napus* fértil consanguínea comercializada como semilla para crecimiento, y

ii. predominantemente fértil masculina, y

- 5 c) permitir a la planta masculina de la etapa b) polinizar la planta femenina condicionalmente estéril masculina de la etapa a), dejar que se desarrolle la semilla, y cosechar dicha semilla híbrida fértil masculina.

10 En una realización preferida, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina proporcionada como planta femenina en la etapa a) del método para producir semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus* descrita anteriormente tiene el genotipo Msmsrfrf (es decir, es la madre básica como se describe aquí anteriormente). Como consecuencia de ello, la planta femenina proporcionada en la etapa a) es preferiblemente heterocigota para el alelo de esterilidad masculino (alelo Ms).

15 En una realización preferida adicional, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina proporcionada como planta femenina en la etapa a) del método para producir semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus* descrita anteriormente se caracteriza además por ser

20 I. Predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración (véase iii. En la etapa a) anterior) a una temperatura de preferiblemente menos de 25°C, más preferiblemente a una temperatura de menos 20°C, pero al menos una temperatura que permita el crecimiento normal, tal como al menos 12°C, preferiblemente al menos 14°C, más preferiblemente al menos 16°C, y

25 II. revertir a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura de preferiblemente entre 35°C y 43°C, más preferiblemente a una temperatura de entre 37°C y 40°C, lo más preferible a una temperatura de alrededor de 39°C; preferiblemente con una exposición durante el tiempo de tratamiento térmico preferido como se especifica aquí y un crecimiento subsiguiente a temperatura ambiente, como se define aquí (véase iv. en la etapa a) anterior).

30 En una realización adicional, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina proporcionada como planta femenina en la etapa a) del método para producir la semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus* descrita anteriormente se caracteriza además por tener un contenido total de glucosinolatos de no mas de 25 μ moles por gramo de semilla secada al aire a 9% de humedad, preferiblemente entre 1 y 22 μ moles, más preferiblemente entre 5 y 20 μ moles, lo más preferible entre 8 y 17 μ moles por gramo.

35 En una realización preferida del método para producir semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus*, la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf (madre básica) o MsMsrfrf (femenina prebásica) proporcionada como una planta femenina en la etapa a) se hace crecer a partir de una semilla que se ha producido usando uno de los métodos descritos anteriormente, tal como el método para producir o multiplicar semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrf para la femenina prebásica, que consiste en las etapas de

40 a) proporcionar una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrf, genotipo el cual está presente en la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, en el que dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina es

45 i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 4148, y

50 iii. predominantemente estéril y masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y

iv. revertir a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o

durante la floración a una temperatura mayor que 35°C, y

b) exponer dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina durante al menos 4 horas a una temperatura mayor que 35°C, y

5 c) exponer la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina tratada térmicamente obtenida en la etapa (b) a una temperatura menor que 33°C hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas, y

10 d) permitir la autopolinización de las plantas de *Brassica napus* que tienen dichas flores fértiles masculinas obtenidas en la etapa (c), dejar que se desarrollen las semillas, y cosechar la semilla, en el que las semillas cosechadas se caracterizan porque son semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf,rf,

15 o - para la madre básica - usando la realización preferida del método para producir semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf,rf descrito anteriormente, en el que la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina (prebásica) con el genotipo MsMsrf,rf usada como planta femenina y proporcionada en la etapa a) de este método se hace crecer a partir de la semilla que se ha producido usando el método descrito anteriormente para producir o multiplicar semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf,rf, es decir,

20 a) proporcionar una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf,rf, genotipo el cual está presente en la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, en el que dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina es

i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y

25 ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo restaurador disfuncional; alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 4148, y

iii. predominantemente estéril y masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y

30 iv. revertir a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C, y

b) exponer dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina durante al menos 4 horas a una temperatura mayor que 35°C, y

35 c) exponer la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina tratada térmicamente obtenida en la etapa (b) a una temperatura menor que 33°C hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas, y

d) permitir la autopolinización de las plantas de *Brassica napus* que tienen dichas flores fértiles masculinas obtenidas en la etapa (c), dejar que se desarrollen las semillas, y cosechar la semilla, en el que las semillas cosechadas se caracterizan porque son semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf,rf.

40 La expresión "línea restauradora" significa cualquier planta de *Brassica* (preferiblemente cualquier planta de *Brassica napus*) que es homocigota para el gen Rs (es decir, con un genotipo RfRf). Con respecto al gen Ms, tal planta puede tener cualquier combinación del alelo ms y Ms, aunque preferiblemente tiene un genotipo msms, puesto que éste es el fenotipo de alelo fértil "natural". Como consecuencia, la línea restauradora puede tener un genotipo seleccionado del grupo que consiste en msmsRfRf, MsmsRfRf, y MsMsRfRf. Preferiblemente, la línea restauradora es homocigota para el alelo de fertilidad (alelo de esterilidad masculina disfuncional; alelo ms), que preferiblemente es obtenible a partir de cualquier línea fértil consanguínea de *Brassica napus* comercializada como semilla para crecimiento, o a partir de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481.

50 En otra realización, la planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo RfRf proporcionada en la etapa b) del método para producir semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus* descrita anteriormente se caracteriza además por tener un contenido total de glucosinolatos de no más de 25 µmoles por gramo de semilla secada al aire a 9% de humedad, preferiblemente entre 1

y 22 μ moles, preferiblemente entre 5 y 20 μ moles, lo más preferible entre 8 y 17 μ moles por gramo.

En la realización más preferida, las semillas desarrolladas en la etapa c) se dejan desarrollar hasta madurez antes de cosecharlas.

5 En una realización menos preferida de la presente invención, la línea restauradora es una planta de *Brassica napus* fértil masculina masculina con el genotipo Rfrf, en la que la planta de *Brassica napus* fértil masculina es

i. heterocigota para el alelo restaurador funcional (alelo Rf), que es obtenible preferiblemente a partir de cualquier línea fértil consanguínea de *Brassica napus* comercializada como semilla para crecimiento, y

10 ii. predominantemente fértil masculina, y

iii. que tiene opcionalmente un contenido total de glucosinolatos de no más de 25 μ moles por gramo (preferiblemente entre 1 y 22 μ moles, más preferiblemente entre 5 y 20 μ moles, lo más preferible entre 8 y 17 μ moles por gramo) de semilla secada al aire a 9% de humedad.

15 En una realización preferida de la presente invención, la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 y/o NCIMB 41481, respectivamente, se usa en un método para producir semilla híbrida fértil de *Brassica napus* como se describe aquí.

20 Preferiblemente, la línea fértil masculina (línea mantenedora) y la línea estéril masculina femenina (madre básica o femenina prebásica, preferiblemente la madre básica) empleadas en la producción de la semilla híbrida se basan en antecedentes genéticamente diversos. La distancia genética se puede medir mediante el uso de marcadores moleculares como se describe, por ejemplo, en Knaak (1996).

25 En una realización preferida, la producción de la semilla híbrida según la presente invención se puede realizar haciendo crecer las plantas femenina (estéril masculina) y fértil masculina respectivas en tiras alternas, en las que el polinizador (la línea fértil masculina) se desecha tras la polinización. Se prefieren buenas condiciones de polinización para un rendimiento suficiente en la línea femenina. La relación de planta madre (femenina estéril masculina) y polinizador debería ser preferiblemente 3:1 y son útiles 3 a 5 colmenas de abeja por hectárea si la producción se lleva a cabo en los campos. Se prefiere la producción de semillas en tiras alternas para obtener niveles elevados de hibridación. No obstante, también es posible (aunque todavía no aceptado en algunos países) producir semilla híbrida mezclando la línea femenina (madre) y el polinizador (línea masculina). La ventaja de la producción mixta es una reducción de los costes de producción.

30 Se ha encontrado en el transcurso de la presente invención que las plantas fértiles masculinas son más tempranas en la floración en comparación con las plantas femeninas estériles masculinas empleadas en estas etapas de producción. Para permitir una polinización óptima, se prefiere por lo tanto que la planta fértil masculina se pade para retrasar la floración hasta la floración de la planta femenina estéril masculina. Se prefiere que la producción de la semilla femenina básica y/o semilla híbrida se lleve a cabo a una temperatura menor que 33°C, preferiblemente menor que 28°C, más preferiblemente menor que 25°C.

40 En una realización adicional preferida de la presente invención, la producción de la semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus* se lleva a cabo sin hacer uso de la autofecundación mediada por calor de las plantas estériles masculinas. En esta realización, las plantas fértiles masculinas con el genotipo MsmsRfrf se autofecundan como se conoce en la técnica. Las plantas con el genotipo MSmsRFRf se pueden obtener cruzando la femenina RHS con colza normal y autofecundando después identificando la presencia de los genes deseados con marcadores (tales como los marcadores de la presente invención). Estas plantas también se podrían obtener mediante retrocruzamiento y análisis de marcadores en cada generación, para mantener sólo aquellas plantas que son heterocigotas tanto para el gen Ms como para el gen Rf. Incluso es posible seleccionar plantas con el genotipo MsMsrfrf a partir de autofecundaciones mediadas por calor de plantas estériles masculinas (como se describe anteriormente para el desarrollo de RHS general), y cruzarlas con una variedad de línea de colza msmsRfRf normal. Estas dos líneas deberían ser casi isogénicas para obtener una línea pura para el desarrollo posterior. En la progenie que se segrega, se esperan plantas estériles masculinas (que tienen los genotipos Msmsrfrf y MsMsrfrf) y plantas fértiles masculinas (que tienen los fenotipos MsMsRfRf, MsmsRfRf, msmsRfRf, MsMsRfrf, MsmsRfrf, msmsRfrf, o msmsrfrf). Las plantas fértiles masculinas con los genotipos MsMSRFRf y msmsrfrf se obtienen mediante selección usando los marcadores moleculares estrechamente ligados como se describe aquí anteriormente.

Estas plantas se autofecundan como se conoce en la técnica.

Los descendientes de las plantas MsMsRfrf estériles masculinas se siembran en el campo como hembras en tiras alternas con los descendientes de las plantas msmsrfrf fértiles masculinas (denominadas aquí como mantenedoras). Las plantas en las tiras femeninas se segregarán en fenotipos fértiles masculinos que tienen los genotipos MsMsRfRf o MsMsRfrf, y los fenotipos estériles masculinos que tienen el genotipo MsMsrfrf en la relación de segregación 3 fértiles:1 estéril. Como ya se ha descrito anteriormente, las plantas estériles masculinas se caracterizan fenotípicamente por el aborto de las primeras yemas de la inflorescencia y por pétalos de rayas o manchas blancas. Además, las plantas estériles masculinas comienzan la floración significativamente más tarde que las plantas fértiles masculinas casi isogénicas. Estas diferencias fenotípicas permiten la eliminación de las plantas fértiles masculinas (que florecen de forma más temprana) antes del comienzo de la floración de las plantas estériles masculinas. La eliminación de las plantas fértiles masculinas completas se ha de realizar antes de que las plantas estériles masculinas comiencen a florecer, para evitar la polinización cruzada entre plantas fértiles masculinas (por ejemplo, las mantenedoras) y la planta estéril masculina en la producción híbrida que se originan ambas de la autofecundación de las plantas MsmsRfrf. La poda de las plantas fértiles masculinas no será suficiente, puesto que esto sólo retrasa la floración de las plantas fértiles masculinas y todavía permite la polinización cruzada indeseable mencionada antes. Una vez que las plantas fértiles masculinas se eliminan antes de la floración, las plantas estériles masculinas que quedan en el campo se polinizan por la planta restauradora fértil masculina (que se hace crecer preferiblemente en tiras alternas como se describe anteriormente) para la producción de semillas híbridas F₁. La semilla se obtiene sólo a partir de las plantas MSMSrfrf estériles masculinas que se hacen crecer en la tira femenina, y tendrá el genotipo Msmsrfrf; las plantas que se hacen crecer a partir de estas semillas serán estériles masculinas. Esta población completamente estéril masculina es un requisito previo para producir grandes cantidades de semilla híbrida. Sin embargo, este tipo de producción de la semilla básica requiere campos de pequeña escala, de forma que sea posible el desbaste de las plantas fértiles.

Dependiendo del polinizador usado para polinizar las plantas con el genotipo MsmsRfrf en el método descrito anteriormente, generalmente es posible producir (1) semilla de la madre básica (usando la mantenedora con el genotipo msmsrfrf como polinizador), o (2) semilla híbrida F₁ (usando la restauradora con el genotipo msmsRfRf como polinizador). Sin embargo, seguir este enfoque para la producción de semilla híbrida F₁ es menos eficaz puesto que se requieren grandes cantidades de semilla híbrida F₁. Sin tener a mano una madre estéril masculina pura, se han de seleccionar las plantas con el genotipo MsmsRfrf desechando el 75% de las descendencias completas (plantas fértiles masculinas), conduciendo a una gran pérdida de plantas productoras de semilla. De este modo, se prefiere generar una línea madre estéril masculina pura para la producción de semilla híbrida.

Al generar las plantas híbridas, se prefiere que tanto el progenitor femenino básico que es un cruce con un restaurador, y el propio restaurador, tengan un nivel de glucosinolatos que sea suficientemente bajo para asegurar que el grano (o semilla producida a partir del crecimiento) de las plantas híbridas F₁ tenga niveles de glucosinolatos dentro de los niveles normativos. El nivel de glucosinolatos de la semilla cosechada del híbrido F₁ es apenas la media (o ligeramente (por ejemplo, 10 a 20%) por debajo de la media) de los niveles de glucosinolatos tanto en el progenitor femenino como el progenitor masculino. El nivel de glucosinolatos del grano híbrido (F₂) refleja el genotipo del híbrido F₁. Por ejemplo, si el objetivo es obtener grano híbrido (F₂) que tiene un nivel de glucosinolatos menor que 25 µmoles/gramo (preferiblemente menor que 20 µmoles/gramo), y el progenitor fértil masculino (restaurador) tiene un nivel de glucosinolatos de 15 µmoles/gramo, el progenitor femenino tiene preferiblemente un nivel de glucosinolatos menor que 25 µmoles/gramo.

3.1 Líneas restauradoras y el alelo Rf

La expresión “alelo restaurador (funcional)”, o “alelo Rf” o “alelo mantenedor disfuncional”, significa el alelo que es capaz dominantemente de (es decir, el alelo Rf está ligado a y/o asociado con una o más características seleccionadas del grupo que consiste en)

- a) restaurar la fertilidad en las plantas F₁ obtenidas cruzándolas con la planta de *Brassica napus* que se hizo crecer a partir de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
- b) restaurar la fertilidad en las plantas F₁ obtenidas cruzándolas con la planta de *Brassica napus* que se hizo crecer a partir de la semilla obtenida a partir del cruce de la planta de *Brassica napus* obtenida de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480

como planta estéril masculina femenina y la planta de *Brassica napus* obtenida a partir de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 como planta fértil masculina.

El alelo Rf es obtenible a partir de cualquier germoplasma no basado en Takagi. No se conocen líneas de *Brassica napus* fértiles consanguíneas, aparte de un germoplasma derivado del germoplasma de Takagi, que no comprendan al menos una copia funcional del alelo Rf. Como consecuencia, se encuentra que virtualmente todas las líneas de *Brassica napus* fértiles consanguíneas disponibles hasta la fecha de la invención son líneas restauradoras (es decir, comprenden el alelo Rf).

De este modo, el alelo restaurador (alelo Rf) se selecciona del grupo que consiste en los alelos Rf obtenibles de cualquier línea de *Brassica napus* fértil consanguínea comercializada como semilla para crecimiento ("línea restauradora") (excluyendo cualesquiera líneas híbridas o líneas parentales de las mismas), preferiblemente de líneas comercialmente disponibles en la fecha de prioridad de la presente invención, más preferiblemente una línea seleccionada del grupo que consiste en Bounty, Cyclone, Delta, Ebony, Garrison, Impact, Legacy, Legend, Profit, Quantum, Campala, Pollen, Grizzly, Expert, Aviso, NK Jetix, Oase, Smart, NK Fair, NK Nemax, Ladoga, Cooper, Billy, Lorenz, Aurum, Lilian, Californium, Lisek, Orkan, Winner, Licorne, Castille, Fortis y líneas de *Brassica napus* fértiles consanguíneas que tienen las variedades mencionadas anteriormente en su pedigrí. Las líneas restauradoras adecuadas también incluyen aquella en la lista de variedad de OECD diciembre de 2006 (lista OECD de variedades susceptibles para certificación - 2006/2007; Dic. 2006; <http://www.oecd.org/dataoecd/1/44/3399947.pdf>; http://www.oecd.org/document/14/0,2340,en_2649_33909_2485070_1_1_1_1,00,html), preferiblemente líneas no híbridas comercializadas como semillas para crecimiento (para la producción de aceite), más preferiblemente aquellas que no están marcadas como "d" (consanguíneas en tanto que representan líneas parentales híbridas) o "b" (híbrida) en dicha lista de OECD.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de cualquier planta de *Brassica napus* consanguínea fértil comercializada como semilla para crecimiento para obtener el alelo restaurador funcional (alelo Rf) para uso en la producción de semilla híbrida fértil de *Brassica napus* como se describe aquí.

El fenotipo restaurador de la fertilidad y/o el alelo Rf está ligado a y/o asociado con uno o más marcadores de SSR ("marcador del alelo Rf") que es la ausencia del fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 240,8 (+/- 0,4) pb que resulta de una reacción de PCR con los cebadores expuestos como SEC ID NO: 19 y 20.

En este contexto se ha de señalar que es posible que el marcador asociado con el alelo Rf (en contraste con el alelo rf) sea más diverso. Como consecuencia, puede haber más bandas con pesos moleculares aparentes diferentes. La razón es más bien simple: mientras que el alelo rf resultó de una fuente de germoplasma individual que no se sometió a modificaciones genéticas subsiguientes frecuentes, el alelo Rf es un "alelo natural" de *Brassica napus* que está presente en diferentes antecedentes genéticos, y su entorno genético se vio afectado por numerosas actividades de reproducción. De este modo, existe una mayor variabilidad de los marcadores asociados.

En una realización preferida de la presente invención, los métodos de multiplicar la semilla prebásica, la producción de semilla femenina básica y la producción de semilla híbrida se llevan a cabo en un proceso de producción integrado. De este modo, preferiblemente, otra realización de la presente invención se refiere a un método para la producción de semilla híbrida de *Brassica napus* que produce plantas de *Brassica napus* productoras de semillas (o grano (es decir, semillas para un fin diferente del crecimiento); opcionalmente, pero preferiblemente, con un contenido total de glucosinolatos no mayor que 25 μ moles por gramo, preferiblemente entre 1 y 22 μ moles, más preferiblemente entre 5 y 20 μ moles, lo más preferible entre 8 y 17 μ moles por gramo) de semilla secada al aire a 9% de humedad, en el que dicho método comprende un método de propagar la semilla femenina prebásica (como se define anteriormente), un método para producir la semilla femenina básica (como se define anteriormente), y un método para la producción de semilla híbrida (como se define anteriormente).

Una realización preferida adicional de la presente invención se refiere al uso de cualquier línea de *Brassica napus* fértil consanguínea comercializada como semilla para crecimiento ("línea restauradora") que posee al menos un "alelo restaurador (funcional)", "alelo Rf" o "alelo mantenedor disfuncional" (es decir, "plantas restauradoras" o "líneas restauradoras" como se describen anteriormente) para restaurar la fertilidad masculina en las plantas F₁ obtenidas a partir del cruce con plantas de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculinas de la presente invención (véase

anteriormente).

4. Marcadores para los alelos Ms, ms, rf, Rf, y uso de técnicas marcadoras

Los marcadores moleculares se pueden usar para la visualización de diferencias en secuencias de ácidos nucleicos. Esta visualización es posible - por ejemplo - debido a técnicas de hibridación de ADN-ADN tras la digestión con una enzima de restricción (RFLP), y/o debido a técnicas que usan la reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo STS, microsatélites, AFLP). Los marcadores identificados aquí se pueden usar en diversos aspectos de la presente invención, como se ilustrará más abajo. Los aspectos de la presente invención no están limitados al uso de los marcadores identificados aquí. Se subraya que los aspectos pueden hacer uso también de marcadores no descritos explícitamente aquí, o incluso todavía por identificar.

Los marcadores moleculares, es decir, SNP y SSR, se usan en el programa de reproducción híbrida y en el desarrollo de las líneas consanguíneas usadas allí para seguir la herencia de alelos (por ejemplo, el alelo Ms, ms, Rf, rf) o para estimar las distancias genéticas de líneas de reproducción seleccionadas. Retrocruzando de forma asistida por marcadores líneas seleccionadas en el sistema híbrido de la presente invención (o viceversa), las etapas de retrocruzamiento se pueden reducir de cinco a tres generaciones de retrocruce.

Hay varios tipos de marcadores moleculares que se pueden usar en la selección a base de marcadores, incluyendo polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción amplificado (AFLP), repeticiones de secuencias individuales (SSR) y polimorfismos de un solo nucleótido SNP. RFLP implica el uso de enzimas de restricción para cortar ADN cromosómico en sitios de restricción cortos específicos, y resultan polimorfismos de duplicaciones o supresiones entre los sitios, o mutaciones entre los sitios de restricción. RAPD utiliza la amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) de baja restricción con cebadores individuales de secuencia arbitraria para generar conjuntos específicos de constricciones de fragmentos de ADN anónimos. El método requiere sólo pequeñas muestras de ADN, y analiza un gran número de loci polimórficos. AFLP requiere la digestión de ADN celular con una enzima de restricción antes de usar PCR y nucleótidos selectivos en los cebadores para amplificar fragmentos específicos. Un método especialmente preferido utiliza el análisis de marcadores de SSR basado en secuencias de microsatélites de ADN (repetidas cortas) que están ampliamente dispersas a lo largo del genoma de eucariotas, que se amplifican selectivamente para detectar variaciones en repeticiones de secuencias simples. Sólo se requieren pequeñas muestras de ADN para un análisis de SSR. También se prefieren los marcadores de SNP, que usan ensayos de extensión mediante PCR que recogen eficazmente mutaciones de punto. El procedimiento requiere poco ADN por muestra. Se puede usar uno o dos de los métodos anteriores en un programa de reproducción por selección a base de marcadores típico.

El método más preferido para lograr la amplificación de fragmentos nucleotídicos que abarca una región polimórfica del genoma vegetal para la selección asistida por marcadores emplea la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (Mullis et al., 1986), que usa pares de cebadores que implican un cebador inverso y un cebador directo que son capaces de hibridarse a las secuencias próximas que definen un polimorfismo en su forma bicatenaria. Se pueden emplear métodos alternativos para amplificar tales fragmentos, tales como la "reacción en cadena de la ligasa" ("LCR") (Barany, 1991), que usa dos pares de sondas oligonucleotídicas para amplificar exponencialmente una diana específica. Las secuencias de cada par de oligonucleótidos se selecciona para permitir que el par se hibride a secuencias que coinciden de la misma hebra de la diana. Tal hibridación forma un sustrato para una ligasa dependiente del molde. Al igual que con PCR, los productos resultantes sirven así como molde en ciclos subsiguientes, y se obtiene una amplificación exponencial de la secuencia deseada. La LCR se puede realizar con oligonucleótidos que tienen las secuencias próximas y distales de la misma hebra de un sitio polimórfico. En una realización, cualquiera de los oligonucleótidos se diseñará para incluir el sitio polimórfico real del polimorfismo. En tal realización, las condiciones de reacción se seleccionan de manera que los oligonucleótidos sólo se puedan ligar juntos si la molécula diana contiene o carece del nucleótido específico que es complementario al sitio polimórfico presente en el oligonucleótido. Como alternativa, los oligonucleótidos se pueden seleccionar de forma que no incluyan el sitio polimórfico (véase, documento WO 90/01069).

Un método adicional que se puede emplear como alternativa es el "ensayo de ligación de oligonucleótidos" ("OLA") (Landegren et al., 1988)). El protocolo de OLA usa dos oligonucleótidos que se diseñan para que sean capaces de hibridarse a secuencias concordantes de una única hebra de una diana. OLA, como LCR, es particularmente adecuado para la detección de mutaciones de punto. Sin embargo, a diferencia de LCR, OLA da como resultado una amplificación "lineal" en lugar de

exponencial de la secuencia diana. Nickerson et al. han descrito un ensayo de detección de ácidos nucleicos que combina los atributos de PCR y OLA (Nickerson et al., 1990). En este método, se usa la PCR para lograr la amplificación exponencial de ADN diana, que entonces se detecta usando OLA. Además de requerir múltiples etapas de procesamiento separadas, un problema asociado con tales combinaciones es que heredan todos los problemas asociados por PCR y OLA. También se conocen esquemas basados en la ligación de dos (o más) oligonucleótidos en la secuencia de un ácido nucleico que tiene la secuencia del "dioligonucleótido" resultante, amplificando de ese modo el dioligonucleótido (Wu et al., 1989), y se han adaptado fácilmente a los fines de la presente invención.

En una realización, un marcador molecular es un fragmento de ADN amplificado mediante PCR, por ejemplo un marcador de SSR. En una realización, la presencia o ausencia de un fragmento de ADN amplificado es indicativa de la presencia o ausencia del propio rasgo o de un alelo particular del rasgo. En una realización, una diferencia en la longitud de un fragmento de ADN amplificado es indicativa de la presencia de un alelo particular de un rasgo, y de este modo permite distinguir entre alelos diferentes de un rasgo. En una realización específica de la presente invención, se usan marcadores de repeticiones de secuencias simples (SSR) para identificar alelos relevantes para la invención en las plantas progenitoras y/o sus ancestros, así como en las plantas progenie que resultan de un cruce de dichas plantas progenitoras.

Las repeticiones de secuencias simples son secuencias de ADN repetidas cortas, y están presentes en los genomas de todos los eucariotas, y consisten en varios hasta alrededor de cien repeticiones de 1 a 4 motivos nucleotídicos. Puesto que el número de las SSR presentes en una localización particular en el genoma difiere a menudo entre las plantas, las SSR se pueden analizar para determinar la presencia o ausencia de alelos específicos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a cebadores oligonucleotídicos seleccionados del grupo de secuencias descritas por SEC ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20. Estos cebadores se emplean preferiblemente como un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR que consiste en un cebador directo y un cebador inverso, o como una sonda que detecta mutaciones de SNP. Preferiblemente, el par de cebadores para la amplificación de marcadores de SSR consiste en los cebadores descritos por las SEC ID NO: 1 y 2 (par 1 de cebadores), SEC ID NO: 4 y 5 (par 2 de cebadores), o SEC ID NO: 19 y 20 (par 3 de cebadores). Preferiblemente, el par de cebadores para la amplificación de un fragmento marcador de SNP (es decir, un fragmento que comprende la mutación de SNP) consiste en los cebadores descritos por las SEC ID NO: 8 y 10 (par 4 de cebadores), o SEC ID NO: 15 y 16 (par 5 de cebadores). Otros pares de cebadores proporcionados aquí también son potencialmente adecuados como secuencias de marcadores (por ejemplo, para marcadores de RFLP), tales como los cebadores descritos por las SEC ID NO: 13 y 14 (par 6 de cebadores), o SEC ID NO: 7 y 8 (par 7 de cebadores). Una sonda adecuada para la detección de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) puede comprender como la parte de ácido nucleico de una secuencia seleccionada del grupo de secuencias descritas por SEC ID NO: 11, 12, 17, y 19.

Se han secuenciado las regiones que comprenden las SSR y los SNP. Existen diferencias mutacionales sustanciales entre aquellas secuencias que están ligadas a los alelos respectivos (por ejemplo, el alelo Ms, alelo ms, alelo Rf, alelo rf) y los fenotipos asociados. Como consecuencia de ello, esas regiones presentan un rasgo inventivo de la presente invención debido a que permiten la identificación de marcadores adicionales, y/o el desarrollo de cebadores para la secuenciación del genoma adyacente, que puede comprender el alelo Ms, alelo ms, alelo Rf, alelo rf, respectivo. Para la comparación de secuencias, se han alineado las regiones variables para plantas estériles fértiles para crear una secuencia de consenso (SEC ID NO: 3 y 6, respectivamente). Esta secuencia se puede emplear preferiblemente para detectar secuencias correspondientes en germoplasma de *Brassica napus* hasta ahora no analizado. Como consecuencia, otra realización de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias descritas por SEC ID NO: 3, 6 y 21.

Las secuencias descritas en la presente invención son especialmente útiles en la reproducción y selección asistidas por marcadores. Sin embargo, estas secuencias se pueden usar en otros diversos aspectos de la presente invención, que no están limitados al uso de los marcadores como se describe en la presente solicitud. Se enfatiza que la presente invención también puede hacer uso de secuencias no descritas explícitamente aquí, o de secuencias todavía por identificar.

Con respecto a la selección asistida por marcadores, otra realización de la presente invención se refiere a un método de uso de una secuencia de ácido nucleico de la presente invención para introducir alelos seleccionados del grupo que consiste en el alelo Ms, alelo ms, alelo Rf, y/o

alelo rf, en un germoplasma de Brassica que carece de dicho conjunto de alelos. Una realización adicional preferida de la presente invención se refiere al uso de secuencias de ácidos nucleicos según la presente invención en selección a base de marcadores para introgresar alelos seleccionados del grupo que consiste en el alelo Ms, alelo ms, alelo Rf, y/o alelo rf, en un germoplasma de Brassica que carece de dicho conjunto de alelos como se describe anteriormente.

Las plantas de la presente invención que confieren esterilidad masculina o que mantienen la misma pueden tener por ejemplo el genotipo MsMsrf, Msmsrf, o msmsrf, mientras que las plantas híbridas de la invención tienen el genotipo MsmsRf, o msmsRf, en los que Ms, ms, rf, Rf tienen el significado como se describe anteriormente. La presente invención proporciona así también métodos para seleccionar una planta de la especie *Brassica napus* que muestra un fenotipo que confiere o mantiene la esterilidad masculina detectando en dicha planta la presencia del alelo Ms y/o rf como se define aquí. En un método preferido de la presente invención para seleccionar tal planta, el método comprende:

i) obtener material vegetal a partir de una planta o una población vegetal a ensayar, y extraer el ADN de dicho material;

ii) analizar la muestra de ADN obtenida en la etapa i) para determinar la presencia/ausencia del alelo Ms, del alelo ms, del alelo rf, y/o del alelo Rf, usando una o más secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención.

Más preferiblemente, la etapa ii) del método anterior comprende detectar en dicha muestra de ADN genómico al menos un marcador molecular ligado a un alelo Ms, un alelo ms, un alelo rf, o un alelo Rf, más preferiblemente detectar al menos dos marcadores moleculares de dicho grupo, en el que un marcador detecta el alelo Ms o el alelo ms y el otro marcador detecta el alelo rf o el alelo Rf. El análisis se puede llevar a cabo de diversas maneras, y puede comprender, por ejemplo, las siguientes etapas:

a) identificar el al menos un locus del marcador usando un par de cebadores oligonucleotídicos de PCR que consiste en un cebador directo y un cebador inverso que muestra una secuencia nucleotídica expuesta en cualquiera de las SEC ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 8, 19, ó 20, y

b) identificar el alelo del marcador determinando el peso molecular del producto de la amplificación de la PCR obtenido en la etapa a), y

c) identificar una planta o plantas con el perfil deseado usando los datos del análisis de marcadores.

Las muestras de ADN se pueden obtener a partir de material vegetal adecuado tal como tejido de hojas extrayendo ADN usando técnicas conocidas. En una realización preferida, la etapa de detectar un marcador molecular (etapa b) puede comprender el uso de un conjunto de cebadores bidireccionales que se usaron en el método de SSR para producir el producto de amplificación que más tarde demostró ser un marcador adecuado para el alelo Ms, ms, Rf, o rf. Tal conjunto de cebadores se denomina aquí como los cebadores que definen el marcador de SSR o cebadores específicos del marcador. "Bidireccional" significa que la orientación de los cebadores es tal que uno funciona como el directo y el otro como el cebador inverso en una reacción de amplificación de ácido nucleico. La etapa de detectar un marcador molecular (etapa b) también puede contribuir al comportamiento de una reacción de amplificación de ácido nucleico en dicho ADN genómico para detectar uno o más de los alelos Ms, ms, Rf, o rf. Esto se puede hacer adecuadamente llevando a cabo una reacción de PCR usando un conjunto de cebadores específicos de marcadores. En una realización preferida, dicha etapa b) comprende el uso de al menos un conjunto de cebadores que definen un marcador de SSR para dichos alelos, o un conjunto de cebadores que se hibridan específicamente en condiciones restrictivas con una secuencia de ácido nucleico de un marcador de SSR de dichos alelos.

Los cebadores que flanquean una región que contiene las SSR o los SNP ligados a un alelo de la invención descrito aquí se usan entonces para amplificar la muestra de ADN usando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocido por los expertos en la técnica. Básicamente, el método de amplificación mediante PCR implica usar un par de cebadores que comprenden dos secuencias cebadoras oligonucleotídicas cortas que flanquean al segmento de ADN a amplificar. Ciclos repetidos de calentamiento y desnaturalización del ADN son seguidos por la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias a bajas temperaturas, y extensión con ADN polimerasa de los cebadores hibridados. Los cebadores se hibridan a hebras opuestas de

las secuencias diana de ADN. La hibridación se refiere al emparejamiento de hebras de ADN complementarias, en el que la complementariedad se refiere a la secuencia de los nucleótidos de forma que los nucleótidos de una hebra se pueden enlazar con los nucleótidos en la hebra opuesta para formar estructuras bicatenarias. Los cebadores están orientados de manera que la síntesis del ADN mediante la polimerasa transcurre bidireccionalmente a lo largo de la secuencia nucleotídica entre los cebadores. Este procedimiento duplica efectivamente la cantidad de ese segmento de ADN en un ciclo. Debido a que los productos de PCR son complementarios a, y capaces de unirse a, los cebadores, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo previo. El resultado de este procedimiento es la acumulación exponencial de un fragmento diana específico, cuyo factor es aproximadamente 2^n , en el que n es el número de ciclos. Mediante la amplificación por PCR, se obtienen millones de copias de un segmento de ADN flanqueado por los cebadores.

Para las SSR, las diferencias en el número de secuencias repetidas entre los cebadores de flanco en alelos diferentes se reflejan en variaciones de longitud de los fragmentos de ADN amplificados. Estas variaciones se pueden detectar separando electroforéticamente en geles los fragmentos de ADN amplificados. Analizando el gel, se puede determinar si la planta contiene el alelo deseado en un estado homocigoto o heterocigoto, o si el alelo deseado está ausente del genoma vegetal.

El análisis de marcadores se puede hacer de forma temprana en el desarrollo de la planta usando muestras de ADN extraídas de tejido de la hoja de plantas muy jóvenes. Esto permite identificar plantas con una constitución genética deseable prontamente en el ciclo de reproducción, y desechar plantas que no contienen los alelos deseados relevantes para la invención, antes de la polinización, reduciendo así el tamaño de la población de reproducción. Además, usando marcadores moleculares, se puede hacer una distinción entre plantas homocigotas que poseen dos copias del alelo deseado, relevante para la invención, y plantas heterocigotas que sólo poseen una copia.

La etapa de detectar un fragmento de ADN amplificado que tiene la longitud predicha o la secuencia de ácido nucleico predicha se puede llevar a cabo mediante técnicas de electroforesis en gel estándar, o usando secuenciadores de ADN automatizados. Los métodos no necesitan ser descritos aquí, ya que son bien conocidos para la persona experta.

Los marcadores de la presente invención también se pueden usar para cartografiar los alelos de la presente invención en ciertas localizaciones en el genoma de *Brassica napus*. En general, la localización de un gen de cierto rasgo (por ejemplo, el alelo Ms o rf) se puede indicar mediante una sucesión contigua de marcadores que muestran correlación estadística con el rasgo fenotípico. Una vez que se encuentra un marcador fuera de la sucesión (es decir, aquel que tenga una puntuación LOD por debajo de cierto umbral, indicando que el marcador es tan remoto que la recombinación en la región entre el marcador y el gen (o alelo) se produce tan frecuentemente que la presencia del marcador no se correlaciona de manera estadísticamente significativa con la presencia del fenotipo), se establecen las fronteras del gen (o alelo). De este modo, es posible indicar la localización del gen (o alelo) mediante otros marcadores localizados en esa región específica.

Se ha de señalar (como se indica anteriormente) que, cuando dichos alelos de la presente invención (por ejemplo, el alelo Ms o el alelo rf) se integran en otro antecedente genético (es decir, en el genoma de otra especie vegetal u otra variedad de *Brassica napus*), algunos marcadores ya no se pueden encontrar en la descendencia aunque el rasgo esté presente allí, indicando que todos los marcadores están fuera de la región genómica que representa el rasgo específico en la línea progenitora original solamente, y que el nuevo antecedente genético tiene una organización genómica diferente. Tales marcadores, cuya ausencia indica la introducción exitosa del elemento genético en la descendencia, son denominados "marcadores trans", y pueden ser igualmente adecuados en procedimientos MAS en la presente invención.

La secuencia nucleotídica del alelo Ms o rf de la presente invención se puede resolver por ejemplo determinando la secuencia nucleotídica de uno o más marcadores asociados con dichos alelos (por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos descritas más abajo), y diseñando cebadores internos para dichas secuencias de marcadores que se pueden usar entonces para determinar posteriormente la secuencia del gen fuera de dichas secuencias de marcadores.

En realizaciones de tales métodos para detectar la presencia de un alelo Ms, un alelo ms, un alelo Rf, o un alelo rf en una planta sospechosa mantenedora o que confiere esterilidad masculina (o una planta híbrida), el método también puede comprender las etapas de proporcionar un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridarse en condiciones de hibridación restrictivas a una secuencia de ácido nucleico de un marcador ligado a dicho alelo Ms, un alelo ms, un alelo Rf, o un

alelo rf, poniendo en contacto dicho oligonucleótido o polinucleótido con ácido nucleico genómico digerido de dicha planta sospechosa, y determinando la presencia de la hibridación específica de dicho oligonucleótido o polinucleótido a dicho ácido nucleico genómico digerido. Preferiblemente, dicho método se lleva a cabo en una muestra de ácido nucleico obtenida de dicha planta sospechosa, aunque también se pueden emplear métodos de hibridación in situ. Como alternativa, y en una realización más preferida, la persona experta puede diseñar, una vez que se ha determinado la secuencia nucleotídica del alelo Ms, un alelo ms, un alelo Rf, o un alelo rf, sondas de hibridación específicas u oligonucleótidos capaces de hibridarse en condiciones de hibridación restrictiva a la secuencia de ácido nucleico de dicho alelo Ms, un alelo ms, un alelo Rf, o un alelo rf, y puede usar tales sondas de hibridación en métodos para detectar la presencia de un alelo Ms, un alelo ms, un alelo Rf, o un alelo rf de la presente invención en una planta de *Brassica napus* sospechosa.

En ciertas circunstancias puede ser económicamente viable replantar semilla cosechada de plantas de *Brassica* híbridas (por ejemplo, si esas semillas producen aceites de especialidad de gran valor). De este modo, la presente invención se refiere además a un método para usar una planta de *Brassica napus* que comprende las etapas de cosechar semilla de una planta híbrida de *Brassica* de la presente invención (o que se hace crecer a partir de la semilla según se proporciona mediante el método de producción de semilla híbrida de la presente invención), y plantar dicha semilla para producir progenie. Preferiblemente, dicha semilla cosechada tiene un contenido de glucosinolatos no mayor que 25 μ moles por gramo (preferiblemente entre 1 y 22 μ moles, más preferiblemente entre 5 y 20 μ moles, lo más preferible entre 8 y 17 μ moles por gramo) de semilla seca al aire a 9% de humedad. Más preferiblemente, dicha semilla replantada es al menos heterocigota para el alelo restaurador disfuncional (alelo rf), o al menos heterocigota para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms), es decir, tiene un fenotipo seleccionado del grupo que consiste en MsmsRfRf, MsMsRfrf, MsmsRfrf, msmsRfrf, y Msmsrfrf.

El método de replantar se puede repetir y de este modo puede incluir la etapa de repetir la etapa de plantar la semilla cosechada de las plantas progenies.

La presente invención también se refiere al uso de una planta de *Brassica napus* en un método que comprende las etapas de cosechar semilla de una planta de *Brassica napus* que se hace crecer a partir de la semilla como se proporciona mediante los métodos de la presente invención según se proporcionan aquí, y plantar dicha semilla para producir progenie. Preferiblemente, este uso incluye además la etapa de repetir la etapa de plantar la semilla cosechada de las plantas de progenie.

También se describen aquí procesos para producir aceite usando la semilla híbrida de la presente invención, especialmente las plantas que se hacen crecer a partir de ellas, y/o el aceite obtenido de ellas. De este modo, un ejemplo es un método para producir aceite de colza (*Brassica napus*) y harina (preferiblemente harina que está esencialmente libre de aceite, es decir, tiene un contenido de aceite menor que 10%, preferiblemente menor que 5%, más preferiblemente menor que 2%), que comprende las etapas de

- a) sembrar una semilla híbrida proporcionada por la presente invención o proporcionada por el método de la presente invención,
- b) hacer crecer la planta híbrida de *Brassica napus* a partir de dicha semilla,
- c) cosechar la semilla madura o grano a partir de dicha planta, y
- d) machacar dicha semilla o grano y separar o extraer el aceite de la harina (y preferiblemente además que comprende la etapa de separar el aceite de la harina).

El método para producir aceite y harina da como resultado ambos productos (aceite y harina), que se obtendrán como productos separados a partir del proceso, y tienen diferente utilidad. El aceite se usa en la industria alimentaria y de piensos con diversos fines. La harina se usa para alimentación o para la producción de biogas. Los usos representativos de la harina incluyen pienso para ganado. Los usos representativos del aceite incluyen aplicaciones para ensaladas, frituras, cocción, pulverización, y productos alimentarios viscosos. Las consideraciones de manipulación y de inventario se simplifican enormemente puesto que la harina y el aceite vegetales endógenos de la presente invención satisfacen los requisitos de una amplia variedad de usos finales. Cada uno de estos beneficios se logra de manera directa en un producto endógeno que posee inherentemente propiedades de salud y nutricionales superiores.

“Semilla” significa el material de semilla cosechado de las plantas de *Brassica napus*, que

es adecuado y/o diseñado para plantación posterior. “Grano” significa el material de semilla cosechado de las plantas de *Brassica napus* que no es adecuado (comercial o prácticamente) y/o no se diseña para plantación posterior.

5 Se describe además el uso de la semilla híbrida de la presente invención en tal procedimiento.

Otros ejemplos es un método para la producción de aceite y harina de *Brassica napus* (colza), que comprende las etapas de

- 10 a) proporcionar grano de colza que es al menos heterocigoto para el alelo restaurador disfuncional (alelo rf), o al menos heterocigoto para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms); y
- b) machacar dicha semilla y separar o extraer el aceite.

En una realización preferida, el aceite tiene un perfil de ácidos grasos seleccionado del grupo de perfiles preferidos como se describe más abajo.

15 Todavía otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una o más plantas de *Brassica napus* de la presente invención seleccionadas del grupo que consiste en una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf (es decir, la femenina prebásica), una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrrf (es decir, la madre básica), o una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrfrrf (es decir, la mantenedora), en un método para producir semilla híbrida. El método para producir semilla híbrida es preferiblemente uno de los métodos de la presente invención como se describe anteriormente.

20

En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina de la presente invención con el genotipo MsMsrfrrf (es decir, la femenina prebásica), y una planta de *Brassica napus* fértil masculina de la presente invención con el genotipo msmsrfrrf (es decir, la mantenedora), en un método para producir semilla híbrida. Nuevamente, el método para producir semilla híbrida es preferiblemente uno de los métodos de la presente invención como se describe anteriormente. En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere al uso de una o más plantas de *Brassica napus* de la presente invención seleccionada del grupo que consiste en una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrfrrf (es decir, la femenina prebásica), y una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrfrrf (es decir, la mantenedora), en un método para producir una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrrf (es decir, la madre básica) o semilla de la misma. La producción de semilla híbrida se lleva a cabo preferiblemente como se describe anteriormente (por ejemplo, como se describe en la sección 3).

25

30

35 En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrfrrf (es decir, la mantenedora) en un método para producir una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrrf (es decir, la madre básica) o semilla de la misma. Nuevamente, el método para producir la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrrf es preferiblemente uno de los métodos de la presente invención como se describe anteriormente.

40

En una realización preferida, la planta de *Brassica napus* usada en el método de uso de una planta de *Brassica napus* de la presente invención para producir semilla híbrida se selecciona de una variedad que se hace crecer o deriva de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481.

45 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de planta de *Brassica napus* fértil con el genotipo RfRf en un método para producir semilla híbrida fértil de *Brassica napus* como se describe anteriormente. Preferiblemente, la planta de *Brassica napus* fértil con el genotipo RfRf se usa en un método para proporcionar semilla híbrida fértil que es uno de los métodos para producir semilla híbrida fértil de la presente invención como se describe anteriormente.

50 En una realización adicional preferida, la presente invención se refiere a las plantas de *Brassica napus*, a sus semillas o semillas híbridas según se obtienen mediante el uso o en los métodos de uso descritos anteriormente.

6. Combinación del sistema híbrido con antecedentes genéticos y otros rasgos

- Principalmente, la planta femenina prebásica, la femenina básica, la mantenedora, y/o la híbrida se pueden combinar con cualquier antecedente genético de *Brassica napus*. Sin embargo, preferiblemente, estas plantas (especialmente las plantas híbridas) tienen una o más propiedades seleccionadas del grupo que consiste en color de capa de semilla amarillo, resistencia a herbicidas, resistencia frente a estrés biótico (por ejemplo, resistencia frente a patógenos, frente, por ejemplo, a insectos, hongos, bacterias, nemátodos, virus, etc.), y resistencia frente a estrés abiótico (por ejemplo, sequía, sal, calor, helada, etc.). Los rasgos adicionales que son comercialmente deseables son aquellos que reducirían el coste de producción de la cosecha de *Brassica* (rasgos de entrada), o que incrementarían la calidad de la cosecha de *Brassica* o el aceite o harina derivado de ella (rasgos de salida). Los rasgos de entrada se pueden seleccionar del grupo que consiste en resistencia a herbicidas, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades y resistencia a estrés (tal como resistencia a sequía, a frío, a calor, o a sal). Los rasgos de salida se pueden seleccionar preferiblemente de perfiles de aceite o de ácidos grasos deseables específicos. Los rasgos de resistencia a patógenos incluyen, pero no se limitan a
- a) resistencia a Rlm7Phoma monogénico (*Leptosphaeria maculans*); tal rasgo es accesible a partir de las variedades de *Brassica napus* cv. Roxet, y cv. Caiman;
 - b) resistencia a hernia de la col (*Plasmodiophora brassicae*); tal rasgo es accesible a partir de las variedades de *Brassica napus* cv. Tosca y cv. Mendel; y
 - c) resistencia al virus TUYV (virus amarillo del nabo); tal rasgo es accesible a partir de la variedad de *Brassica napus* cv. Caletta.

La persona experta en la técnica podría usar la planta de *Brassica* de la presente invención para desarrollar una planta de *Brassica* que es femenina prebásica o básica, una mantenedora o una restauradora de la fertilidad para la esterilidad masculina nuclear, que produzca semillas de aceite, que tenga preferiblemente un bajo contenido de glucosinolatos y cualquier otro rasgo deseable.

La harina y el aceite producidos a partir de las plantas y semillas también pueden tener diversas propiedades, dependiendo del uso pretendido. Tal uso puede ser un uso industrial o un uso como pienso o alimento. El uso para fines alimentarios puede incluir el uso como aceite para freír, para la producción de untes, como aceite para cocinar, o como aceite de ensaladas. Todos estos usos pretendidos están ligados a perfiles de ácidos grasos preferidos. Preferiblemente, las plantas de *Brassica* y/o la semilla de dichas plantas y/o la semilla obtenida de dichas plantas son de calidad cánola.

6.1. Rasgos de perfil de aceite

Preferiblemente, las plantas prebásica, básica, mantenedora, e híbrida producen un grano con un contenido de aceite mayor que 40%, preferiblemente mayor que 42%, y lo más preferible mayor que 44%.

El aceite vegetal endógeno comestible de las semillas de *Brassica* contiene ácidos grasos y otros rasgos que son controlados por medios genéticos (documento WO 91/15578; documento US 5.387.758). Preferiblemente, se incluye ácido erúico de la semilla de *Brassica* destinado a consumo humano o animal en una concentración baja de no más de 2 por ciento en peso basado en el contenido total de ácidos grasos que es controlado por medios genéticos en combinación con los otros componentes citados según se especifica. Los medios genéticos para la expresión de tal rasgo de ácido erúico pueden derivar de numerosas variedades de cánola comercialmente disponibles que tienen buenas características agrónomas, tales como, por ejemplo, Bounty, Cyclone, Delta, Ebony, Garrison, Impact, Legacy, Legend, Profit, Quantum, Campala, Pollen, Grizzly, Expert, Aviso, NK Jetix, Oase, Smart, NK Fair, NK Nemax, Ladoga, Cooper, Billy, Lorenz, Aurum, Lilian, Californium, Lisek, Orkan, Winner, Licombe, Castille, Fortis.

En una realización preferida, la planta de *Brassica napus* híbrida (o la línea básica, prebásica, o mantenedora de la presente invención usada para su reproducción) produce un perfil de aceite de especialidad. Para un repaso de los perfiles preferidos de aceite de especialidad en Brassicas véase Scarth y Tang (2006) y las referencias citadas allí.

El aceite de colza producido por las variedades de cultivo de semilla de *Brassica* tradicionales tiene típicamente una composición de ácidos grasos de 5% de ácido palmítico (C16:0), 1% de ácido esteárico (C18:0), 15% de oleico (C18:1), 14% de linoleico (C18:2), 9% de linolénico (C18:3), y 45% de erúico (C22:1) (Ackman, 1990). C22:1 es un ácido graso nutricionalmente indeseable, y se ha reducido hasta niveles muy bajos en aceite de *Brassica* para usos comestibles. El

aceite de *Brassica* con bajo contenido de C22:1 tiene un perfil de ácidos grasos nutricionalmente deseable, con bajos niveles de ácidos grasos saturados y niveles significativos de C18:3, un ácido graso omega-3 (Eskin et al., 1996). C22:1 no tiene valor significativo en aplicaciones industriales, y, para estos usos, es deseable incrementar el nivel de 45% en colza tradicional tan alto como sea posible para mejorar la competitividad económica del aceite de colza con alto contenido de ácido erúxico (HEAR) y sus derivados. Además de los ácidos grasos habituales en el aceite de *Brassica*, los miembros del reino de la planta producen más de 200 ácidos grasos no habituales, particularmente en plantas no agrónomas (van de Loo et al., 1993; Thelen y Ohlrogge, 2002; Jaworski y Cahoon, 2003). Muchos de estos ácidos grasos tienen beneficios nutricionales o usos industriales. Sin embargo, la mayoría de estas plantas tienen potencial limitado de domesticación. Debido al coste relativamente bajo y a la naturaleza renovable de la producción de colza, las cosechas de colza, incluyendo colzas de *Brassica*, se pueden modificar para producir los nuevos ácidos grasos como una fuente alternativa a las materias primas industriales derivadas del petróleo (Cahoon, 2003; Thelen y Ohlrogge, 2002).

La reproducción convencional ha contribuido al desarrollo de cuatro tipos principales de aceites de *Brassica* con composiciones alteradas de ácidos grasos dirigidas a diferentes mercados (Burton et al., 2004; Przybytski, 2005). Estos desarrollos fueron el resultado de la reproducción vegetal usando mutaciones naturales y artificialmente inducidas en las especies de *Brassica*.

Ácido Erúxico Bajo: La selección y desarrollo de aceites de *Brassica* bajos en C22:1 se inició en la década de 1950, tras la identificación de problemas potenciales para la salud humana en estudios de alimentación de animales con aceite de colza rico en C22:1. Los estudios con animales mostraron que las dietas ricas en aceite de colza con C22:1 estaban asociadas con daño miocárdico caracterizado por depósitos grasos alrededor del corazón y los riñones, y lesiones musculares en el corazón. Los mutantes con bajos niveles de C22:1 en el aceite de semilla se identificaron primero de una variedad de cultivo Liho de forraje de *B. napus* de tipo primavera alemana en 1959 (Stefansson et al., 1961). Las plantas bajas en C22:1 se retrocruzaron con variedades de cultivo adaptadas. En América del Norte y en Europa, ha habido una conversión completa de la producción comercial de colza tradicional y variedades con bajo contenido de ácido erúxico en variedades de calidad cánola.

Ácido Erúxico Elevado y Ácido Erúxico Superelevado: Aunque son nutricionalmente indeseables, los aceites con alto C22:1 y derivados de C22:1 tienen más de 200 aplicaciones industriales potenciales, por ejemplo como aditivo en lubricantes y disolventes, como suavizante en textiles, y el derivado de amida se usa en la fabricación de polímeros, lubricantes de fluidez de alta temperatura, tensioactivos, plastificantes, revestimientos superficiales, y productos farmacéuticos (Scarath y McVetty, 2006), y se han presentado más de 1000 patentes para las aplicaciones de C22:1 (Mietkiewska et al., 2004). Para competir con productos a base de petróleo, es deseable incrementar el nivel de C22:1 hasta un nivel tan alto como sea posible para reducir el coste de purificación. Existen las primeras variedades de cultivo de colza con alto contenido de ácido erúxico (HEAR) con un contenido bajo de glucosinolatos, tales como cv. Hero (Scarath et al., 1981, 1992), cv. Mercury (54% de C22:1; Scarath et al., 1995a), cv. Castor y MilleniUM01 (C22:1 55%; McVetty et al. 1998, 1999). Otras variedades adecuadas con un contenido elevado de ácido erúxico son cv. Hearty, Maruca, Maplus. El objetivo de incrementar el nivel de C22:1 se ha enfocado resintetizando *B. napus* cruzando líneas seleccionadas de los dos diploides ancestrales, *B. rapa* y *B. oleracea* (Taylor et al., 1995). Las plantas resintetizadas pueden acumular niveles de C22:1 hasta 60% (Lühs y Friedt, 1995). Los genes y alelos implicados en la síntesis de C22:1 son conocidos (Scarath y McVetty, 2006), de este modo son posibles enfoques tanto dirigidos (reproducción asistida por marcadores) y/o transgénicos, para incrementar el contenido de C22:1. El aceite de colza con contenido superelevado de ácido erúxico (SHEAR) con más de 80% de nivel de C22:1 es deseable para reducir el coste de producción de este ácido graso y sus derivados como una materia prima industrial renovable, medioambientalmente amigable. El potenciar de usar genes FAE a partir de especies que acumulan contenidos elevados de C22:1 para incrementar la acumulación de C22:1 en aceite de semilla de *Brassica* se demostró mediante un incremento del 90% en el nivel de C22:1 con la expresión de un gen FAE de *nasturtium* (*Tropaeolum majus* L) (Mietkiewska et al., 2004).

El ácido linolénico C18:3 y C18:2 bajo, junto con sus derivados de cadena más larga y más insaturados, son las dos series de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) esenciales dentro de los ácidos grasos n-3 y n-6, respectivamente, requeridos para el desarrollo y salud del ser humano. Sin embargo, el aumento del número de dobles enlaces en las estructuras químicas de los PUFA los hace susceptibles a la oxidación. Las velocidades de oxidación de C18:2 y C18:3 son aproximadamente 10 y 25 veces mayores, respectivamente, que la de C18:1. Por lo tanto, los aceites ricos en C18:2 y C18:3 se deterioran más rápidamente al exponerlos al aire, especialmente a temperaturas elevadas, dando como resultado una menor caducidad del aceite, lo que hace al aceite menos sano para el consumo humano. No obstante, los aceites menos estables se hidrogenan para potenciar la

estabilidad, pero el proceso de hidrogenación provoca la formación de ácidos grasos trans, lo que provoca problemas debido a sus funciones fisiológicas. Además, la hidrogenación aumenta el coste de los aceites de productos de procesamiento. Existen las primeras variedades de cáñola C18:3 bajas, tales como cv. Stellar (3% C18:3), la línea "M11" (Röbbelen y Nitsch, 1975), y cv. Apollo (Scarath et al., 1995b). Los genes y alelos implicados en la síntesis de C22:1 son conocidos (Scarath y McVetty, 2006), y de este modo son posibles enfoques tanto dirigidos (reproducción asistida por marcadores) y/o transgénicos para incrementar el contenido de C22:1.

Ácido Oleico Elevado y Muy Elevado: Los ácidos con niveles elevados de C18:1 y bajos de C18:3 poseen una mayor estabilidad oxidativa sin la necesidad de hidrogenación parcial, y producen menos productos indeseables durante su fritura profunda. Los aceites con ácidos oleicos elevados tienen estabilidad térmica equivalente a grasas saturadas, y son sustitutos adecuados para ellas en aplicaciones de servicio alimentario comercial que requieren una estabilidad a largo plazo. Se describen líneas con un contenido elevado de oleico de 80 a 90% de C18:1 (Vilkkki y Tanhuanpää, 1995; Rücker y Röbbelen, 1995; Schierholt y Becker, 1999; Wong et al., 1991). Comercialmente disponibles existen cv. Clear Valley 75 y MONOLA con 70 a 75% de C18:1 y un nivel reducido de C18:3 (Scarath y McVetty, 1999). La mutación de C18:1 elevado se ha asociado con el gen *fad2* en *B. napus* (Laga et al., 2004). En *B. juncea*, dos OTL juntos podrían dar cuenta de la variación del 32,2% en el nivel de C18:1 (Sharma et al., 2002). Se ha realizado un progreso considerable en el desarrollo de semillas de aceites con C18:1 muy elevado manipulando $\Delta 12$ -desaturasa y FatB tioesterasa. *B. napus* transgénica podría acumular tanto como 89% de C18:1, reduciéndose la fracción de PUFA en los aceites de semilla mediante constructos sentido o antisentido de $\Delta 12$ -desaturasa (revisado en Scarath y McVetty, 2006). Se prefieren especialmente las combinaciones de perfiles con aceite de oleico elevado y linoleico bajo que dan como resultado aceites con una calidad muy buena para la fritura. Tales rasgos están presentes, por ejemplo, en la variedad cv. Splendor.

Ácidos Grasos Saturados Bajos y Muy Bajos: C16:0 es el contribuyente principal al nivel total de ácidos grasos saturados de los aceites vegetales, incluyendo el aceite de Brassica. Se afirma ampliamente que C16:0, así como los ácidos grasos de cadena más corta C8:0 a C14:0, elevan los niveles de colesterol total (TC) plasmático y de colesterol lipoproteico de baja densidad (LDL-C) en animales y seres humanos. El aceite de cáñola es el único aceite vegetal comercial que satisface los criterios de los aceites saturados bajos (<7%) como se define en las normativas de etiquetaje en los Estados Unidos de América y en Canadá. Es deseable reducir además el nivel de ácidos grasos saturados para lograr niveles nulos de grasas saturadas. Se describen líneas con niveles reducidos adicionales menores que 6% (Raney et al., 1999). Un enfoque alternativo a la reproducción "tradicional" para disminuir el nivel de saturación es la regulación de la expresión de un número de genes, incluyendo KAS, desaturasas, y tioesterasas (Dehesh, 2004; Scarath y McVetty, 2006). Se describe Brassica transgénica con un nivel total de ácidos grasos saturados por debajo de 3,4%, en comparación con alrededor de 6,0% en plantas de *B. napus* no transformadas (Dehesh, 2004).

Niveles Elevados de Ácidos Grasos de Cadena Corta y Media (Ácido Láurico Elevado, Ácido Caprílico Elevado, y Ácido cáprico) Los aceites vegetales ricos en ácidos grasos de cadena corta y media (SMCFA) son útiles en un número de industrias alimentarias y no alimentarias. Las fuentes comerciales actuales de SMCFA son aceites de coco y de pepita de palma. El aceite de semilla de Brassica tiene trazas de SMCFA, con niveles apenas detectables de C8:0, C10:0, y C12:0. Mediante enfoques transgénicos que emplean diversos genes, se pueden obtener niveles significativos. Las plantas transgénicas producen aceite de semilla con hasta 56% en moles de C12:0 (Voelker et al., 1996). El aceite de semilla de las plantas de *B. napus* transformadas con Bay-FatB fue similar a la composición de los aceites de coco y de pepita de palma en el nivel de SMCFA (Voelker et al., 1996), que se usan en productos alimentarios tales como en chocolates, revestimientos para caramelos, postres, cremas no lácteas, margarinas bajas en grasa, jabones, detergentes, y cosméticos. Se obtuvieron hasta 40% de C8:0 y C10:0 en Brassica tras la transformación con el gen de Cuphea FatB2 tioesterasa (Dehesh et al., 1996).

Ácido Palmítico Elevado: Se observaron incrementos significativos en el nivel de C16:0 del aceite de semillas en plantas transgénicas que expresan FatB tioesterasa y KAS a partir de especies vegetales que acumulan MCFA. Las plantas transgénicas que expresan el gen Cuphea Ch FatB1 tienen un nivel de C16:0 de hasta 34% en moles (Jones et al., 1995). Se encontraron niveles similares de C16:0 en los aceites de semilla de plantas de *B. napus* transgénicas que expresan genes FatB de olmo (*Ulmus americana* L.) y nuez moscada (*Myristica fragrans* Houtt.) (Voelker et al., 1997).

Ácido Esteárico Elevado: Los aceites vegetales con niveles elevados de ácidos grasos saturados tienen aplicaciones en la fabricación de productos alimentarios grasos sólidos, tales como margarina y manteca, ahorrando el coste de hidrogenación y evitando la producción de ácido graso trans

indeseado. C18:0 tiene una ventaja sobre otras formas de ácidos grasos saturados, debido a que reduce o no tiene ningún efecto sobre el colesterol lipoproteico sérico. Las variedades de cultivo de cánola tienen sólo 1,1 a 2,5% de C18:0 en el aceite de semilla. No se ha dado a conocer ningún germoplasma de Brassica rico en C18:0 natural o inducido. Sin embargo, se describen los genes que controlan el nivel de C18:0 (revisado en Scarth y McVetty, 2006). Se describe *B. napus* cv. Westar que produce aceite de semilla con hasta 10,1% de C18:0 (Hitz et al., 1995). La expresión de un gen FatA del mangostán incrementó el nivel de C18:0 de *B. napus* cv. Quantum hasta más de 22% (Hawkins y Kridl, 1998). La expresión de un FatA de mangostán mutado a partir de mutagénesis específica del sitio condujo a un incremento de 55 a 68% en el nivel de C18:0, en comparación con la versión de FatA de tipo salvaje (Facciotti et al., 1999). Una segunda estrategia es la sobreexpresión de $\Delta 9$ -desaturasa, la enzima que dirige el flujo de carbono a la producción de C18:1-ACP. Una actividad reducida de $\Delta 9$ -desaturasa debería dar como resultado una mayor acumulación de C18:0 (Knutzon et al., 1992). La supresión antisentido usando el gen $\Delta 9$ -desaturasa de *B. rapa* incrementó el nivel de C18:0 hasta más de 32% en *B. rapa* transgénica, y hasta 40% en *B. napus* (Knutzon et al., 1992), aunque la supresión sentido con una $\Delta 9$ -desaturasa de haba de soja no fue tan eficaz en *B. napus* (Hitz et al., 1995). Una tercera estrategia es la manipulación simultánea de las actividades de las dos enzimas. La sobreexpresión de la FatA tioesterasa y la disminución de $\Delta 9$ -desaturasa incrementó el nivel de C18:0 hasta 45%, más que expresar separadamente el transgén de FatA tioesterasa (11% de C18:0) y el transgén de $\Delta 9$ -desaturasa (13% de C18:0) (Töpfer et al., 1995). Se inició la reducción de tanto FatA como FatB en *B. napus* y *B. juncea* con un constructo silenciador dual que contiene repeticiones invertidas de los genes diana (Pandian et al., 2004). Un enfoque adicional para desarrollar aceite de Brassica rico en C18:0 podría ser la reducción de las actividades de ambas desaturasas $\Delta 9$ y A12, como se muestra en la manipulación de semilla de algodón con constructos silenciadores de ARN de orquilla de pelo para las dos desaturasas que incrementaron el nivel de C18:0 de la semilla de algodón de 2 a 3% hasta 40% (Liu et al., 2002).

Ácidos Grasos Poliinsaturados (PUFA): El ácido gamma-linolénico (GLA) es un PUFA de la familia n-6 de ácidos grasos esenciales. GLA es uno de los ácidos grasos poliinsaturados nutricionalmente importantes en la dieta humana y animal. Se describen los genes para la expresión de estos ácidos grasos (revisado en Scarth y McVetty, 2006). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga (VLCP-UFA) tienen 20 ó 22 átomos de carbono con cuatro a seis dobles enlaces interrumpidos, incluyendo ácidos grasos con beneficios terapéuticos y nutricionales importantes en seres humanos, tales como ácido araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA), y docosahexaenoico (DHA). Las especies de Brassica, al igual que otras plantas superiores, no producen PUFA de cadena muy larga, tales como ARA, EPA y DHA. GLA y ALA no se encuentran ampliamente en plantas superiores. Para desarrollar semillas oleaginosas ricas en ARA y EPA, se han de introducir al menos tres genes (Abbadi et al., 2004). La factibilidad de manipular la ruta de ARA se demostró en el tabaco (Huang et al., 2004). Los ácidos grasos conjugados con ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces que no están separados por una unidad de metileno. Los aceites ricos en ácidos grasos conjugados (tales como ácido caléndico) tienen propiedades superiores como aceites secantes en aplicaciones de revestimiento. La expresión de un gen procedente de caléndula (*Calendula officinalis* L.) que codifica una enzima que introduce dobles enlaces conjugados en ácidos grasos poliinsaturados dio como resultado la acumulación de ácido caléndico hasta 20 a 25% de los ácidos grasos totales en aceite de haba de soja (Cahoon et al., 2001). Los ácidos grasos epoxídicos, tales como ácido vernólico, se producen mediante monooxigenasas y formas divergentes de dihierro desaturasas (Hatanaka et al., 2004), y son materias primas valiosas para la producción de resinas, pegamentos, plásticos, polímeros, etc.

Otros Ácidos Grasos Nuevos: Los ácidos grasos “nuevos” o “inusuales” se definen ampliamente como ácidos grasos que tienen estructuras químicas diferentes de aquellos ácidos grasos encontrados habitualmente en cosechas de semillas oleaginosas importantes (Jaworski y Cahoon, 2003). Los ácidos grasos monoinsaturados inusuales se producen mediante desaturasas especiales que insertan el doble enlace en una posición inusual en la cadena acrílica, en lugar de entre los carbonos 8 y 9, como se observa en el ácido graso normal C18:1. Los aceites vegetales ricos en ácido petroselinico o palmitoleico se podrían usar como alternativas al petróleo en la producción de lubricantes biodegradables, tensioactivos, y precursores de plásticos.

7. Tecnologías Generales

7.1 Rasgo e Introgresión Génica

El alelo Ms, alelo ms, alelo Rf, alelo rf de la presente invención (o cualquier combinación de los mismos) se puede introgresar en cualquier antecedente genético de *Brassica napus* y otras variedades de *Brassica*.

Tecnologías Transgénicas

Para la producción de un sistema híbrido transgénico, se puede usar una secuencia de ácido nucleico (preferiblemente un ADN) que comprende la secuencia genómica para el alelo Ms y/o el alelo rf. Dicha secuencia de ácido nucleico puede derivar de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481. También se describe un método para producir una planta de *Brassica napus* estéril masculina con el genotipo MsMsrf, o una planta mantenedora de *Brassica napus* con el genotipo msmsrf, que comprende las etapas de llevar a cabo un método para detectar la presencia del alelo Ms y/o del alelo rf asociado con esterilidad masculina y/o el mantenimiento de la esterilidad masculina en una planta de *Brassica napus* como se describe anteriormente, y transferir una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un alelo Ms o alelo rf así detectado, o una parte que confiere o mantiene la esterilidad masculina de la misma, desde dicha planta donante a una planta receptora (preferiblemente una planta de *Brassica*, más preferiblemente una planta de *Brassica napus*). La transferencia de dicha secuencia de ácido nucleico se puede realizar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, incluyendo la transferencia génica mediada por agrobacterium, o la transferencia génica mediada por micropartículas.

Tecnologías No Transgénicas

Una realización preferida de tal método comprende la transferencia mediante introgresión de dicha secuencia de ácido nucleico procedente de una planta de *Brassica napus* femenina básica o mantenedora (por ejemplo, las plantas derivadas de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481) cruzando dichas plantas. Esta transferencia se puede lograr así de forma adecuada usando técnicas de reproducción tradicionales.

En cada generación, se determina la presencia o ausencia del alelo Ms y/o alelo rf. Debido al fenotipo estéril masculino, la presencia o ausencia del alelo restaurador se puede detectar fácilmente en cada generación, por ejemplo mediante puntuación de la fertilidad. Después de la generación del último retrocruzamiento, se prefiere una etapa de establecimiento. En la siguiente generación, se usan marcadores moleculares como se describe en la presente invención, para seleccionar plantas homocigotas para el alelo Ms y/o el alelo rf. Estas plantas representan la línea femenina prebásica (MsMsrf) o la línea mantenedora (msmsrf), que se pueden usar para producir la semilla híbrida.

Los alelos Ms y/o los alelos rf se pueden introgresar preferiblemente en variedades comerciales de *Brassica napus* usando selección asistida por marcadores (MAS) o reproducción asistida por marcadores (MAB), como se describe anteriormente. MAS y MAB implican el uso de uno o más de los marcadores moleculares para la identificación y selección de aquellas plantas descendientes que contienen uno o más de los genes que codifican el rasgo deseado. En el presente caso, tal identificación y selección se basa en la selección del alelo Ms y/o del alelo rf o marcadores asociados con ellos. Las plantas de *Brassica napus* desarrolladas según esta realización pueden derivar ventajosamente una mayoría de sus rasgos desde la planta receptora, y derivar la propiedad que confiere o mantiene la esterilidad masculina desde la planta donante (es decir, la línea femenina básica o la línea mantenedora).

En un método, que se denomina como reproducción de pedigrí, una planta donante de *Brassica napus* que muestra propiedades que confieren o que mantienen la esterilidad masculina (por ejemplo, una planta femenina prebásica o una planta mantenedora de la presente invención) se cruza con una planta de *Brassica napus* receptora que carece de dichas características pero que muestra preferiblemente características comercialmente deseables, tales como, pero sin limitarse a, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características del aceite y/o de la harina valiosas, etc. La población vegetal resultante (que representa los híbridos F₁) se autopoliniza entonces y se deja que se establezcan las semillas (F₂). Las plantas F₂ que se hacen crecer a partir de las semillas F₂ se identifican entonces en busca de las propiedades que confieren o que mantienen la esterilidad masculina. La población se puede identificar de muchas maneras diferentes. En primer lugar, la población se puede identificar evaluando la esterilidad o fertilidad de las líneas o su propiedad para mantener la esterilidad, respectivamente. En segundo lugar, se puede realizar una selección asistida por marcadores usando uno o más de los marcadores moleculares descritos anteriormente para identificar aquella progenie que comprende un alelo Ms y/o rf. Se pueden usar otros métodos, denominados aquí como métodos para detectar la presencia de un alelo Ms y/o un alelo rf mediante fenotipos asociados. También, se puede usar la selección asistida por marcadores para confirmar los resultados obtenidos de los bioensayos cuantitativos, y, por lo tanto, también se pueden usar varios métodos en combinación.

Se describe además un método para introgresar el alelo Ms y/o el alelo rf, que comprende las etapas de obtener una planta de *Brassica* que contiene el alelo Ms y/o el alelo rf, por ejemplo las líneas consanguíneas de *Brassica* depositadas con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, respectivamente, cruzar esta planta con otra planta de *Brassica*, y seleccionar semillas que contienen el alelo Ms y/o el alelo rf. Las plantas F₁ resultantes se cruzan con el progenitor recurrente para reponer más del genoma de la línea consanguínea de *Brassica*, particularmente entre 80 y 99,5% del genoma, más particularmente entre 90% y 99% del genoma, pero especialmente entre 95% y 98% del genoma. Una planta que comprende el alelo Ms y/o el alelo rf se retrocruza al menos dos veces frente a la variedad con el antecedente genético diana. En el 2º retrocruzamiento, se realiza una autofecundación paralela de la femenina fértil (que comprende el alelo Rf procedente de la variedad fértil con el antecedente diana), para obtener plantas BC0S1. En las etapas de reproducción subsiguientes, sólo se utilizan plantas que comprenden el alelo Ms y rf (dando como resultado plantas estériles tras la autofecundación). El proceso de autofecundación y cruzamiento paralelo se lleva a cabo en cada generación de BC. Como alternativa, la presencia/ausencia del alelo Ms y/o el alelo rf se puede rastrear con tecnología de marcadores. Las líneas femeninas básicas estériles masculinas consanguíneas o las líneas mantenedoras se pueden desarrollar usando las técnicas de selección recurrente y retrocruzamiento, autofecundación y/o dihaploides, o cualquier otra técnica usada para obtener líneas parentales. En un método de selección recurrente y retrocruzamiento, el genotipo que confiere o mantiene la esterilidad masculina se puede introgresar en una planta receptora diana (el "progenitor recurrente") cruzando el progenitor recurrente con una primera planta donante, que difiere del progenitor recurrente y se denomina aquí como el "progenitor no recurrente". El progenitor recurrente es una planta que carece de las propiedades que confieren o mantienen la esterilidad masculina, y posee preferiblemente características comercialmente deseables, tales como, pero sin limitarse a, resistencia (adicional) a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas del aceite o harina, etc. El progenitor no recurrente muestra propiedades que confieren o mantienen la esterilidad masculina, y comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el alelo Ms y/o el alelo rf. El progenitor no recurrente puede ser cualquier variedad vegetal o línea consanguínea que es fértil cruzada con el progenitor recurrente. La progenie resultante de un cruce entre el progenitor recurrente y el progenitor no recurrente se retrocruza con el progenitor recurrente. La población vegetal resultante se identifica entonces en busca de las características deseadas, identificación la cual se puede producir de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, la población se puede identificar usando identificaciones o ensayos cuantitativos de patología fenotípica como se conocen en la técnica. Como alternativa, en lugar de usar bioensayos, se puede realizar una selección asistida por marcadores (MAS) usando uno o más de los marcadores moleculares descritos aquí anteriormente, sondas de hibridación o polinucleótidos para identificar aquellas progenies que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica el alelo Ms y/o el alelo rf. También, se puede usar MAS para confirmar los resultados obtenidos de los bioensayos cuantitativos. Los marcadores definidos aquí son por lo tanto adecuados finalmente para seleccionar plantas descendientes apropiadas mediante identificación genotípica. Tras el cribado, las plantas de *Brassica napus* que muestran un fenotipo que confiere o que mantiene la esterilidad masculina, o, más preferiblemente, un genotipo, y de este modo comprenden la secuencia de ácido nucleico necesaria que codifica el alelo Ms y/o el alelo rf, se seleccionan entonces y se retrocruzan con el progenitor recurrente durante un número de generaciones a fin de permitir que la planta de *Brassica napus* sea cada vez más consanguínea. Este proceso se puede realizar para dos a cinco o más generaciones. En principio la progenie que resulta del proceso de cruzar el progenitor recurrente con el progenitor no recurrente que confiere o que mantiene la esterilidad masculina es heterocigota para el alelo Ms y/o el alelo rf. Las plantas homocigotas se pueden obtener autofecundando estas plantas y evaluando el genotipo de la generación subsiguiente mediante análisis de marcadores, o autofecundando adicionalmente y monitorizando el patrón de segregación del fenotipo.

En general, un método para introducir un rasgo que confiere o que mantiene la esterilidad masculina deseado en una variedad de *Brassica napus* comprende las etapas de:

- (a) cruzar un progenitor de *Brassica napus* consanguíneo con otra planta de *Brassica napus* que comprende el alelo Ms y/o el alelo rf, para producir plantas de progenie F₁;
- (b) seleccionar dichas plantas de progenie F₁ que tienen el alelo Ms y/o el alelo rf para producir plantas seleccionadas de progenie F₁, preferiblemente usando marcadores moleculares como se define aquí;
- (c) retrocruzar las plantas seleccionadas de la progenie con dicha planta progenitora consanguínea de *Brassica napus* para producir plantas de progenie retrocruzadas;
- (d) seleccionar plantas de progenie retrocruzadas que tienen el alelo Ms y/o el alelo rf y

características morfológicas y fisiológicas de dicha planta consanguínea de *Brassica napus*, en el que dicha selección comprende el aislamiento de ADN genómico y el estudio de dicho ADN en busca de la presencia de al menos un marcador molecular para el alelo Ms y/o el alelo rf, preferiblemente como se describe aquí;

5 (e) repetir las etapas (c) y (d) dos o más veces sucesivamente para producir plantas de progenie de tercer retrocruzamiento o superior seleccionadas; y

(f) opcionalmente autofecundar la progenie retrocruzada seleccionada a fin de identificar plantas homocigotas.

10 Como se ha indicado, la última generación retrocruzada se puede autofecundar a fin de proporcionar una progenie de reproducción pura homocigota (consanguínea) para plantas que confieren o que mantienen la esterilidad masculina. De este modo, el resultado de la selección recurrente, del retrocruzamiento y la autofecundación es la producción de líneas que son genéticamente homogéneas para el alelo Ms y/o el alelo rf así como para otros genes asociados con rasgos de interés comercial.

15 En una realización alternativa para producir una planta de Brassica estéril masculina o mantenedora, se puede usar la fusión de protoplastos para la transferencia del alelo Ms o del alelo rf de la presente invención a una planta receptora. Por este medio, el sistema híbrido de la presente invención se puede utilizar en otras especies, preferiblemente en otras especies de Brassica, tal como Brassica oleracea. La fusión de protoplastos es una unión inducida o espontánea, tal como una hibridación somática, entre dos o más protoplastos (células de las cuales se eliminan las paredes celulares mediante tratamiento enzimático) para producir una única célula bi- o multinucleada. La célula fusionada que se puede obtener incluso a partir de especies vegetales que no se pueden interreproducir en la naturaleza, es tejido cultivado en una planta híbrida que muestra la combinación deseable de rasgos. Más específicamente, se puede obtener un primer protoplasto a partir de una planta de *Brassica napus* (por ejemplo, las plantas derivadas de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481). Se puede obtener un segundo protoplasto a partir de una segunda *Brassica napus*, tal como otra especie de Brassica u otra variedad vegetal, preferiblemente una línea de Brassica que comprende características comercialmente valiosas, tales como, pero sin limitarse a, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas de la fruta, etc.

30 Los protoplastos se fusionan entonces usando procedimientos de fusión de protoplastos tradicionales, que son conocidos en la técnica.

Como alternativa, se puede emplear el rescate de embriones en la transferencia de un ácido nucleico que comprende alelo Ms y/o rf como se describe aquí desde una planta donante a una planta receptora. El rescate de embriones se puede usar como un procedimiento para aislar embriones de cruzamientos en los que las plantas no producen semilla viable. En este proceso, el ovario fertilizado o semilla inmadura de una planta es tejido cultivado para crear nuevas plantas (Pierik, 1999).

35

Adicional o alternativamente, en las introgresiones génicas y de rasgos se pueden utilizar otras técnicas. Tales técnicas pueden implicar el uso de tecnología de haploides dobles (Fletcher et al., 1998), que puede incrementar significativamente la velocidad de generación consanguínea para la línea prebásica y la mantenedora. Para la línea prebásica, es necesario utilizar un procedimiento de tratamiento térmico, debido a que de otro modo las microesporas son abortadas.

40

7.2 Creación de Conjuntos Génicos Distintos

La utilización de un efecto heterósico máximo y una reproducción heterósica exitosa a largo plazo requiere progenitores con una gran diferencia genética. La base genética estrecha de colza es un factor limitante para incrementar el comportamiento híbrido en un experimento prolongado. Introduciendo genotipos resintetizados (Girke, 2002), y usando procedimientos de selección recurrente recíproca, la base genética se ha de extender etapa por etapa. Especialmente en cánola de tipo invierno, se puede observar una estrecha correlación genética ($r = 0,87$) de las variedades comerciales existentes (Girke, 2002).

50

No merece la pena ensayar en el campo líneas parentales con una distancia genética menor que un mínimo fijo. La distancia se puede estudiar mediante análisis de isoenzimas (Mündges et al., 1990), o más convenientemente mediante marcadores (RFLP: Beckmann y Soller, 1983; Botstein et al., 1980; RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar): Williams et al., 1990; Förster y Knaak, 1995). Esto reduce el trabajo de los ensayos de rendimiento.

55

7.3 Uso en Reproducción

Las plantas descritas anteriormente se pueden usar para diversas actividades de reproducción, incluyendo, pero sin limitarse a

- 5 a) Autofecundación de híbridos: se hicieron crecer híbridos con bajos contenidos de glucosinolatos que contienen el nuevo alelo Ms y/o el alelo rf de la presente invención. Las plantas fértiles se autopolinizaron, algunas con bolsas, otras cepillando manualmente el polen. La semilla F₂ se cosechó a partir de estas plantas F₁, y se plantaron como una población. Las plantas fértiles de esta población se seleccionaron y se hicieron crecer como filas F₃, proporcionando de ese modo material de partida para enfoques de reproducción tales como reproducción de pedigrí, selección recurrente y otros.
- 10 b) Como progenitoras en reproducción tradicional: líneas que contienen el alelo Ms y/o el alelo rf de la presente invención se cruzaron con otras líneas de germoplasmas como parte del programa de reproducción. Se hizo crecer la F₁ a partir de estos cruzamientos. Las plantas fértiles se autopolinizaron, y se cosechó la semilla F₂ resultante. Las plantas fértiles procedentes de la población F₂ se seleccionaron, se cosecharon y se hicieron crecer como filas F₃, proporcionando de ese modo material de partida para enfoques de reproducción tales como reproducción de pedigrí, selección recurrente y otros.
- 15 c) Como progenitoras en haploides dobles: se cruzó una fuente del alelo Ms y/o el alelo rf de la presente invención para mejorar el germoplasma. Los híbridos resultantes se sometieron a un cultivo de microesporas para producir líneas restauradoras de haploides dobles. Los métodos de cultivo de microesporas utilizados fueron similares a los descritos por Chen et al (1994) y Mollers et al (1994). De este modo, se describe adicionalmente un método para producir una planta de *Brassica napus* (por ejemplo, una línea básica, prebásica, o mantenedora), que comprende las etapas de:
 - 20 i. seleccionar un progenitor fértil masculino con microesporas que comprenden un alelo seleccionado del grupo que consiste en el alelo Ms, alelo ms, alelo rf, y alelo Rf;
 - 25 ii. cultivar microesporas seleccionadas procedentes de la planta fértil masculina seleccionada de la etapa (i), formando haploides e induciendo haploides dobles;
 - 30 iii. evaluar la progenie de haploides dobles para el fenotipo asociado con dicho alelo o la presencia del alelo mediante marcadores; y
 - iv. seleccionar la progenie que es positiva para la presencia de dicho alelo.
- 35 d) Como fuente en un programa de retrocruzamiento: el material que contiene el alelo Ms y/o el alelo rf se cruzó para seleccionar líneas consanguíneas. Las plantas fértiles masculinas se emascularon y se cruzaron nuevamente con la línea consanguínea (progenitor recurrente). Las plantas fértiles masculinas resultantes se retrocruzaron nuevamente con la línea consanguínea. En cualquier generación, se pudo comenzar una autofecundación del material para producir nuevas líneas restauradoras. Estos proyectos ejemplifican un programa de retrocruzamiento para introducir el alelo Ms y/o el alelo rf en germoplasma superior. Se puede emplear el análisis de marcadores (como se describe anteriormente).
- 40 Estos y otros objetos y ventajas de la presente invención serán manifiestos para los expertos en la técnica a partir de una lectura de los siguientes ejemplos y reivindicaciones anejas.

Depósito

- 45 Se depositó una muestra de semillas de línea consanguínea *Brassica napus* 07055001 (línea de semilla prebásica estéril masculina; genotipo MsMsrfrrf) en NCIMB, Ltd. (NCIMB Ltd; Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA UK; Tel.: +44 (0) 1224 711100 Fax: +44 (0) 1224 711299), el 16 de mayo de 2007, Número de Depósito NCIMB 41480. Se depositó una muestra de semillas de línea consanguínea de *Brassica napus* 04058001 ("línea mantenedora"; genotipo msmsrfrrf) en NCIMB, Ltd. (NCIMB Ltd; Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, UK; Tel.: +44 (0) 1224 711100 Fax: +44 (0) 1224 711299) el 16 de mayo de
- 50 2007, Número de Depósito NCIMB 41481.

Declaración con respecto a la fuente de material biológico

Los alelos Ms y rf se obtuvieron de material de *Brassica napus* comercialmente disponible

en el mercado de la Unión Europea (Alemania y otros países) en 1998.

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de GSL

El contenido de glucosinolatos (GSL) de las semillas de Brassica se monitorizó a través del programa de reproducción. El contenido de glucosinolatos se da en $\mu\text{moles/g}$ de semilla a una humedad del 9%. El análisis de glucosinolatos se puede llevar a cabo usando la tecnología del estado de la técnica, tal como, por ejemplo, HPLC o espectroscopía de reflectancia de infrarrojo cercano (NIRS). Usando el método de NIRS, es posible analizar muestras de semilla de Brassica sin destruir para determinar la calidad de los componentes del aceite, proteína y glucosinolato.

Los niveles de glucosinolatos expuestos aquí se determinan según dos procedimientos estándar, a saber, (1) cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC) como se describe en ISO 9167-1:1992(E) para la cuantificación de glucosinolatos intactos totales ("Rapeseed-Determination of glucosinolates content--Part 1: Method using high-performance liquid chromatography, International Organization for Standardization", Ginebra), y (2) cromatografía de gas-líquido para la cuantificación de derivados trimetilsilílicos (TMS) de disulfoglucosinolatos extraídos y purificados como se describe por Sosulski y Dabrowski (1984). Tanto los métodos de HPLC como de TMS para determinar los niveles de glucosinolatos expresados aquí implican el análisis del componente sólido de la semilla tras la trituración y la extracción del aceite (es decir, la harina desgrasada y libre de aceites). Más preferido, el análisis de glucosinolatos se lleva a cabo usando la espectroscopía de reflectancia de infrarrojo cercano. Los análisis se llevan a cabo en un FOSS NIR Systems Modelo 5000-c. El análisis de glucosinolatos se describe en Williams y Sobering (1992).

Ejemplo 2: Método para Determinar el Perfil de Ácidos Grasos

Las concentraciones de ácidos grasos expresadas aquí se determinan según un procedimiento estándar en el que el aceite se elimina de las semillas de Brassica mediante trituración, y se extrae como ésteres metílicos de ácidos grasos tras la reacción con metanol y metóxido sódico. A continuación, el éster resultante se analiza para determinar el contenido de ácidos grasos mediante cromatografía de gas-líquido usando una columna capilar que permite la separación basándose en el grado de insaturación y de longitud de la cadena. Este procedimiento de análisis se describe en el trabajo de Daun et al. (1983), que se incorpora aquí como referencia.

Ejemplo 3: Desarrollo de líneas estériles masculinas prebásicas homocigotas

Plantas de *Brassica napus* del germoplasma de Takagi estériles masculinas se polinizaron con polen de la variedad Zenith de *Brassica napus*. La progenie F_1 de este cruce fue fértil masculina. Plantas de aquella se cruzaron en el invernadero con las plantas fértiles masculinas de la variedad Smart después de la emasculación manual. Se obtuvieron plantas F_1 de cada una de las semillas del cruzamiento de las plantas en el invernadero. Todas las plantas mostraron un fenotipo fértil masculino. Plantas individuales de esta población se autofecundaron mediante aislamiento de plantas individuales con bolsas de plástico (Cryovac Crispac Beutel Super Micro Lochung 360 x 830 mm, Supplier. Baumann Saatzeitbedarf D-74638 Waldenburg). Los descendientes de la autofecundación F_2 se evaluaron en el invernadero con respecto a la esterilidad/fertilidad masculina. Ocho de diez poblaciones fueron fértiles, dos de diez poblaciones mostraron segregación para esterilidad/fertilidad. Las plantas estériles de estas poblaciones se autofecundaron en condiciones de temperatura elevada como se describe más abajo en el Ejemplo 10. Nuevamente se hicieron crecer en el invernadero poblaciones F_3 de esas plantas estériles masculinas, y se autofecundaron. Tres poblaciones mostraron sólo plantas estériles masculinas, 10 poblaciones se segregaron en plantas estériles masculinas y fértiles masculinas. Las plantas estériles masculinas procedentes de las poblaciones que no se segregan se autofecundaron bajo tratamiento térmico. Según el esquema de herencia dado en la Figura 1 y confirmado por el análisis de marcadores, estas plantas presentan el genotipo MSMSrfrf. Se obtuvieron doscientas sesenta y cuatro plantas F_4 en el invernadero. Todas mostraron el fenotipo estéril masculino. Después del tratamiento térmico, se pudo cosechar un total de 232 g de semillas procedentes de todas las plantas.

Ejemplo 4: Desarrollo de líneas mantenedoras

Las plantas fértiles masculinas de las poblaciones F_3 que se segregan procedentes del Ejemplo 3 se autofecundaron ya que muestran rfrfmsms (Fig. 1). Se llevaron a cabo cruces de ensayo con plantas de las poblaciones F_3 completamente estériles masculinas. Se evaluaron cinco cruzamientos diferentes con cada una de 16 plantas. Todas las plantas mostraron un fenotipo estéril

masculino, con la condición de que el cruzamiento fue rfrfMSMS x rfrfmsms como se presupone. La ausencia del alelo Rf en la línea mantenedora es crucial. Para asegurar esto, es esencial tener marcadores para este alelo. La polinización cruzada de líneas restauradoras no se pudo detectar debido a que no hay diferencia fenotípica entre la mantenedora y la restauradora.

5 Ejemplo 5: Identificación de marcador molecular ligado al alelo de esterilidad del RHS (alelo Ms)

Se realizó un experimento de análisis de segregantes agrupados (BSA) (Michelmore et al., 1991) en una población F_2 de 162 individuos que segregan el locus de esterilidad del RHS. Esta población deriva del cruce entre una línea estéril de RHS (ID: 03550015-34; como se representa mediante la muestra de semillas depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480) y la línea mantenedora fértil de RHS correspondiente (ID: 03560006-08; como se representa mediante la muestra de semillas depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481). La segregación para la esterilidad masculina como se observa en la población F_2 se ajustó a la relación 3:1 esperada para un gen dominante individual. Se ensayó un conjunto de 762 marcadores de microsatélites (SSR) para polimorfismo entre tanto líneas parentales así como entre agrupamientos de plantas F_2 estériles masculinas y fértiles masculinas. Se analizaron dos agrupamientos diferentes de fértiles masculinas y estériles masculinas. Los agrupamientos consistieron en una mezcla de muestras de hojas procedentes de 10 plantas F_2 fértiles o 10 plantas F_2 estériles. El BSA describió cinco marcadores de SSR que muestran polimorfismo entre dos líneas parentales así como entre los agrupamientos estériles masculinos y fértiles masculinos (Fig. 4-A).

Estos cinco marcadores de SSR se genotiparon subsiguientemente a lo largo de toda la población F_2 y se cartografiaron usando Mapmaker/Exp (versión 3.0b). Los resultados del cartografiado confirmaron marcadores NR1116 (SSR amplificado mediante cebadores oligonucleotídicos SEC ID NO: 1 y 2; región de SSR expuesta como SEC ID NO: 21; véase también la Fig. 6 para localización de cebadores y el motivo de SSR) y NR2525 (SSR amplificada mediante cebadores oligonucleotídicos SEC ID NO: 4 y 5; región de SSR expuesta como SEC ID NO: 22; véase también la Fig. 7 para localización de cebadores y motivo de SSR) estaban estrechamente ligados al alelo de esterilidad masculino (Ms) en el cromosoma N7 (Tabla 2).

Secuencia del cebador directo de NR1116:

30 5'-TCTTCAAGGGATTCATTCGG-3' (SEC ID NO: 1)

Secuencia del cebador inverso de NR1116:

5'-GAAACTTCGTGCGAATCCTCG-3' (SEC ID NO: 2)

Secuencia del cebador directo de NR2525:

5'-ATTACCATTTCCAACGAATCT-3' (SEC ID NO: 4)

35 Secuencia del cebador inverso de NR2525:

5'-GTCTCTTTCTCAACTTTGTATC-3' (SEC ID NO: 5)

El marcador de SSR NR1116 consiste en una repetición GA/CA de aproximadamente 20 unidades. El tamaño del alelo observado en la población de cartografía de Ms de RHS (usando un secuenciador ABI 3700) es para la línea estéril de RHS (0355015-34): 96,7 (+/- 1) pb (alelo estéril masculino), y para la línea mantenedora de RHS (03560006-08): 112,3 (+/- 0,4) pb (alelo fértil masculino).

El marcador de SSR NR2525 consiste en una repetición AG de aproximadamente 20 unidades. El tamaño del alelo observado en la población de la cartografía de Ms de RHS (usando un secuenciador ABI 3700) es para la línea estéril de RHS (0355015-34): 192,8 (+/- 0,3) pb (alelo estéril masculino), y ninguna banda para la línea mantenedora de RHS (03560006-08) (alelo fértil masculino). Por esa razón, NR2525 se puntuó como un marcador dominante para Ms. Se observó otro fragmento de 194,6 (+/- 0,5) pb, pero esta banda no se consideró puesto que apareció persistentemente en todos los individuos vegetales independientemente de su fenotipo.

El genotipo del alelo Ms se predijo según el fenotipo: las plantas estériles masculinas pueden ser "Msms" o "MsMs", pero las plantas fértiles masculinas son siempre "msms". Por lo tanto, el alelo Ms se cartografió como un marcador dominante. En consecuencia, NR1116 y NR2525 aparecen en el mapa en cualquier lado del rasgo de Ms a una distancia genética de 2,8 cM y 6,0 cM,

respectivamente (véase Tabla 2). Las distancias calculadas son esencialmente las mismas para el alelo tanto Ms como ms.

Tabla 2: Distancias de cartografiado calculadas entre Ms y los marcadores de flanco localizados en el cromosoma N7 usando Mapmaker (versión 3.0b). La distancia genética entre los marcadores se estima en centimorgan (cM), y es directamente proporcional al número de recombinantes encontrados en la población.

Loci	Distancia genética entre loci
NR1116	2,8 cM
Alelo Ms	6,0 cM
NR2525	---
Suma de distancias genéticas	8,8 cM

Las condiciones experimentales para el BSA o para el cartografiado de los marcadores de SSR consistieron en protocolos habituales bien conocidos para la persona experta en la técnica de marcadores moleculares. Se realizaron amplificaciones mediante PCR para la identificación por BSA en un instrumento GeneAMP PCR System 9700 de Applied Biosystems Inc. en un volumen de reacción total de 10 µl en placas de 384 pocillos usando Sigma Jump start Taq polimerasa. La mezcla de PCR consistió en un tampón de reacción 1X de Sigma, 1,65 mM de MgCl₂, 0,25 mM de los dNTP y 400 nM de cada cebador. Las condiciones de PCR consistieron típicamente en 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C, y una incubación final de 2 minutos a 72°C. Los productos de la amplificación se cargaron subsiguientemente y se migraron en geles de Resophor Agarose 1000 (de Invitrogen Corp.) al 3% según las instrucciones del proveedor. Para los fines del cartografiado, los cebadores usados para la amplificación mediante PCR comprendieron al menos un cebador marcado con HEX (5'-hexafluoro-fluoresceína), NED (benzofluorotriclorocarboxi-fluoresceína) o FAM (carboxifluoresceína), a fin de permitir de resolver la detección fluorescente en un secuenciador ABI 3700 y puntuar polimorfismos de longitud. Aparte del uso de un cebador marcado fluorescentemente, las condiciones de PCR para el cartografiado de las SSR fueron las mismas que para la identificación mediante BSA.

Ejemplo 6: Conversión de marcadores de SSR en marcadores de SNP

A fin de convertir los marcadores de SSR en marcadores de SNP que se consideraron más versátiles para la reproducción asistida por marcadores, los productos de la amplificación de los marcadores de SSR se secuenciaron a lo largo de un panel que comprende líneas tanto estériles masculinas homocigotas (MsMs) como fértiles masculinas homocigotas o mantenedoras (msms), ocho cada una. Cada combinación de línea estéril masculina y mantenedora representa un antecedente genético diferente. El análisis de BLAST usando la secuencia nucleotídica de NR1116 (SEC ID NO: 21) como interrogación frente a la base de datos de secuencias de reconocimiento genómicas (GSS) en NCBI mostró una fuerte homología de secuencia entre NR1116 y un fragmento de GSS procedente de Brassica oleracea con el número de acceso BH708933. La homología se extiende a lo largo de una longitud de aproximadamente 0,4 Kb inmediatamente en dirección del motivo de microsatélite, y permitió el diseño de cebadores putativamente específicos del genoma A (Brassica rapa) HiNK6440 y 6442 (SEC ID NO: 7 y 8, respectivamente).

Cebador oligonucleotídico HiNK6440:

5'-GTTCACTTCTCATCTTCTCCAG-3' (SEC ID NO: 7)

Cebador oligonucleotídico HiNK6442:

5'-TCCTGGCAATCAGACAATACTT-3' (SEC ID NO: 8)

El análisis de secuencias de los productos de amplificación obtenidos en las líneas MsMs y msms reveló dos haplotipos que mostraron correlación con el rasgo de esterilidad masculina. La Tabla 3 resume la posición de las posiciones polimórficas que distinguen ambos haplotipos; la secuencia de consenso se da como SEC ID NO: 3.

Tabla 3 Características de los haplotipos estéril masculino y fértil masculino observados. Tipo y posición del polimorfismo observado según la secuencia de referencia SEC ID NO: 3 (indel = supresión)

Posición	85	87	139	24	218	245-257	277	286	312
Haplotipo_A fértil	G	A	T	T	T	TTGGTGAAC AATC	A	G	A
Haplotipo_B estéril	A	G	A	C	G	INDEL	G	A	T

Posición	319	238-330	359
Haplotipo_A fértil	C	INDEL	T
Haplotipo_B estéril	T	GAA	C

Las SNP en la posición 214 (T/C) y 218 (T/G) se seleccionaron para desarrollar un ensayo TaqMan® usando el software Primer Express 2.0 distribuido por Applied Biosystems Inc., y siguiendo las instrucciones correspondientes. En la Tabla 4 se dan las secuencias de cebadores y sondas que corresponden a este ensayo, denominado como SR0002A.

Tabla 4: Secuencias nucleotídicas de los cebadores y sondas para el ensayo de Taqman SR0002A. Fluorocromos: FAM (carboxifluoresceína); VIC (abreviatura patentada de Applied Biosystems). MGB: ligante de surco menor. NFQ: extintor no fluorescente

NR1116	SR0002A TaqMan®	
HiNK6441 SEC ID: 8	5'- GAGAGAGACACTTCGATGAATATAG- 3'	Cebador de PCR
HiNK6697 SEC ID: 10	5'-ACACACGC77CTTCGTCTAGT-3'	Cebador de PCR
HiNK6700 SEC ID: 11	VIC-CGAATCGATTCTC-MGB-NGQ	Sonda específica del alelo fértil (ms)
HiNK6701 SEC ID: 12	FAM-CGAATCCGAGTCTC-MGB-NFQ	Sonda específica del alelo estéril (Ms)

La secuencia del marcador de microsatélites NR2525 se publica con el número de acceso BZ061557 (SEC ID NO: 22). A fin de estudiar este fragmento de secuencia para la variabilidad alélica correlacionada con el rasgo de esterilidad masculina, se diseñaron cebadores de PCR para la secuencia que flanquea el motivo de microsatélites.

Cebador oligonucleotídico HiNK6702:

5'-AGTAACATCAGCGGGAAC-3' (SEC ID NO: 13)

Cebador oligonucleotídico HiNK6707:

5'-TTTAAGAGCATTGGAAGTCTCC-3' (SEC ID NO: 14)

La combinación de cebadores HiNK6702 y 6707 (SEC ID NO:13 y 14, respectivamente) mostró dos productos de amplificación que probablemente correspondan al genoma A y C; el fragmento más grande de 0,6 Kb pareció ser monomórfico, pero el fragmento más pequeño mostró un polimorfismo de longitud correlacionado con el rasgo de esterilidad masculina en un número de antecedentes genéticos diferentes, 0,5 Kb para el alelo fértil masculino frente a 0,4 Kb para el alelo estéril masculino (Fig. 4B). El análisis de secuencias de este fragmento polimórfico a través del panel

de las líneas MsMs y msms reveló tres haplotipos (Tabla 5), un solo haplotipo como era de esperar para el alelo Ms estéril masculino (haplotipo B) y dos haplotipos para el alelo ms fértil masculino (haplotipos A y C).

- 5 **Tabla 5:** Características de los haplotipos estéril masculino y fértil masculino observados. Tipo y posición del polimorfismo observado según la secuencia de referencia SEC ID NO: 6 ("." significa una supresión de un solo nucleótido)

Posición	17-25	60	82	92	105	158	224-302
Haplotipo B estéril	INDEL	A		T	T	C	TAAAAACAGAAGGGAAAACCCAC CTTCGTTTAAACATTCTAAAATCCA AATAATTGGACTCAATATGAAGC TAAAAGCCC
Haplotipo A fértil	TGAGCAAA A	C	T	C	C	A	AACACCTAC
Haplotipo C fértil	TGAGCAAA A	C	T	C	C	A	TAAAAACAGAAGGGAAAACCCACC TTCGTTTAAACATTCTAAAATCCAA ATAATTGGACTCAATATGAAGCT AAAAGCCC

Posición	365	424	431
Haplotipo B estéril	G	C	T
Haplotipo A fértil	T	T	C
Haplotipo C fértil	G	C	C

- 10 La secuencia de consenso para los tres haplotipos se expone como SEC ID NO: 6. Como se ilustra por el alineamiento de los haplotipos, el alelo estéril masculino se puede distinguir del alelo fértil masculino en un número de posiciones, incluyendo el SNP en la posición 158 que fue seleccionado como diana para el diseño de un ensayo TaqMan® como se describe anteriormente. Las secuencias de los cebadores y sondas usados en este ensayo que se denomina como SR0003B se dan en la Tabla 6.

- 15 **Tabla 6:** Secuencias nucleotídicas de los cebadores y sondas para el ensayo Taqman SR0003B. Fluorocromos: FAM (carboxifluoresceína); VIC (abreviatura patentada de Applied Biosystems). MGB: ligante de surco menor. NFQ: extintor no fluorescente

NR2525	SR0003B TaqMan®	
HiNK6771 SEC ID: 15	5'-TTTACAACACAAAGGGCTTTCTGC-3'	Cebador de PCR
HiNK6772 SEC ID: 16	5'-TGTAGGCCGTGAACCTGTCTCGATTG-3'	Cebador de PCR
HiNK6775 SEC ID: 17	FAM-ATTTGACACACATTACC-MGB-NFQ	Sonda específica del alelo estéril (Ms)
HiNK6776 SEC ID: 18	VIC-ATTTGACAAACATTACC-MGB-NFQ	Sonda específica del alelo fértil (ms)

Los ensayos TaqMan® derivados tanto de NR1116 como de NR2525 se realizaron típicamente en volúmenes de reacción de 10 µl en placas de 384 pocillos en instrumentos GeneAMP PCR System 9700 de Applied Biosystems Inc. usando Platinum Taq polimerasa y la mezcla enzimática correspondiente de Invitrogen Corp. Las condiciones de PCR consistieron típicamente en una etapa de desnaturalización primaria de 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 94°C y 60 segundos a 62°C. Las señales de FAM y VIC fluorescentes se cuantificaron subsiguientemente en un sistema de detección de secuencias 7900HT de Applied Biosystems Inc. usando el paquete de software SDS 2.1. La Fig. 5 muestra una gráfica típica obtenida para el marcador SR0002A con las plantas estéril masculina homocigota (MsMs), estéril masculina heterocigota (Msms) y fértil masculina homocigota (msms) que se segregan en tres nubes diferentes. Usando el protocolo experimental anterior, ambos marcadores se cartografiaron en la población F₂ que se segrega para el rasgo de esterilidad masculina como se describe en el Ejemplo 1. Como era de esperar basándose en la posición de cartografía de los marcadores de SSR originales, los ensayos de SNP SR0003B y SR0002A se muestran en cualquier lado del rasgo Ms a una distancia de 2,8 cM y 3,3 cM, respectivamente, con relación al rasgo de Ms (Tabla 7).

Tabla 7: Distancias de cartografiado calculadas entre Ms y los marcadores de flaqueo localizados en el cromosoma N7 usando Mapmaker (versión 3.0b). La distancia genética entre los marcadores se estima en centimorgan (cM), y es directamente proporcional al número de recombinantes encontrados en la población

Loci	Distancia genética entre loci
NR1116	0,0 cM
SR0002A	2,8 cM
alelo Ms	3,3 cM
SR0003B	2,2 cM
NR2525	----
Suma de distancias genéticas	8,3 cM
Los alelos Ms y ms muestran esencialmente las mismas distancias.	

Será evidente para las personas expertas en la técnica que el uso combinado de ambos marcadores permitirá el genotipado fiable del rasgo de Ms en colza como se describe aquí anteriormente.

Ejemplo 7: Identificación de marcadores moleculares ligados al alelo restaurador de RHS (alelo Rf)

A fin de desarrollar marcadores para el locus de Rf, se llevó a cabo un BSA (Michelmore et al., 1991) en una población F₂ de 190 individuos que se segregan para la fertilidad de RHS. Esta población deriva del cruce entre una línea estéril de RHS (MsMsrf) (ID: 05056504, como se representa mediante la muestra de semillas depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480) y una línea restauradora (msmsRfRf) (ID: NK FAIR). Puesto que el locus de Ms para esterilidad masculina se segrega igualmente en este cruce, los individuos de plantas msms fértiles se eliminan de la población antes de la identificación mediante BSA basándose en el genotipo obtenido para los marcadores de las SSR NR1116 y NR2525 como se describen en el Ejemplo 5. En la subpoblación de 190 individuos que comprenden sólo plantas MsMs y Msms, la segregación para la fertilidad se ajustó a la relación 3:1 esperada para un gen dominante único. Se ensayó un conjunto de 1225 marcadores de microsatélites (SSR) para el polimorfismo entre ambas líneas parentales, así como entre agrupamientos de plantas F₂ estériles masculinas y fértiles masculinas. Se analizaron tres agrupamientos fértiles masculinos y estériles masculinos diferentes. Los agrupamientos consistieron en una mezcla de muestras de hoja procedentes de 10 plantas F₂ fértiles o 10 plantas F₂ estériles. El BSA describió 37 SSR polimórficas entre ambas líneas parentales y entre los agrupamientos de las plantas F₂ estériles masculinas y fértiles masculinas. Estas 37 SSR se genotiparon subsiguientemente en el conjunto de la población F₂ y se cartografiaron usando Mapmaker/Exp (versión 3.0b). El genotipo del alelo Rf se predijo según el fenotipo observado: las plantas fértiles masculinas pueden ser "RfRf" o "RfRf", pero las plantas estériles masculinas son siempre "rfRf". Por lo tanto, el alelo Rf se

cartografió como un marcador dominante. Los resultados del cartografiado revelaron dos SSR, NR2219 (SEC ID NO: 23) y NR3454 (SEC ID NO: 26), que estaban estrechamente ligadas al gen de fertilidad masculino (Rf) en el cromosoma N19 (Tabla 8). De hecho, NR2219 y NR3454 aparecen a una distancia genética de 10,2 cM y 26,5 cM, respectivamente, en cada lado de Rf. Las distancias calculadas son esencialmente las mismas para el alelo tanto rf como Rf.

Las condiciones experimentales para el BSA o para el cartografiado de los marcadores de SSR consistieron en protocolos habituales bien conocidos por la persona experta en la técnica de marcadores moleculares, como ya se describe en el ejemplo 5.

Los cebadores usados para la amplificación del SSR NR2219 fueron los siguientes:

secuencia del cebador directo de NR2219:

5'-ATTATCCTCTCGCCATTTC-3' (SEC ID NO: 19)

secuencia del cebador inverso de NR2219:

5'-AAACTCCTGAACACCTCCTAC-3' (SEC ID NO: 20)

Los cebadores usados para la amplificación del SSR NR3454 fueron los siguientes:

secuencia del cebador directo de NR3454:

5'-GATGGTGATGGTGATAGGTC-3' (SEC ID NO: 24)

secuencia del cebador inverso de NR3454:

5'-GAAGAGAAGGAGTCAGAGATG-3' (SEC ID NO: 25)

SSR NR2219 consiste en una repetición TA de aproximadamente 27 unidades. El tamaño observado del alelo en el secuenciador ABI 3700 es 240,8 (+/- 0,4) pb para el alelo rf de la línea parental femenina (ID: 05056504, según se representa mediante la muestra de semillas depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480), en la que no se obtiene ninguna banda para la línea restauradora (NK FAIR: alelo Rf; alelo restaurador). En consecuencia, NR2219 se comportó como un marcador dominante en la población que se segrega: la presencia del alelo 240,8 (+/- 0,4) corresponde tanto al estado homocigoto como heterocigoto del alelo rf, mientras que la ausencia del alelo 240,8 (+/- 0,4) corresponde al estado homocigoto del alelo Rf. SSR NR3454 consiste en una repetición TCA de aproximadamente 4 unidades. El tamaño observado del alelo en el secuenciador AB13700 es 282 (+/- 0,38) pb para el alelo rf de la línea parental femenina (ID: 05056504, según se representa mediante la muestra de semillas depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480) y 290 (+/- 0,38) pb para la línea restauradora (NK FAIR: alelo Rf; alelo restaurador).

Tabla 8: Distancias de cartografiado calculadas entre Rf y los marcadores de flanco localizados en el cromosoma N19 usando Mapmaker (versión 3.0b). La distancia genética entre los marcadores se estima en centimorgan (cM), y es directamente proporcional al número de recombinantes encontrados en la población

Loci	Distancia genética entre loci
NR3454	26,5 cM
alelo Rf	10,2 cM
NR2219	----
Suma de distancias genéticas	36,7 cM

Ejemplo 8: Cartografiado fino del gen restaurador de RHS (gen Rf) a través de la detección de polimorfismo de una sola característica (SFP) en un GeneChip.

El cartografiado fino del gen restaurador de RHS (gen Rf) se logró a través de la hibridación de las Líneas Isogénicas Próximas (NIL) para el gen Rf en un Brassica Affymetrix® GeneChip patentado por Syngenta. El diseño de este Brassica GeneChip es un diseño personalizado, realizado por Affy-metrix®. El Genechip contiene 2,56 millones de sondas derivadas de 152.362 unigenes de

Brassica que representan *Brassica napus*, *Brassica rapa* o *Brassica oleracea*. Los unigenes consistieron en las secuencias de consenso consolidadas derivadas de los ensamblajes de Brassica EST en PlantGDB (www.plantgdb.org, versión 161 A para *Brassica napus* y *rapa*, 157a para *Brassica oleracea*). Las secuencias de consenso consolidadas se obtuvieron fusionando los tres ensamblajes usando el programa cd-hit (<http://bioinformatics.ljcrf.edu/cd-hit/>), con un umbral de 98% de identidad de secuencias. Cada secuencia de consenso se dividió en regiones de selección de sondas (PSR) de 150 bases de longitud. De media, se diseñaron 4 sondas por PSR, y 16 sondas por transcrito (sólo sondas de emparejamiento perfecto) a lo largo de todo el transcrito, evitando fronteras intrón/exón. Las restricciones aplicadas para el diseño de sondas aseguró la unicidad de la secuencia de las sondas, eficiencias de hibridación comparables y eliminación de las sondas que se hibriden de forma cruzada como se recomienda por Affymetrix. A fin de permitir estimar señales de fondo, se incluyeron en el chip 17.000 sondas antígenómicas.

Para este experimento se usaron ocho parejas de Líneas Isogénicas Próximas. Estas ocho parejas consistieron en 8 líneas de colza diferentes (líneas restauradoras; alelo Rf; alelo restaurador) y sus líneas isogénicas próximas, en las que el alelo mantenedor (alelo rf) se introgresó a través de un retrocruzamiento y después se fijó mediante cinco autofecundaciones sucesivas (Tabla 9). El nivel de isogenicidad de las líneas se evaluó a través del genotipado de cincuenta y cinco marcadores de SSR polimórficos bien distribuidos a lo largo de los diecinueve cromosomas de *Brassica napus*.

Tabla 9: Lista y características de las 16 NIL usadas para el cartografiado fino de Rf (véase Ejemplo 8)

Tipo de NIL:	Líneas restauradoras	Líneas mantenedoras	Porcentaje de isogenicidad entre líneas
Genotipo Rf:	RfRf	Rfrf	
Pareja de NIL NO:1	ID: ROXET	ID: 06558782	87%
Pareja de NIL NO:2	ID: NK NEMAX	ID: 06558815	82%
Pareja de NIL NO:3	ID: RNX1208	ID: 06558736	77%
Pareja de NIL NO:4	ID: NK BEAMER	ID: 06558524	56%
Pareja de NIL NO:5	ID: RNX1302	ID: 06558592	75%
Pareja de NIL NO:6	ID: NK PASSION	ID: 06558614	71%
Pareja de NIL NO:7	ID: NK FAIR	ID: 06558591	63%
Pareja de NIL NO:8	ID: SMART	ID: 06558721	67%

Cada línea individual se hibridó dos veces en el chip génico, excepto para las líneas de la pareja de NIL nº: 1, para las cuales se llevaron a cabo 6 hibridaciones dos veces a fin de obtener una significancia estadística suficiente. Esto añade hasta un número total de 36 chips usados para este experimento. La preparación del ADN y el marcado, hibridación y barrido del chip, y la normalización de los datos se han llevado a cabo como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Publicada WO 2007/005305, incorporada aquí como referencia en su totalidad.

Para el análisis de datos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) comparando los resultados de hibridación de todas las líneas restauradoras (líneas RfRf) con todas las líneas mantenedoras (líneas rfrf), de forma que las 36 hibridaciones individuales se analizaron como 18 replicaciones de genotipos RfRf y 18 replicaciones de genotipos rfrf. Esta estrategia conduce a una potencia estadística incrementada. El umbral del valor alfa escogido para declarar un SFP como significativo, queriendo decir que la señal de hibridación entre las líneas RfRf y rfrf es estadísticamente diferente, se calculó con el test de Bonferroni. La corrección de Bonferroni es una corrección de comparación múltiple usada cuando se están realizando simultáneamente varios test estadísticos dependientes o independientes (mientras un valor alfa dado puede ser apropiado para cada comparación individual, no es para el conjunto de todas las comparaciones). A fin de evitar falsos positivos, es necesario reducir el valor de alfa para dar cuenta del número de comparaciones que se están llevando a cabo. Por lo tanto, el valor alfa teórico de 0,05 se dividió entre el número de unigenes

en el GeneChip: $0,05/152362 = 3,3 \cdot 10^{-7}$. Este umbral conduce a 55 SFP significativos que representan 30 unigenes de Brassica, denominados como los genes candidatos de Brassica.

Los 30 genes candidatos de Brassica se validaron adicionalmente explotando la sintenia entre los genomas de *Brassica* y *Arabidopsis thaliana*. Un análisis de TBLASTX de las secuencias nucleotídicas de los unigenes de Brassica frente a la base de datos de proteínas de *Arabidopsis thaliana* de TAIR permitió identificar los homólogos de *Arabidopsis thaliana* para 23 genes candidatos de Brassica. Subsiguientemente, los 23 genes candidatos de Brassica se proyectaron en el genoma de Arabidopsis basándose en la posición física en los homólogos de Arabidopsis (Figura 11), lo que dio como resultado la identificación de un racimo de 14 genes de Arabidopsis en el cromosoma 5. Puesto que se predice que los unigenes de Brassica se sitúan alrededor del locus Rf, se puede asumir que el gen Rf está localizado en esta región sinténica de 1,77 millones de pares de bases en Arabidopsis. En la Tabla 10 se especifica la correspondencia entre los 14 genes de Arabidopsis y los 14 genes candidatos de Brassica.

Tabla 10: Correspondencia entre los 14 genes de Arabidopsis cartografiados en un racimo en el cromosoma 5 y su homólogo de genes candidatos de Brassica.

ID del gen de Arabidopsis	Posición física (pb)	ID del unigen de Brassica (fuente GBD vegetal)	Anotación del gen de Arabidopsis
AT5G17440	5751705	PUT-161a-Brassica_napus-59218	Proteína que contiene el dominio del término LUC7N
AT5G18350	6076548	PUT-161a-Brassica_napus-113367	Proteína de resistencia a enfermedades (clase TIR-NBS-LRR), putativa
AT5G18840	6214517	PUT-161a-Brassica_napus-61265	Transportador de azúcar, putativo
AT5G18900	6305255	PUT-161a-Brassica_napus-98270	Oxidoreductasa, proteína de la familia de 20G-Fe (II) oxigenasa
AT5G18900	6305255	PUT-161a-Brassica_napus-64108	Oxidoreductasa, proteína de la familia de 20G-Fe (II) oxigenasa
AT5G18920	6310457	PUT-161a-Brassica_napus-116958	Proteína desconocida
AT5G19070	6376455	PUT-161a-Brassica_napus-212137960	Proteína desconocida
AT5G19460	6557383	PUT-161a-Brassica_napus-93955	ATNUDT20 (homólogo 20 de Arabidopsis thaliana Nudix hidrolasa)
AT5G19460	6557383	PUT-161a-Brassica_napus-20713	ATNUDT20 (homólogo 20 de Arabidopsis thaliana Nudix hidrolasa)
AT5G19450	6557383	PUT-161a-Brassica_napus-98091	CPK7 (PROTEÍNA CINASA 7 DE DOMINIO DE CALMODULINA)
AT5G19480	6572515	PUT-161a-Brassica_napus-112386	Proteína desconocida
AT5G22460	7444530	PUT-161a-Brassica_rapa- 6777	Proteína de la familia de esterasa/lipasa/tioesterasa
AT5G22500	7472285	PUT-161 a-Brassica_	Acil CoA reductasa,

		napus-59425	putativa/proteína de esterilidad masculina, putativa
AT5G22650	7537143	PUT-161a-Brassica_napus-116246	HD2B (HISTONA DESACETILASA 2B)

Los 14 genes candidatos de Brassica enunciados en la Tabla 10 se exploraron subsiguientemente como dianas para el desarrollo de marcadores. Puesto que no se conoce la naturaleza exacta del polimorfismo detectado en el chip, se adoptó la tecnología de polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP) para el genotipado y el cartografiado subsiguiente. La población que se segrega para Rf que se usó para este fin es la misma como se describe en el Ejemplo 7. Para cada gen candidato de Brassica, se diseñaron cebadores que abarcan la región de sondas para la cual se identificó el SFP. Se sintetizaron cebadores directos con una cola M13F (5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3'; SEC ID NO: 27) añadida al extremo 5', y los cebadores inversos tenían una cola M13R (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'; SEC ID NO: 28) en el extremo 5'. Las reacciones de PCR primarias se llevaron a cabo en un volumen final de 15 µl, que comprende 5 µl de ADN genómico a una concentración de 5 ng/µl, 1,5 µl de tampón de reacción 10X, 1,2 µl de 10 mM de los dNTP, 0,5 µl de 50 mM de MgCl₂, 0,3 µl de cada cebador a una concentración de 10 µM, 0,12 µl de Invitrogen Taq platinum (5U/µl). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ABI GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones de ciclado térmico para la PCR primaria consisten en una incubación inicial de 2 minutos a 94°C para activar la Taq polimerasa, seguido de 35 ciclos de amplificación de desnaturalización durante 3 segundos a 94°C, de la hibridación durante 30 segundos a 55°C, y alargamiento durante 30 segundos a 72°C. La reacción de PCR se terminó con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los productos de la PCR se diluyeron 100 veces, y se llevó a cabo una segunda PCR usando 5 µl del producto diluido como molde y 0,4 µl de la cola marcada con M13F como cebador directo PET-5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3' (SEC ID NO: 27) y 0,4 µl de la cola marcada con M13R: FAM-5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEC ID NO: 28) como cebador inverso, cada uno a una concentración de 10 µM. Aparte de la concentración de los cebadores y de la temperatura de hibridación que se ajustó a 50°C, las condiciones experimentales para las reacciones de PCR secundarias fueron las mismas que para las reacciones primarias.

El análisis de SSCP se llevó a cabo en un analizador genético ABI 3130xl. Antes de cargar y hacer pasar las muestras, se añadieron 0,2 µl de patrón de tamaño Genescan 500LIZ y 9 µl de formamida Hi-Di, ambos de Applied Biosystems, a 2 ul de una dilución 40 veces el producto de PCR final. La mezcla se desnaturalizó durante 5 minutos a 95°C y se enfrió en hielo durante 3 minutos para evitar la rehibridación. El polímero de electroforesis consistió en el polímero de análisis de conformación de POP (CAP) de ABI a una concentración de 7,2% preparado como se recomienda por el proveedor. Las muestras se cargaron y se hicieron migrar en un dispositivo capilar de 36 cm mientras que se aplican los siguientes parámetros: temperatura del horno: 25°C, Poly_Fill_Vol: 6500 etapas, estabilidad de la corriente: 5 µA, voltaje previo al experimento 15 kV, tiempo previo al experimento 180 s, voltaje de inyección: 1,2 kV, tiempo de inyección: 24 s, número de etapas de voltaje 40 nk, intervalo de etapa de voltaje 15 s, tiempo de retraso de los datos 1 s, voltaje del experimento 15 kV y tiempo del experimento: 3000 s. Los datos recogidos durante la electroforesis se analizaron con el GeneMapper software v4.0 de ABI.

Entre los 14 genes candidatos de Brassica ensayados, el unigene ID: PUT-161a-Brassica_napus-59218 (SEC ID NO: 31) se colocó próximo al gen Rf, a una distancia de 4,1 cM por debajo de Rf. La Figura 12 presenta el tipo de polimorfismo observado para este locus en la población que se segrega. El marcador de SSCP correspondiente permitió así estrechar el intervalo de cartografiado para Rf, y representa el marcador más próximo actualmente disponible (Tabla 11).

Secuencia del cebador directo de PUT-161a-Brassica_napus-59218:

5'-ACAGAGACAGAGGAGGTAGC-3' (SEC ID NO: 29)

Secuencia del cebador inverso de PUT-161a-Brassica_napus-59218:

5'-ATCATAATCCCTCGTTCTTT-3' (SEC ID NO: 30)

Tabla 11: Distancias de cartografiado calculadas entre Rf y los marcadores de flanqueo localizados en

el cromosoma N19 usando Mapmaker (versión 3.0b). La distancia genética entre los marcadores se estima en centimorgan (cM), y es directamente proporcional al número de recombinantes encontrados en la población

Loci	Distancia genética entre loci
NR3454	26,5 cM
alelo Rf	4,1 cM
PUT-161a-Brassica_napus-59218	----
Suma de distancias genéticas	30,6 cM

5 Ejemplo 9: Selección de marcadores para las plantas estériles masculinas y fértiles masculinas en la población que segrega el sistema RHS.

Una posibilidad para determinar si una planta, por ejemplo una planta F_2 que resulta de un cruce entre una línea estéril de RHS y una línea restauradora, es estéril masculina o fértil masculina sería estudiar esta planta con marcadores ligados a los alelos Ms (como se describe en los Ejemplos 1 y 2) y Rf (como se describe en el Ejemplo 3).

Ejemplo 9.1: Predicción del genotipo Ms

El genotipo de los marcadores NR1116, NR2525, SR0002A y SR0003B permitió la predicción del genotipo Ms (Tabla 2; Fig. 5).

Tabla 12: Características de alelos subrayados para NR1116 y NR2525, y asignación del alelo Ms y ms. “Ms” es el alelo estéril masculino para el gen de esterilidad, y “ms” es el alelo fértil masculino para el gen de esterilidad. Los tamaños de los alelos dados se han puntuado en un secuenciador ABI 3700. La calibración del peso del fragmento aparente se realizó frente al patrón de peso molecular ROX 500 (Applied Biosystems).

Loci	alelo Ms/ms	Tamaño del alelo (pb)
NR1116	ms	94 (+/-0,9)
	Ms	96,7 (+/-1)
	ms	110,4 (+/- 0,5)
	ms	112,3 (+/- 0,4)
	ms	116,3 (+/- 0,4)
NR2525	ms	183,8 (+/- 0,4)
	Ms	192,8 (+/- 0,3)
	-	194,6 (+/- 0,5)

Si sólo hay alelos estériles masculinos, se puede predecir que la planta es homocigota para la esterilidad masculina (MsMs). Si hay alelos tanto estériles masculinos como fértiles masculinos, se puede predecir que la planta es heterocigota para la esterilidad masculina (Msms). Si sólo hay alelos fértiles, se puede predecir que la planta es homocigota para la fertilidad masculina (msms).

Ejemplo 9.2: Predicción del genotipo Rf

El marcador NR3454, NR2219 y PUT-161a-Brassica_napus-59218 permitió la predicción del genotipo Rf (Tabla 12). Para el marcador de SSCP PUT-161a-Brassica_napus-59218, debido a que la tecnología usada, no es posible dar un tamaño del alelo a puntuar. Siempre se ha de referir al polimorfismo observado en las líneas restauradora “RfRf” y mantenedora “rfrf” referenciadas (Figura 13).

Tabla 13: Características de alelos subrayados para NR2219, y asignación del alelo Rf y rf. "Rf" es el alelo fértil del alelo restaurador, y "rf" es el alelo estéril del alelo restaurador. Los tamaños de los alelos dados se han puntuado en un secuenciador ABI 3700. La calibración del peso del fragmento aparente se realizó frente al patrón de peso molecular ROX 500 (Applied Biosystem).

Loci	Alelo Rf/rf	Tamaño del alelo (pb)
NR2219	Rf	Ausencia de 240,8 (+/- 0,4)
	rf	240,8 (+/- 0,4)
NR3454	Rf	290 (+/- 0,38)
	rf	282 (+/- 0,38)

Si sólo existen los alelos "rf" mantenedores, se puede predecir que la planta es homocigota para la esterilidad masculina (rfrf). Si existen alelos tanto mantenedores como restauradores, se puede predecir que la planta es heterocigota para la esterilidad masculina (Rfrf). Si sólo existen alelos restauradores "Rf", se puede predecir que la planta es homocigota para la esterilidad masculina (RfRf).

Ejemplo 9.3: Predicción del fenotipo estéril masculino y fértil masculino

Según el genotipo Ms y el genotipo Rf predichos, se puede predecir la esterilidad masculina o fertilidad masculina de la planta (Tabla 14). Puesto que el alelo restaurador (Rf) es dominante en el gen de la esterilidad masculina (Ms), cada vez que se tenga el alelo de fertilidad masculina en Rf, la planta es fértil masculina. La esterilidad masculina se puede lograr sólo si el alelo de fertilidad en Rf está ausente y está presente el alelo de esterilidad masculina en Ms.

Tabla 14: Determinación del fenotipo estéril masculino y fértil masculino según el genotipo en el gen de esterilidad masculina (Ms) y alelo restaurador (Rf).

Fenotipo	Genotipo Rf	Genotipo Ms
fértil	RfRf	MsMs
fértil	RfRf	Msms
fértil	RfRf	msms
fértil	Rfrf	MsMs
fértil	Rfrf	Msms
fértil	Rfrf	msms
fértil	rfrf	msms
estéril	rfrf	Msms
estéril	rfrf	MsMs

Ejemplo 10: Autofecundación de plantas estériles masculinas de RHS:

Para lograr la producción de polen, plantas estériles masculinas de RHS se tratan preferiblemente con una temperatura diurna de aproximadamente 38°C de día (16 horas) y una temperatura nocturna de aproximadamente 20°C (8 horas) durante 7 días después de que la primera flor se abra. Este tratamiento se llevó a cabo en una habitación acondicionada por aire (fabricante del acondicionamiento por aire: www.redekerkaeltetechnik.de), que estaba equipada con ocho lámparas de invernadero de 400 W Phillips SON-TP 400W Agro. Después de una semana de tratamiento térmico, las plantas se devolvieron al invernadero y se cultivaron en condiciones naturales de al menos 18°C de temperatura diurna y 14°C de temperatura nocturna. Siete a 14 días después del tratamiento térmico descrito, las plantas mostraron flores con anteras agrandadas. Esas anteras pudieron liberar polen. El polen se usó para polinizar flores estériles masculinas y fértiles masculinas.

de la misma planta. Se aislaron plantas adyacentes usando bolsas de plástico (Cryovac Crispac Beutel Super Micro Lochung 360 x 830 mm, suministrador: Baumann Saat-zuchtbedarf D-74638 Waldenburg) para evitar la polinización incontrolada. Las plantas polinizadas mostraron un desarrollo normal de la vaina, y se pudieron cosechar semillas después de secar las plantas de la misma manera que se hace con las plantas de colza fértiles normales.

Ejemplo 11: Producción de líneas de semillas básicas femeninas heterocigotas

Semillas de plantas fértiles masculinas F_4 y plantas estériles masculinas F_4 procedentes del Ejemplo 10 se sembraron en tiendas de aislamiento. Las tiendas tenían 20 m de longitud y 8 m de anchura. El material de cubierta era una red a prueba de insectos, con un tamaño de malla de 16 x 10. El diseño fue: una fila masculinas seguido de 6 filas femeninas, 4 filas masculinas, 6 filas femeninas y nuevamente una fila masculina. Cada fila se sembró con aproximadamente semilla propia de planta individual de 1,5 g. Las tiendas se cubrieron antes de que comenzara la floración. Las plantas femeninas se seleccionaron para plantas fértiles masculinas antes de la floración. A pesar de todo el cuidado durante el proceso de autofecundación, no se puede excluir completamente la polinización cruzada por el polen restaurador procedente del invernadero. Las plantas fértiles masculinas se pudieron detectar ya que no mostraron el fenotipo de aborto de yema de las estériles masculinas. Las plantas estériles masculinas comenzaron a florecer más tarde que las fértiles debido al aborto de la yema. A fin de sincronizar la floración, las plantas fértiles masculinas se retrasaron en la floración podando manualmente el brote principal al comienzo de la floración. Después de la floración, se retiraron las dos filas de polinizadoras en el borde de la tienda. Las dos parcelas de 6 filas de plantas estériles masculinas femeninas y las 4 filas de plantas masculinas se separaron manualmente para evitar mezclar las semillas. Después de la maduración, las plantas femenina estéril masculina y la mantenedora fértil masculina se cosecharon separadamente. En 2005, el rendimiento de semillas de la femenina semilla básica en una tienda fue 11,9 kg de semilla sin limpiar. Las plantas mantenedoras en la misma tienda produjeron 8,9 kg.

La producción de semilla prebásica también se puede realizar en una producción de campo. Por lo tanto, la distancia mínima al siguiente campo de colza debe ser 5 km. También se debe asegurar de que no hay plantas de colza ni crucíferas fértiles en un círculo de 5 km, que se puedan polinizar de forma cruzada con la colza. Es importante comprobar los bordes de las carreteras, en los que a menudo pueden crecer las plantas de colza.

Ejemplo 12: Desarrollo de híbridos

Los híbridos se produjeron en una producción de campo abierto. La femenina es una femenina de semilla básica como se describe en el Ejemplo 4. La restauradora es cualquier línea de colza convencional. La técnica es un crecimiento en tiras, con un borde de al menos 3 m de plantas restauradoras alrededor del campo. Dentro del campo, la relación de masculina:femenina está entre 1:3 a 1:4, estando una franja entre 2,5 a 4 m, dependiendo de la máquina taladradora del granjero. Antes de la floración, el 50% de las plantas restauradoras se han de cortar a alrededor de 50 cm de altura. Esto se puede hacer mediante un cortador de hierba muy convencional. Antes de la floración, es necesario seleccionar las plantas estériles masculinas para plantas fértiles masculinas como se describe anteriormente en el Ejemplo 4. Se ha de asegurar que la cantidad de plantas fértiles en las franjas estériles no excede 0,2% en total, para asegurar una tasa de hibridación de alrededor de 90%. La distancia de aislamiento ha de ser de 200 m. Es esencial controlar la temperatura medioambiental durante la floración. Si la temperatura supera 20°C, las plantas estériles masculinas femeninas se han de comprobar en busca de flores fértiles masculinas en las siguientes tres semanas. Después de la floración, se ha de retirar la polinizadora para asegurar la pureza de la semilla híbrida F_1 cosechada.

Ejemplo 13: Comportamiento de los híbridos

Los híbridos se ensayaron en ensayos de rendimiento en diferentes países. Los ensayos se llevaron a cabo en al menos 3 replicaciones con un tamaño de parcela de al menos 15 m². Las parcelas se cosecharon, y se recalculó el rendimiento de parcela en dt/ha. Las semillas se analizaron usando tecnología de NIRS en un FOSS NIR Systems Modelo 5000-c. El principio de esos análisis se describe en Williams y Sobering (1992). Los resultados de esos ensayos en Alemania y Polonia se dan en la Tabla 15 (RXN: diversas semillas híbridas de la presente invención; msl: semillas híbridas a base de NPZ msl; Ogura: semillas híbridas de Inra Ogura). El comportamiento en rendimiento de semillas relativo es al menos tan bueno, si no mejor que, el comportamiento de los sistemas híbridos actualmente disponibles.

Tabla 15: Comportamiento de híbridos de RHS en 2006 (Alemania y Polonia) y 2007 (Alemania, Polonia y Francia)

Variedad	n° de localizaciones	Sistema	rendimiento absoluto de semillas en dt/ha	rendimiento relativo de semi-las	% de contenido de aceite en semilla a 9% de humedad	% de contenido de proteína en semilla a 9% de humedad	contenido de GSL en µmoles por g de semilla a 9% de humedad
Alemania 2006							
TAURUS	7	msl	49,30	101,3	43,0	19,3	11,1
Elektra	7	msl	48,00	98,7	42,0	19,6	11,0
RNX 3401	7	RHS	51,30	105,4	41,8	20,2	10,9
RNX 3402	7	RHS	50,80	104,4	41,4	19,9	11,4
RNX 3501	7	RHS	48,60	99,9	40,4	20,4	13,0
RNX 3504	7	RHS	52,60	108,1	40,9	19,7	11,9
RNX 3505	7	RHS	51,10	105,0	40,6	20,3	11,3
RNX 3506	7	RHS	50,50	103,8	40,8	20,0	11,1
Polonia 2006							
ES SAPHIR	4	INRA Ogura	46,09	99,0	43,1	18,8	33,4
Elektra	4	msl	46,98	101,0	44,4	17,9	12,7
RNX 3401	4	RHS	47,89	102,9	44,2	17,7	11,3
RNX 3402	4	RHS	48,62	104,5	44,6	17,5	13,7
RNX 3403	4	RHS	48,83	104,9	44,3	17,8	14,3
RNX 3404	4	RHS	49,43	106,2	44,3	17,9	13,6
RNX 3405	4	RHS	45,89	98,6	41,8	19,0	12,0
RNX 3407	4	RHS	44,97	96,6	43,4	18,6	16,6
RNX 3501	4	RHS	48,15	103,5	42,6	18,3	12,3
RNX 3502	4	RHS	47,99	103,1	43,9	18,8	14,9
RNX 3504	4	RHS	49,32	106,0	43,0	18,0	12,2
RNX 3505	4	RHS	49,74	106,9	43,2	18,6	11,0
RNX 3506	4	RHS	48,28	103,7	43,2	18,1	9,8
RNX 3507	4	RHS	48,49	104,2	42,3	18,4	12,1
Alemania							

Variedad	n° de localizaciones	Sistema	rendimiento absoluto de semillas en dt/ha	rendimiento relativo de semi-las	% de contenido de aceite en semilla a 9% de humedad	% de contenido de proteína en semilla a 9% de humedad	contenido de GSL en µmoles por g de semilla a 9% de humedad
2007							
Taurus	9	msl	44,95	103,7	43,9	18,9	14,6
Elektra	9	msl	41,76	96,3	42,7	19,4	21,0
RNX 3401	9	RHS	49,84	115,0	42,1	19,8	14,3
RNX 3404	9	RHS	49,09	113,2	42,1	19,4	16,5
RNX 3504	9	RHS	49,54	114,3	42,2	18,7	13,7
RNX 3621	9	RHS	50,53	116,5	41,7	18,9	13,2
RNX 3622	9	RHS	49,92	115,1	42,1	19,7	14,8
RNX 3623	9	RHS	50,14	115,6	42,7	19,4	14,7
RNX 3624	9	RHS	48,63	112,2	42,9	18,8	15,5
Polonia							
2007							
Elektra	9	msl	38,68	94,4	41,0	20,4	18,5
NELSON	9	INRA Ogura	43,29	105,6	39,9	20,2	22,6
RNX 3401	9	RHS	42,81	104,5	40,6	20,7	15,5
RNX 3402	9	RHS	45,18	110,2	41,9	19,4	14,9
RNX 3403	9	RHS	46,65	113,8	42,0	19,3	14,2
RNX 3404	9	RHS	44,04	107,5	41,2	19,9	16,2
RNX 3504	9	RHS	45,68	111,4	40,6	19,5	15,8
RNX 3505	9	RHS	43,38	105,8	40,3	20,4	14,7
RNX 3507	9	RHS	44,04	107,5	39,0	20,4	16,7
RNX 3621	9	RHS	44,66	109,0	40,9	19,5	13,8
RNX 3622	9	RHS	45,02	109,9	41,2	20,3	14,9
RNX 3623	9	RHS	44,99	109,8	41,6	20,0	15,2
RNX 3624	9	RHS	44,58	108,8	42,3	19,0	15,0
RNX 3625	9	RHS	44,50	108,6	41,1	20,0	14,0
RNX 3726	9	RHS	45,17	110,2	40,6	19,4	14,6
Francia							
2007							

Variedad	n° de localizaciones	Sistema	rendimiento absoluto de semillas en dt/ha	rendimiento relativo de semi-llas	% de contenido de aceite en semilla a 9% de humedad	% de contenido de proteína en semilla a 9% de humedad	contenido de GSL en µmoles por g de semilla a 9% de humedad
EXAGON E	11	INRA Ogura	36,83	102,6	43,7	18,6	19,5
MENTIO N	11	msl	34,94	97,4	43,2	17,0	14,4
RNX 3404	11	RHS	35,71	99,5	44,3	17,4	15,3
RNX 3403	11	RHS	35,94	100,1	44,8	16,8	14,2
RNX 3621	11	RHS	35,83	99,9	43,6	17,4	13,1

REFERENCIAS

1. Abbadi, A., F. Domergue, J. Bauer, J.A. Napier, R. Welti, U. Zähringer, P. Cirpus, y E. Heinz. 2004. *Plant Cell* 16:2734-2748.
- 5 2. Abravaya K., Huff J., Marshall R., Merchant B., Mullen C., Schneider G., y Robinson J. (2003) *Clin Chem Lab Med.* 41:468-474.
3. Ackman, R.G.1990. Canola fatty acids- an ideal mixture for health, nutrition, and food use. p. 81-98. In F. Shahidi (ed.) *Canola and rapeseed: Production, chemistry, nutrition, and processing technology*. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.
- 10 4. Aherne FX, A.J. Lewis. The nutritive value of faba beans and low glucosinolate rapeseed meal for swine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1978, 105, p. 453-471.
5. Atanassova B. 1999. Functional male sterility (ps-2) in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and its application in breeding and hybrid seed production. *Euphytica* 107: 13-21.
6. Barany, Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 88:189 193 (1991)
7. Becker H.C., Damgaard C., Karisson B. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84, 303-306.
- 15 8. Becker, H. C. y Link, W. 2000: Heterosis and hybrid breeding. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 48: 319-327.
9. Beckmann, J. S. y Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet* 67: 35-43.
- 20 10. Botstein, D., White, R. L., Skolnik, M. y Davis, R. W. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
11. Brandle, J. E. y McVetty, P. B. E. (1990): *Canadian Journal of Plant Science* 70: 935-940.
12. Brandle, J.E. y McVetty, P.B.E. (1989): *Crop Science*, 29: 1191-1195.
- 25 13. Burton, J.W., J.F. Miller, B.A. Vick, R. Scarth, y C.C. Holbrook. 2004. Altering fatty acid composition in oil seed crops. *Adv. Agron.* 4:273-306.
14. Cahoon, E.B. 2003. *AgBioForum*, 6:11-13.
15. Cahoon, E.B., K.G. Ripp, S.E. Hall, y A.J. Kinney. 2001. *J. Biol. Chem.* 276:2637-2643.
- 30 16. Chen, F. X., B. C. Hu, C. Li, Q. S. Li, W. S. Chen, y M. L. Zhang, 1998: Genetic studies on GMS in *Brassica napus* L. I. Inheritance of recessive GMS line 9012A. *Acta Agron. Sin.* 24, 431-438.
17. Chen, Z.Z., S. Snyder, Z.G. Fan y W.H. Loh. 1994 *Plant Breeding* 113: 217-221
18. Daskalov S. 1972. *Proc. Eucarpia Meet. Capsicum* 7: 202-210.
19. Daun JK *et al.*, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 60:1751-1754 (1983)
20. Dehesh, K. 2004. Solicitud de patente de los Estados Unidos de América 20040132189.
- 35 21. Dehesh, K., A. Jones, D.S. Knutzon, y T.A. Voelker. 1996. *Plant J.* 9:167-172.
22. Delourme R, A. Bouchereau, N. Hubert, M. Renard, B.S. Landry. *Theoretical Applied Genetics*, vol. 88, p. 741-748, 1994.
23. Delourme R. y F. Eber. *Theoretical and Applied Genetics* vol. 85, p. 222-228, 1992.
- 40 24. Delourme R., F. Eber, M. Renard. "Breeding Double Low Restorer Lines in Radish Cytoplasmic Male Sterility of Rapeseed (*Brassica Napus* L.)." *Proc. 9th Int. Rapeseed Conf.* Cambridge. England (1995).
25. Delourme R., F. Eber, M. Renard. "Radish Cytoplasmic Male Sterility in Rapeseed: Breeding Restorer Lines with a Good Female Fertility." *Proc 8th Int. Rapeseed Conf.*,

- Saskatoon, Canada. 1506-1510 (1991).
26. Denis M., Delourme R., Gourret J. P., Mariani C., y Renard M. *Plant Physiol.* 101, 1295-1304 (1993).
27. Dickson MH. 1970. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95: 13-14.
- 5 28. Eskin, N.A.M., B.E. McDonald, R. Przybylski, L.J. Malcolmson, R. Scarth, T. Mag, K. Ward, y D. Adolph. 1996. Canola oil. p. 1-96. In Y. H. Hui (ed.) *Edible oil and fat products: Oil and oil seeds*. John Wiley & Sons Inc., Nueva York.
29. Facciotti, M.T., P.B. Bertain, y L. Yuan. 1999. 17:593-597.
- 10 30. Fletcher, R.; Coventry, J. y Scott, L.S. (1998): *Doubled Haploid Technology for Spring and Winter Brassica napus*. Revised Edition. University of Guelph Toronto, Department of Plant Agriculture, Technical Bulletin, OAC Publication.
31. Förster, J. y Knaak, C. 1995: Estimation of the genetic distance of 21 winter rapeseed varieties by RAPD analysis in comparison to RFLP results. *Proc. 9th Int. Rapeseed Congress*, 4 - 7 de julio de 1995, Cambridge, UK.
- 15 32. Frauen, M. (1999a) *Ernährungsdienst* 46:13.
33. Frauen M, J. Noack, A. Girke, W. Paulmann (2007): Ten years experience of development and cultivation of winter oilseed rape hybrids in Europe based on the MSL system *Proc. 12th. Int. Rapeseed Congress*, Wuhan, China (2007)
34. Frauen, M., y A. Baer (1996) *GCIRC Bulletin* 12:47-51.
- 20 35. Fu TD (1981) *Eucarpia Cruciferae Newsl* 6: 6D7
36. Girke A., Ph.D Thesis (Dissertation) Göttingen, May 2002 "Neue Genpools aus resynthesisiertem Raps (*Brassica napus* L.) für die Hybridzüchtung"
37. Grant, I. y Beversdorf, W. D. (1985): *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 27: 472-478.
- 25 38. Gunderson K.L., Steemers F.J., Ren H., *et al.* (2006) *Methods Enzymol.* 410:359-76
39. Hatanaka, T., R. Shimizu, y D. Hildebrand. 2004. *Phytochemistry* 65:2189-2196.
40. Hawkins, D.J., y J.C. Kridl. 1998. *Plant J.* 13: 743-752.
41. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). *Genome Res* 6: 986-994
- 30 42. Heyn, F.U. 1976. Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. *Cruciferae Newsletter* 1: 15-16.
43. Hitz, W.D., C.J. Mauvis, K.G. Ripp, y R.J. Reiter. 1995. The use of cloned rapeseed genes for the cytoplasmic fatty acid desaturases and the plastid acyl-ACP thioesterases to alter relative levels of polyunsaturated and saturated fatty acids in rapeseed oil. p. 470-472. *En Proc. 9th Int. Rapeseed Cong.: Rapeseed today and tomorrow*, Cambridge, UK.
- 35 44. Horner HT and Palmer RG. 1995. *Crop Sci.* 35:1527-1535.
45. Hou, G. Z., H. Wang, y R. M. Zhang, 1990: Genetic study on genic male sterility (GMS) material No. 117A in *Brassica napus* L. *Oil Crop China* 2,7-10.
46. Hu SW *et al.* (2000) *Acta Agriculturae Boreali-orientalis Sinica* 9:90-94
47. Huang, Y.S., S.L. Pereira, y A.E. Leonard. 2004. *Biochimie* 86:793-798.
- 40 48. International Standard ISO 9167-1:1992(E). "Rapeseed - Determination of glucosinolates content - Part 1: Method using high-performance liquid chromatography."
49. Jaworski, J., y E.B. Cahoon. 2003. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:178-184.
50. Jones, A., H.M. Davies, y T.A. Voelker. 1995. *Plant Cell* 7:359-371.

51. Kaul MLH.1988. Male Sterility in Higher Plants. Monographs on Theor. Appl. Genet.10, Springer-Verlag, Berlin.
52. Knaak, C. 1996. Schätzung genetischer Distanzen mittels RFLP zur Identifikation von Genpools für die Hybridzüchtung bei Winterraps. Diss. Univ. Göttingen. Cuvillier Verlag Göttingen
53. Knutzon, D.S., G.A. Thompson, S.E. Radke, W.B. Johnson, V.C. Knauf, y J.C. Kridl. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2624-2628.
54. Kumar, Sanjeet, y P. K. Singh. Journal of New Seeds; Vol. 6, N° 4, 2004, p. 300-407. "Mechanisms for Hybrid Development in Vegetables."
55. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn W, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J (2000). Nucleic Acids Res 28: 655-661
56. Laga, B., J. Seurinck, T. Verhoye, y B. Lambert. 2004. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 57:87-92.
57. Landegren *et al.* Science 241:1077 1080 (1988)
58. Lardy GP, y M.S. Kerley. J. Anim. Sci. (1994), 72: 1936-1942.
59. Lefort-Buson, M., Guillot-Lemoine, B. y Dattee Y. (1987): Genome, 29: 413-418
60. Li SL, Y. X. Qian, y Z. H. Wu, 1985: Acta Agriculturae Shanghai 1, 1-12.
61. Li SL, Y. X. Qian, Z. H. Wu, y B. R. Stefansson, 1988: Can. J. Plant Sci. 68, 1115-1118.
62. Li SL, Z. J. Zhou, y X. R. Zhou, 1993: Acta Agriculturae Shanghai 9. 1-7.
63. Li SL, Z. J. Zhou, y X. R. Zhou, 1995: Acta Agriculturae Shanghai 11, 21-26.
64. Liu, Q., S.P. Singh, y A.G. Green. 2002. Plant Physiol. 129:1732-1743.
65. Livak, K.J., Marmaro, J., y Todd, J.A. 1995. Nat. Genet. 9:341-342.
66. Lühs, W., y W. Friedt. 1995. Breeding high-erucic acid rapeseed by means of Brassica napus resynthesis. p. 449-451. En Proc. 9th Int. Rapeseed Cong. (GCIRC), Cambridge, UK.
67. Makaroff (1989 Journal of Biol. Chem. 264: 11706-11713
68. Mariani C *et al.* (1992) Nature 357:384-387
69. Mathias R (1985) Z Pflanzenzüchtg. 94:170-173
70. McGuigan F.E., Ralston S.H. (2002) Psychiatr Genet. 12(3):133-6.
71. McVetty, P.B.E., R. Scarth, y S.R. Rimmer. 1999. MillenniUM01 summer rape. Can. J. Plant Sci. 79:251-252.
72. McVetty, P.B.E., S.R. Rimmer, y R. Scarth. 1998. Can. J. Plant Sci. 78:305-306.
73. Melchinger, A. E., y Gumber, R. K.1998: Overview of Heterosis and Heterotic Groups in Agronomic Crops. In: Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants. Crop Science Society of America, Madison, USA.
74. Michelmore RW, I. Paran y R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88:9828-9832
75. Mietkiewska, E., E.M. Giblin, S. Wang, D.L. Barton, J. Dirpaul, J.M. Brost, V. Katavic, y D.C. Taylor. 2004. Plant Physiol. 136:2665-2675.
76. Mollers C., M.C.M. Iqbal y G. Robbelen. 1994 Euphytica 75: 95-104.
77. Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 273 (1986)

78. Mündges, H., W. Köhler, W. Friedt. 1990. Identification of rapeseed cultivars (*Brassica napus*) by starch gel electrophoresis of enzymes. *Euphytica* 45: 179-187.
79. Nickerson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 87:8923-8927 (1990)
80. Nieuwhof M. 1968. *Euphytica* 17: 265-273.
- 5 81. Ogura, H. 1968. Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special reference on the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem Fac Agric Kagoshima Univ.* 6: 39-78.
82. Olivier M. (2005) *Mutat Res.* 573(1-2):103-10.
- 10 83. Pandian, A., Q. Liu, C. Hurlestone, S. Singh, P. Salisbury, y A. Green. 2004. Development of nutritionally superior *Brassica napus* and *B. juncea* oils using RNAi-mediated gene silencing. 4th Int. Crop Sci. Cong. Disponible en [http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/5/1/3/703_pandiana.htm](http://www.cropsscience.org.au/icsc2004/poster/5/1/3/703_pandiana.htm) (verificado el 23 de enero de 2006).
- 15 84. Paulmann, W. y Frauen, M. (1991): Einsatz von biotechnologischen Verfahren in der praktischen Rapszüchtung. Bericht der Arbeitstagung Saatzuchtleiter, Gumpenstein, 173-182
85. Paulmann, W. y Frauen, M. (1999) Proceedings of the 10th international Rapeseed Congress; <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/258.htm>
86. Pellán-Delourme, R. y Renard, M. 1988. *Genome* 30:234-238.
- 20 87. Pellán-Delourme, R., Eber, F., Renard, M. 1987. Male fertility restoration in *Brassica napus* with radish cytoplasmic male sterility. *Proc. 7th Int. Rapeseed Conf.*, Poznan, Polonia: 199-203.
88. Pelletier G., C. Primard. "Molecular. Phenotypic and Genetic Characterization of Mitochondrial Recombinants in Rapeseed." *Proc. 7 th Int. Rapeseed Conf. Poznan. Polonia* 113-118 (1987).
- 25 89. Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chetrit, R. Remy, P. Rousselle y M. Renard. 1983. *Mol Gen Genet* 191: 244-250.
90. Phatak SC y Jaworski CA. 1989. *HortScience* 24:1050.
91. Pinochet X *et al.* (2000) *OCL-Leagineux Corps Gras Lipides* 7:11-16
92. Pierik R (1999) *In vitro culture of higher plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- 30 93. Pleines, S., y W. Friedt. 1989. Genetic control of linolenic acid concentration in seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet* 78:793-797.
94. Przybylski, R. 2005. Canola oil: physical and chemical properties. Disponible en Canola Council of Canada http://www.canola-council.org/oii_tech.html (verificado el 23 de enero de 2006). Rakow, G. 2004. Species origin and economic importance of *Brassica*. p. 3-11. En E.C. Pua y C.J. Douglas (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 54 *Brassica*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Nueva York.
- 35 95. Rakow, G. y D. I. McGregor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50(10): 400-403, (1973).
96. Raney, J.P., G.F.W. Rakow, y T.V. Olson. 1999. Identification of *Brassica napus* germplasm with seed oil low in saturated fat. En *Proc. 10th Int. Rapeseed Cong.*: New horizons for an old crop, Canberra, Australia. Disponible en <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/502.htm> (verificado el 23 de enero de 2006).
- 40 97. Rapley R., Harbron S. (Eds.) (2004) Chichester. John Wiley & Sons Ltd.
98. Ratledge, Colin, Dawson, Peter y Rattray, James. 1984. *Biotechnology for the Oils and Fats Industry*. American Oil Chemists' Society, Champaign. 328 pp
- 45 99. Renard, M., Delourme, R., Vallée, P. y Pierre, J. 1997: *Acta Horticulturae* 459: 583-591.

100. Riaz A., U G., Quresh Z., Swati M.S., Quiros C.F. (2001) Plant Breed. 120, 411-15.
101. Rick CM. 1948. Hilgardia 18: 599-633.
102. Röbbelen, G. (1985): Züchtung von Hybridraps. Bericht der Arbeitstagung Saatzuchtler, Gumpenstein, 173-185
- 5 103. Röbbelen, G., y A. Nitsch. 1975. Z. Pflanzenzüchtg. 75:93-105.
104. Röbbelen, Gerhard. "Changes and Limitations of Breeding for Improved Polyenic Fatty Acids Content in Rapeseed." (capítulo 10) en "Biotechnology for the Oils and Fats Industry" editado por Colin Ratledge, Peter Dawson y James Rattray, American Oil Chemists' Society, (1984).
- 10 105. Rücker, B., y G. Röbbelen. 1995. Development of high oleic acid winter rapeseed. p. 389-391. En Proc. 9th Int. Rapeseed Cong., Cambridge, UK.
106. Rundfeldt H. 1981. Z Pflanzenzucht 44: 30-62.
107. Sambrook J y Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 15 108. Sauermann y Lamp, Landpost 7.6.1997; p.36 re.
109. Sawhney VK. 1983. J. Hered. 74: 51-54.
110. Scarth, R., y P.B. E. McVetty. 1999. Designer oil canola- a review of new food-grade Brassica oils with focus on high oleic, low linolenic types. En N. Wratten y P.A. Salisbury (ed.) Proc. 10th Int. Rapeseed Cong., Canberra, Australia.
20 <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/57.htm> (verificado el 23 de enero de 2006).
111. Scarth, R., P.B.E. McVetty, y S.R. Rimmer. 1995a. Mercury high erucic acid low glucosinolate summer rape. Can. J. Plant Sci. 75: 205-206.
112. Scarth, R., P.B.E. McVetty, S.A. Rimmer, y B.R. Stefansson. 1991. Hero summer rape. Can. J. Plant Sci. 71:865-866.
- 25 113. Scarth, R., P.B.E. McVetty, S.R. Rimmer, y J. Daun.1992. Breeding for special oil quality in canola/rapeseed: The University of Manitoba program, p. 171-176. En S.L. MacKenzie y D.C. Taylor (ed.) Seed oils for the future. AOCS Press, Champaign, IL
114. Scarth, R., S.R. Rimmer, y P.B.E. McVetty. 1995b. Apollo low linolenic summer rape. Can. J. Plant Sci. 75: 203-204.
- 30 115. Scarth R y Tang J.H. (2006) Modification of Brassica Oil Using Conventional and Transgenic Approaches. Crop Sci. 46:1225-1236.
116. Schierhott, A., y H.C. Becker. 1999. Genetic and environmental variability of high oleic acid content in winter oilseed rape. En Proc 10th int. Rapeseed Cong., Canberra, Australia. Disponible en <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/363.htm> (verificado el 23 de enero de 2006).
- 35 117. Schuster, W. (1969): Vergleich von zwei Zuchtverfahren in der Erhaltungszüchtung von Winterraps. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung 62: 47-62
118. Sernyk, J. L. y Stefansson, B. R. (1983): Heterosis in summer rape. Canadian Journal of Plant Science 63: 407-413.
- 40 119. Sharma, R., R.A. Aggarwal, R. Kumar, T. Mohapatra, y R.P. Sharma. 2002. Construction of an RAPD linkage map and localization of QTLs for oleic acid level using recombinant inbreds in mustard (Brassica juncea). Genome 45:467-472.
120. Shen JX *et al.* (2005) Plant Breed 124:111-116
121. Shiffriss C. 1997. Euphytica 93: 83-88.
- 45 122. Shull, G. H., 1922: Über die Heterozygotie mit Rücksicht auf den praktischen

Züchtungserfolg. Beiträge zur Pflanzenzücht., 5. Heft, 134-158.

123. Song, L.Q., *et al.*, 2005 :Genetic verification of multiple allelic gene for dominant genic male sterility in 609 AB (*Brassica napus* L). *Acta Agron. Sin.* 31 (7):869-875.
- 5 124. Sosulski F.W. y K.J. Dabrowski. 1984. Determination of glucosinolates in canola meal and protein products by desulfatation and capillary gas-liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 32:1172-1175.
125. Stefansson, B.R. "The Development of Improved Rapeseed Cultivars." (Capítulo 6) en "High and Low Erucic Acid Rapeseed Oils" editado por John K.G. Kramer, John K.G., Frank D. Sauer. y Wallace J. Pigden. Academic Press Canada, Toronto (1983).
- 10 126. Stefansson, B.R., F.W. Hougen, y R.K. Downey. 1961. Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. *Can. J. Plant Sci.* 41:218-219.
127. Syvanen A.C. (2001) *Nat Rev Genet.* 2(12):930-42.
128. Takagi, Y. (1970): Monogenic recessive male sterility in oil rape (*Brassica napus* L.) induced by gamma irradiation. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 64: 242-247.
- 15 129. Taylor, D.C., D.L Barton, E.M. Giblin, S.L. MacKenzie, C.G.J. van den Berg, y P.B.E. McVetty. 1995. Microsomal lyso-phosphatidic acid acyltransferase from a *Brassica oleracea* cultivar incorporates erucic acid into the sn-2 position of seed triacylglycerols. *Plant Physiol.* 109:409-420.
130. Theis R (1990) Thesis, University of Goettingen, Alemania
- 20 131. Thelen, J.J., y J.B. Ohlrogge. 2002. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metab. Eng.* 4:12-21.
132. Töpfer, R., N. Martini, y J. Schell. 1995. *Science* 268:681-686.
133. Tu, J. X., T. D. Fu, y Y. L. Zheng, 1997a: Analysis on inheritance and isolocus of the rapeseed GMS90-2441A (*B. napus* L.). *J. Huazhong Agri. Univ.* 16, 255-258.
- 25 134. Tu, J. X., Y. L. Zheng, y T. D. Fu, 1997b: RAPD markers linked to genetic male sterile gene of rapeseed. *J. Huazhong Agri. Univ.* 16, 112-117.
135. Tu *et al.* 1999. Studies on the recessive genic male sterility and its genetic markers in Rapeseed (*Brassica napus* L.); <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/87.htm>; 10th rapeseed congress, Canberra Australia.
- 30 136. Documento US 5.254.802.
137. van de Loo, F.J., B.G. Fox, y C. Somerville. 1993. Unusual fatty acids. p. 91-126. En T.S. Moore Jr (ed.) *Lipid metabolism in plants*. CRC, Boca Raton, FL. Vilkki, J.P., y P.K. Tanhuanpää. 1995. Breeding of high oleic acid spring turnip rape in Finland. p. 386-388. En *Proc. 9th Int. Rapeseed Cong.*, Cambridge, UK.
- 35 138. Vilkki, J.P., y P.K. Tanhuanpää. 1995. Breeding of high oleic acid spring turnip rape in Finland. En *Proc. 9th Int. Rapeseed Cong.*, Cambridge, UK, p. 386-388.
139. Voelker, T.A., A. Jones, A.M. Cranmer, H.M. Davies, y D.S. Knutzon. 1997. *Plant Physiol.* 114:669-677.
- 40 140. Voelker, T.A., T.R. Hayes, A.M. Cranmer, J.C. Turner, y H.M. Davies. 1996. *Plant J.* 9:229-241.
141. Wang, H., X. H. Tang, y Z. X. Zhao, 2001: Genetic study on ecotype genetic male sterile of H90s in *Brassica napus* L. *Chinese J. Oil Crop Sci.* 23, 11-15.
- 45 142. Weight PAL, R.K. Scougall, D.W.F. Shannon y J.W. Wells. Role of glucosinolates in the causation of liver haemorrhages in laying hens fed water-extracted or heat-treated rapeseed cakes. *Res. Vet. Sci.* (1987) 43, p. 313-319.
143. Williams ME, Lecmans J y Michiels F. 1997. Male sterility through recombinant

- DNatechnology. En: Shivanna KR y Sawhney VK (eds), Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement. Cambridge Univ. Press, p. 237-257.
- 5 144. Williams ME, LeemansJ, Michiels F (1997) Male sterility through recombinant DNA technology. En KR Shivanna, VK Sawhney, eds, Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 237-257
145. Williams P., Sobering D. 1992; En: Hildrum K., Isaksson T., Naes T. y Tandberg A. (eds.) Near Infra-red Spectroscopy. Bridging the gap between Data Analysis and NIR Applications. Horwood Chichester, UK: 41-446.
- 10 146. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Kenneth, J. L., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. 1990: Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.
147. Wong, R., J.D. Patel, I. Grant, J. Parker, D. Chame, M. Elhalwagy, y E. Sys. 1991. The development of high oleic canola. p. 53. In Abstracts, 8th Int. Rapeseed Cong., Saskatoon, Canada.
148. Wu *et al.*, Genomics 4:560 569 (1989)
- 15 149. Yang G S y Fu T D. Environment effects on the cytoplasmic male sterility of rapeseed (Brassica napus and Brassica campestris). Oil Crops of China, 1987; 3:15-19

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Syngenta Participation AG	
5	<120> Nuevo sistema híbrido para Brassica napus	
	<130> EP 71598	
	<150> EP 07290741.3	
10	<151> 13/06/2007	
	<160> 31	
	<170> PatentIn version 3.4	
15	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del cebador directo para el marcador NR1116	
	<400> 1	
25	tctcaaggg attcattcgg	20
	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso para el marcador NR1116	
35	<400> 2	

	gaaacttcgt cgaatcctcg	20
5	<210> 3 <211> 381 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> secuencia de referencia de la región de SNP NR1116 (secuencia de consenso de halotipo estéril y fértil)	
15	<220> <221> region de repetición <222> (1)..(16) <223> región de repetición de SSR (parte)	
20	<220> <221> mutación <222> (85)..(85) <223> Mutación de SNP; halotipo fértil = G; halotipo estéril = A	
25	<220> <221> mutación <222> (87)..(87) <223> Mutación de SNP; halotipo fértil = A; halotipo estéril = G	
30	<220> <221> mutación <222> (139)..(139) <223> Mutación de SNP; halotipo fértil = T; halotipo estéril = A	
35	<220> <221> mutación <222> (214)..(214)	

	<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = T; halotipo estéril =C
	<220>
	<221> mutación
5	<222> (218)..(218)
	<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = T; halotipo estéril =G
	<220>
	<221> mutación
10	<222> (245)..(257)
	<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = inserción; halotipo estéril = supresión
	<220>
	<221> mutación
15	<222> (277)..(277)
	<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = A; halotipo estéril = G
	<220>
	<221> mutación
20	<222> (286)..(286)
	<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = G; halotipo estéril = A
	<220>
	<221> mutación
25	<222> (312)..(312)
	<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = A; halotipo estéril = T
	<220>
	<221> mutación
30	<222> (319)..(319)
	<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = C; halotipo estéril = T
	<220>
	<221> mutación
35	<222> (328)..(330)

<223> Mutación de SNP; halotipo fértil = supresión; halotipo estéril = inserción

<220>

<221> mutación

5

<222> (359)..(359)

<223> Mutación de SNP: halotipo fértil = T; halotipo estéril = C

<400> 3

```
gagagagaga gagagacact tcgatgaata tagcttcgag gattcgacga agtttcttta      60
gagaggagaa gaggaaactt cctagtataa atggatcctc gagcaggaac gaagatgatg      120
atttgctagg agtgactggt gaattgatcg atcacgtcag atctttcacc attgacacgt      180

ttaagaactt ctctctctac ggtaatttcg aattcgattc tcaatttgat gatttttttc      240
tcgattgggtg aacaatcaag cagtagtgat atggggatta tgtttgtgga actagacgaa      300
gaagcgtgtg taaatcctct ggaagaagaa gatgaagaag tgagctcctc tgagaatgtg      360
aagaagtatt gtctgattgc c                                          381
```

10

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador directo para el marcador NR2525 (nº de acc. BZ061557)

20

<400> 4

attaccattt ccaacgaatc t

21

<210> 5

25

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

	<223> Secuencia del cebador inverso para el marcador NR2525 (nº de acc. BZ061557)	
	<400> 5	
5	gtctcttct caactcttgt atc	23
	<210> 6	
	<211> 434	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de referencia de la región de SNP NR2525	
15	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (17)..(25)	
	<223> Mutación de supresión (estéril) -> inserción "TGAGCAAAA" (fétil)	
20	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (60)..(60)	
	<223> Mutación de SNP A (estéril) -> C (fétil)	
25	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (82)..(82)	
	<223> Mutación de supresión de un solo nucleótido (estéril) -> inserción de T (fétil) de SNP	
30	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (92)..(92)	
	<223> Mutación de SNP T (estéril) -> C (fétil)	
35	<220>	

	<221> mutación	
	<222> (105)..(105)	
	<223> Mutación de SNP T (estéril) -> C (fértil)	
5	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (158)..(158)	
	<223> Mutación de SNP C (estéril) -> A (fértil)	
10	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (431)..(431)	
	<223> Mutación de SNP T (estéril) -> C (fértil)	
15	<400> 6	
	cagagaaaat gattaatgag caaaagcaaa agtttacaac acaaagggac tttctgctac	60
	cctcaacagt catcaggcct ttaaaattcc tcaagattaa agctctcaat taatcctaata	120
	agcaacctta gatttaacat tacttcttca tttgacaaac attaccacag ctaattgggc	180
	ttatttcaact attcatatca ataacaatag tttcccaatc aactaaaaac agaagggaaa	240
	accacaccttc gtttaacatt ctaaaatcca aataattgga ctcaatatga agctaaaagc	300
	cctaacaatc cgacaagttc acggcctaca ttgaagcaga gaaccagaaa acgcaacaaa	360
	taaatatcag aaaccacatt accatttcca acgaatctat aggagctgct tgagagaagt	420
	gaatccatgg ccgg	434
	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico HiNK6440	
25	<400> 7	
	gttcacttct catcttcttc cag	23

5	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> secuencia oligonucleotídica para el cebador de PCR HiNK6441	
	<400> 8	
	gagagagaca cttcgatgaa tatag	25
15	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> secuencia oligonucleotídica para el cebador de PCR HiNK6442	
	<400> 9	
25	tcctggcaat cagacaatac tt	22
	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia oligonucleotídica para el cebador de PCR HiNK6697	
	<400> 10	

	acacacgctt cttcgtctag t	21
	<210> 11	
	<211> 14	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Parte nucleotídica de la sonda de SNP HiNK6700 (sonda específica del alelo fértil)	
	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (6)..(6)	
	<223> Mutación de SNP	
15		
	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (10)..(10)	
	<223> Mutación de SNP	
20		
	<400> 11	
	cgaattcgat tctc	14
25	<210> 12	
	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Parte nucleotídica de la sonda de SNP HiNK6701 (sonda específica del alelo estéril)	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
35	<222> (6)..(6)	

	<223> Mutación de SNP	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
5	<222> (10)..(10)	
	<223> Mutación de SNP	
	<400> 12	
10	cgaatccgag tctc	14
	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia oligonucleotídica para el cebador de PCR HiNK6702	
20	<400> 13	
	agtaacatca gcggggaac	19
	<210> 14	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> secuencia oligonucleotídica para el cebador de PCR HiNK6707	
	<400> 14	
	tttaagagca ttggaactct cc	22

	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5		
	<220>	
	<223> secuencia oligonucleotídica para el cebador de PCR HiNK6771	
	<400> 15	
10		
	ttacaacac aaagggttt ctgc	24
	<210> 16	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia oligonucleotídica para el cebador de PCR HiNK6772	
20		
	<400> 16	
	tgtaggccgt gaactgtcg gattg	25
25		
	<210> 17	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Parte nucleotídica de la sonda de SNP HiNK6775 (sonda específica del alelo estéril)	
	<220>	
	<221> mutación	
35	<222> (9)..(9)	

	<223> Mutación de SNP	
	<400> 17	
5	atttgacaca cattacc	17
	<210> 18	
	<211> 17	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Parte nucleotídica de la sonda de SNP HiNK6776 (sonda específica del alelo fértil)	
15	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (9)..(9)	
	<223> Mutación de SNP	
20	<400> 18	
	atttgacaaa cattacc	17
	<210> 19	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia del cebador directo para el marcador 2219	
	<400> 19	
	attatcctct cgccatttc	19

	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5		
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso para el marcador 2219	
	<400> 20	
10		
	aaactcctga acacctccta c	21
	<210> 21	
	<211> 1032	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Brassica napus</i>	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
20	<222> (20)..(22)	
	<223> n es a, c, g, ó t	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
25	<222> (25) (27)	
	<223> n es a, c, g, ó t	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
30	<222> (30)..(30)	
	<223> n es a, c, g, ó t	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
35	<222> (40)..(41)	

	<223> n es a, c, g, ó t
	<220>
	<221> característica miscelánea
5	<222> (62)..(62)
	<223> n es a, c, g, ó t
	<220>
	<221> característica miscelánea
10	<222> (66)..(66)
	<223> n es a, c, g, ó t
	<220>
	<221> característica miscelánea
15	<222> (73)..(73)
	<223> n es a, c, g, ó t
	<220>
	<221> unión al cebador
20	<222> (461)..(480)
	<223> sitio de unión al cebador directo de NR1116
	<220>
	<221> región de repetición
25	<222> (499)..(534)
	<223> región de repetición de SSR
	<220>
	<221> unión al cebador
30	<222> (555)..(574)
	<223> sitio de unión al cebador inverso de NR1116
	<220>
	<221> característica miscelánea
35	<222> (801)..(801)

	<223> n es a, c, g, ó t
	<220>
	<221> característica miscelánea
5	<222> (819)..(819)
	<223> n es a, c, g, ó t
	<220>
	<221> característica miscelánea
10	<222> (901)..(901)
	<223> n es a, c, g, ó t
	<220>
	<221> característica miscelánea
15	<222> (906)..(906)
	<223> n es a, c, g, ó t
	<400> 21

```

caccaatatt agcacacacn nncennnttn ccttttttttn ngggcgctaa gctggtaacc      60
gnaatnctgt tancccgggg gaaccgcgcc acttcatctt ctgtcgaacc aatccacctg      120
acagacaaat ctctcacat cggaccacca caactctctg tccgttgagc aactccttag      180
cgatgatgga agcaagacgc cccaacatgt ggtgcctcgc gtcgaccacg acacgcttcg      240
cgcataatccc tgaaccagac accatctctc cactgattcg attactctcg ggctgcttcc      300
agaagattat gagtgtagac tcagtggcgg attatatacg acgcggctag tgaaacaatt      360
aggggtttctc gtctaaaacc taatgttaat gggcttttgt aattagattt taggcccaat      420
aaaagcctct ttacctttac tttcttctgt ttcttctcat tcttcaaggg attcattcgg      480
gttcttcttg tgtcaccaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagacacttc      540
gatgaatata gcttcgagga ttcgacgaag tttcttttaga gaggagaaga ggaaacttcc      600
tagtataaat ggatcctcga gcaggaacga agatgatgat ttgctaggag tgactgttga      660
attgatcgat cacgtcagat ctttcaccat tgacacgttt aagaacttct ctctctacgg      720
taatttcgaa ttcgattctc aatttgatga tttttttctc gattgggtga caatcaagca      780
gtagtgatat ggggattatg nttgtgggac tagacgaang agcgtgtgta aatcctctgg      840
aagaagatga gaagtgaact cctctgagaa tgtgaagaaa gtattgtctg attgccagga      900
naaaangccg ttctcgtctt gtccaaatcc aagggtttga tacttctctc gcctaaagat      960
tggacctgcc cagtttttgt tgtaaaaata atttgttttc gcgattataa cattgggtaa     1020
atttttaaga gc                                                                1032

```

<210> 22

<211> 741

<212> ADN

5 <213> *Brassica napus*

<220>

<221> unión al cebador

<222> (514)..(534)

10 <223> sitio de unión al cebador directo de NR2525

<220>

<221> región de repetición

<222> (643)..(688)

15 <223> localización de secuencia de microsatélites

<220>

<221> unión al cebador

<222> (709)..(731)

<223> sitio de unión al cebador inverso de NR2525

5 <400> 22

```

aacggagatc tgattctcgc cctgtggtgg aattctgttt gatatgacct aagtaacatc      60
agcggggaac aaagaaaatg tttaacaaca agaaaatgat taatgagcaa aagcaaaaca      120
agtttacaac acactttatg catcagctga aaggaacagt gacacaaagg gactttctgc      180
tacctcaaaa cagtcacacg gccttttaaaa ttcctcaaga ttaaagcttt caataaatcc      240
taatagcaac cttagattta acattactta ttcatttgac acacattaca acagctaatt      300
gggcttattt cactattcgt atcaataaca atagtttccc aatcaacaac acctactaaa      360
aacaaaaggg aaagaaaacc caccttcgtt tacattctaa aatccaaata attggactca      420
atatgaagct aaaaccctta acactcgaca agttcactgc ctacattgaa gcagagaatc      480
agaaaacgca acaaataaag atacagaaac cacattacca tttccaacga atctatagga      540
gctgcttgag agaagtgaat ccatggccgg agagttccaa tgctcttaaa ccctaaaaga      600
gttagatcta ctggcaattt taagtaaagt gagctgcttt aaagagagag agagagagag      660
agagagagag agagagagag agggagagat gaatagagca cagatatcga tacaagagtt      720
gagaaagaga ctcattgccg t                                          741

```

<210> 23

<211> 754

<212> ADN

10 <213> *Brassica napus*

<220>

<221> unión al cebador

<222> (298)..(316)

15 <223> Sitio de unión al cebador directo de NR2219

<220>

<221> región de repetición

<222> (411)..(464)

20 <223> región de repetición SSR

<220>

<221> unión a cebador

<222> (526)..(546)

<223> Sitio de unión al cebador inverso de NR2219

5

<400> 23

```

ggaagtgctt tttagtggag agtgcttcct gaaactcttc aggccttggc gatccaaaga 60
gcacgatttg caataaaact tagcagatga tgatgatgat gattcaccag tgcttgctct 120
agttagtaat ttttcccaga gccactcttt gcgagtgcgc acgaacaatc ctgcgcgagg 180
tttgactgaa taagccagaa aaaggctcgt acacgtgcgt tgttgtagcc gagacagatc 240
ccaattgaag acatctaaca cctgattgga tatgatcatc attttagccg gaggaggatt 300
atcctctcgc catttcacca tatctttata catgagtgcg cacgtgcac ctttttcatt 360
accatatatt cctttattaa ctaaaaaggc ccatatcttc cgcagatact tatatatata 420
tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata tataaaaaag ctggactaac 480
cagatctggc atgtaccaca gcgactccag tggaagatag agctcgtagg aggtgttcag 540
gagtttgctt ttggtctcca taggctgtga ctgtgatgga gacaggacca gtgtagccta 600
gctccttgaa agctccttcc aaactgggac ggacccacg agcatcgata ccctctggaa 660
ccggacagtc aaacatgtcc caccacaccg ctatttttagc cgccgccgcc gcagcagcat 720
cgttcccacc ccattctctc tacacctttt aaca 754

```

<210> 24

<211> 20

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador directo para el marcador 3454

15

<400> 24

gatggtgatg gtgatagtc

20

20

<210> 25

<211> 21

<212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del cebador inverso para el marcador 3454	
5	<400> 25	
	gaagagaagg agtcagagat g	21
10	<210> 26	
	<211> 581	
	<212> ADN	
	<213> <i>Brassica napus</i>	
15	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(581)	
	<223> Secuencia para el marcador 3454	
20	<400> 26	
	ctcagaagcg gtgtggatct tgtctttcct cgtctcttcc tcgtcgctaa gaccagaacc	60
	catttcttga ttgctgcttg agatgttga ctcttgaagt ttctcatctg atgacctttt	120
	gagattagt agactcttgg taccacctc aaaggatggg gatggatg gtgatgggta	180
	taggtcttct ctgtatgacg aatgggtccag tagtacttct tgccttttga gacgtggacc	240
	atcatcacca ccacagcttt cggtttcttc cagttcttct tcttctgttg ttttattatt	300
	gcacgcttgt tgttcaactg ggaatggaga gtgacctatg ctcgtcactt catcatcatc	360
	actctcgcaa tcatcattgt cttcatcatc agaatacagt agtgcgctaa tttcctcagt	420
	gtcttcgtgc atctctgact ctttctcttc gccattgaca tgatcttcat ggaggaatat	480
	ctttcttggg aatggcatga tctttactta accctttctc taggtttaga aaattgagaa	540
	atttctctgg atcagtagcc acaaaagagg gaaaacgaac t	581
	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> secuencia de la cola M13F añadida a la sonda de SFP en la construcción del cebador directo	
5		
	<400> 27	
	cacgacgttg taaaacgac	19
10	<210> 28	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> secuencia de la cola M13R añadida a la sonda de SFP en la construcción del cebador inverso	
	<400> 28	
20		
	caggaaacag ctatgacc	18
	<210> 29	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para PUT-161a-Brassica_napus-59218	
30		
	<400> 29	
	acagagacag aggaggtagc	20
35	<210> 30	
	<211> 20	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador inverso para PUT-161a-Brassica_napus-59218	
	<400> 30	
10	atcataatcc ctcgttctt	20
	<210> 31	
	<211> 708	
	<212> ADN	
	<213> <i>Brassica napus</i>	
15	<400> 31	
	gcactggagg aggctgaagc tcttaagaag ctgactccta gacaagaacc tgtggtggat	60
	tcaaccaaatt acactgctgc agatgtgcgc attacggacc agaaactgcg tttatgtgac	120
	atatgctggag cattcttgag cgtctatgac agtgatcgtc ggtagctga tcattttgga	180
	gggaagcttc atttgggtta catgctgac cgtgataaac tagcagagct tcaggaggaa	240
	aagaacaaag ttcacaagga acgggtcgaa gagaggagat caaaggagag gagcagagag	300
	cgagaatcaa gtagagacag agacagagga ggtagccgtg accgtggaag agatatagac	360
	ggtagaagca gagatcgca caggcaccat gaccaccgtg aacatgacag aaactataat	420
	cagtcacgtg gctatgactc aagaagccgg cgcagctcga ggtcccgtc tagggaaaga	480
	acgagggatt atgatcgccg cagacgtcat gaccgtact aagacgtgt cagagaaggt	540
	tgcaagcaag tttgagatgt tttcaaagat gcgttttagga tcaccaatct ggagttacaa	600
	acacttgttt tcgtatgtgt taaaagatat ttgagattgt aagttgctaa gtttgtaaga	660
	ggagtttcgt tggatttctt caaactttta atatgttgtt gacgaaaa	708

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir o multiplicar semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf, comprendiendo dicho método las etapas de

- 5 a) proporcionar una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf, en el que dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina es
 - i. homocigota para el gen de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
 - 10 ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
 - iii. predominantemente estéril masculina cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura menor que 28°C, y
 - 15 iv. revierte a un fenotipo predominantemente fértil masculino cuando se expone antes y/o durante la floración a una temperatura mayor que 35°C,

en el que dicho genotipo MsMsrf es obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480,

- b) exponer dicha planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina durante al menos 4 horas a una temperatura mayor que 35°C, y
- 20 c) exponer la planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina tratada térmicamente obtenida en la etapa (b) a una temperatura menor que 33°C hasta el desarrollo de flores fértiles masculinas, y
- d) permitir la autopolinización de las plantas de *Brassica napus* que tienen dichas flores fértiles masculinas obtenidas en la etapa (c), dejar que se desarrollen las semillas, y cosechar las semillas,
- 25

en el que las semillas cosechadas se caracterizan porque son semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf.

2. Un método para producir semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrf, comprendiendo dicho método las etapas de

- 30 a) proporcionar como una planta femenina una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf usando el método según la reivindicación 1, para obtener semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf y haciendo crecer dichas plantas a partir de dichas semillas, en el que dicha planta de *Brassica napus* femenina condicionalmente estéril masculina con el genotipo MsMsrf es
 - i. homocigota para el alelo de esterilidad masculina (Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
 - ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y
 - 40 iii. predominantemente estéril masculina a una temperatura menor que 28°C, y
 - iv. revierte a un fenotipo fértil masculino a una temperatura mayor que 35°C,
 - v. obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
- b) proporcionar como una planta masculina una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo msmsrf, en el que dicha planta de *Brassica napus* con el genotipo msmsrf es
 - i. homocigota para el alelo de fertilidad (alelo ms) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y
- 45

- ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y
- iii. predominantemente fértil masculina, y
- iv. obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481, y
- c) permitir que la planta masculina de la etapa b) polinice a la planta femenina de la etapa a), dejar que se desarrolle la semilla, y cosechar la semilla, en el que las semillas cosechadas se caracterizan porque son semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf.
3. El método para producir o multiplicar semilla de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf según la reivindicación 2, en el que dicha línea de planta masculina y dicha línea de planta femenina se proporcionan mediante introgresión del alelo Ms, ms, y/o rf en una línea de *Brassica napus* consanguínea, seguido de al menos un retrocruzamiento frente a dicha línea de *Brassica napus* consanguínea.
4. Un método para producir semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus*, comprendiendo dicho método las etapas de
- a) proporcionar como una planta femenina una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf o MsMsrfrf usando el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para obtener semillas de una línea de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrf o MsMsrfrf y haciendo crecer dichas plantas a partir de dichas semillas, en el que dicha planta de *Brassica napus* femenina condicionalmente estéril masculina es
- i. heterocigota u homocigota para el alelo de esterilidad masculina (alelo Ms) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
- ii. homocigota para el alelo mantenedor (alelo rf) obtenible a partir de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y
- iii. predominantemente estéril masculina a una temperatura menor que 28°C, y
- iv. revierte a un fenotipo predominantemente fértil masculino a una temperatura mayor que 35°C, y
- b) proporcionar como una planta masculina una planta de *Brassica napus* fértil masculina con el genotipo RfRf, en el que dicha planta de *Brassica napus* fértil masculina es
- i. homocigota para el alelo restaurador funcional (alelo Rf), que es obtenible a partir de cualquier línea de *Brassica napus* fértil consanguínea comercializada como semilla para crecimiento, y
- ii. predominantemente fértil masculina, y
- c) permitir a la planta masculina de la etapa b) polinizar la planta femenina condicionalmente estéril masculina de la etapa a), dejar que se desarrolle la semilla, y cosechar dicha semilla híbrida fértil.
5. El método para producir semilla híbrida fértil masculina de *Brassica napus* según la reivindicación 4, en el que dicha línea de planta masculina (fértil masculina) y dicha línea de planta femenina (estéril masculina) se basan en antecedentes genéticamente diversos, y/o en el que dicha línea femenina (estéril masculina) es heterocigota para el alelo Ms.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que las plantas femenina (estéril masculina) y masculina (fértil masculina) se hacen crecer en tiras alternas, y/o en el que la floración de las plantas masculinas se retrasa podando o mediante tratamiento con productos químicos que retrasan el crecimiento o sembrando las plantas masculinas (fértil masculinas) hasta 3 semanas más tarde que las plantas femeninas (estériles masculinas).
7. Un método para la producción de semilla híbrida de *Brassica napus* que produce plantas

de *Brassica napus* que producen grano, opcionalmente con un contenido total de glucosinolatos de no más de 25 μ moles por gramo de semilla secada al aire a 9% de humedad, en el que dicho método comprende uno o más de los métodos según se reivindican en

- a) la reivindicación 1, y
 - 5 b) una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, y
 - c) una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el alelo Ms se caracteriza por conferir un fenotipo condicionalmente estéril masculino nuclear, que
- 10 a) se restaura temporalmente a la fertilidad mediante una exposición a una temperatura mayor que 35°C,
 - b) se restaura a la fertilidad en al menos parte de las plantas F₁ obtenidas cruzando una planta estéril masculina con el genotipo MsMs^{srfr} o Ms^{srfr}Ms con cualquier planta de *Brassica napus* que comprende al menos un alelo Rf dominante, y
 - 15 c) se mantiene en las plantas F₁ obtenidas cruzando una planta con un fenotipo condicional estéril masculino referido por dicho alelo Ms con las plantas fértiles masculinas derivadas de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el alelo Ms es el alelo Ms presente en la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 o una variante genética del mismo, que confiere un fenotipo condicionalmente estéril masculino.
- 20 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fenotipo condicionalmente estéril masculino y/o el alelo Ms está ligado a y/o asociado con una o más características seleccionadas del grupo que consiste en
 - I. un fenotipo de aborto de la yema en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms,
 - 25 II. un fenotipo de pétalos de rayas blancas o manchados de blanco en una planta con un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms, y
 - III. la presencia de un marcador específico del alelo Ms tanto en plantas fértiles masculinas como estériles masculinas que comprenden al menos una copia del alelo Ms.
- 30 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el fenotipo condicionalmente estéril masculino y/o el alelo Ms está ligado a y/o asociado con uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en
 - I. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos en la región del marcador NR1116 que consiste en
 - 35 a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 85 en SEC ID NO: 3,
 - b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 87 en SEC ID NO: 3,
 - c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 139 en SEC ID NO: 3,
 - 40 d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 214 en SEC ID NO: 3,
 - e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 218 en SEC ID NO: 3,
 - 45 f) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 277 en SEC ID NO: 3,
 - g) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que

- corresponde a la posición 286 en SEC ID NO: 3,
- h) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 312 en SEC ID NO: 3,
- 5 i) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 319 en SEC ID NO: 3,
- j) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 359 en SEC ID NO: 3,
- k) la mutación de supresión 5'-TTGGTGAACAATC-3' en la posición correspondiente a 221 en SEC ID NO: 3, y
- 10 l) la mutación de inserción 5'-GAA-3' en la posición que corresponde a 328-330 en SEC ID NO: 3,
- II. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos en la región del marcador NR2525 que consiste en
- 15 a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 60 en SEC ID NO: 6,
- b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 92 en SEC ID NO: 6,
- c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 105 en SEC ID NO: 6,
- 20 d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 158 en SEC ID NO: 6,
- e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 431 en SEC ID NO: 6,
- 25 f) la mutación de supresión de un solo nucleótido en la posición que corresponde a la posición 82 en SEC ID NO: 6, y
- g) la mutación de supresión 5'-TGAGCAAAA-3' en la posición que corresponde a 17 a 25 en SEC ID NO: 6,
- III. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SNP que consiste en
- 30 a) una señal positiva en un ensayo de SNP que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 12, y una señal negativa que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 11, y
- b) una señal positiva en un ensayo de SNP que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 17, y una señal negativa que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 18,
- 35 IV. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SSR que consiste en:
- a) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 96,7 (+/- 1,0) pb que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen las secuencias expuestas como SEC ID NO: 1 y 2, y
- 40 b) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 192,8 (+/- 0,3) pb que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen las secuencias expuestas como SEC ID NO: 4 y 5, y
- V. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores ligados a al menos una de las secuencias expuestas como SEC ID NO: 3, 6, 11 y 18,
- 45 en los que el uno o más marcadores (marcador del alelo Ms) también incluyen una secuencia nucleotídica aislada seleccionada del grupo que consiste en secuencias las cuales

I. tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con, o

II. se hibridan en condiciones restrictivas con, o

III. comprenden al menos 25 nucleótidos consecutivos de

las secuencias marcadoras definidas anteriormente en las secciones I. a V.

5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el alelo ms se caracteriza por las propiedades fenotípicas de

a) no ser capaz de revertir a la fertilidad al fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms, y

b) no ser capaz de conferir un fenotipo estéril masculino en ausencia de un alelo Ms.

10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12, en el que el alelo ms está ligado a y/o asociado con uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en

I. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos en la región del marcador NR1116 que consiste en

a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 85 en SEC ID NO: 3,

15 b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 87 en SEC ID NO: 3,

c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 139 en SEC ID NO: 3,

20 d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 214 en SEC ID NO: 3,

e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 218 en SEC ID NO: 3,

f) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 277 en SEC ID NO: 3,

25 g) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una G en la posición que corresponde a la posición 286 en SEC ID NO: 3,

h) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 312 en SEC ID NO: 3,

30 i) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 319 en SEC ID NO: 3,

j) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 359 en SEC ID NO: 3,

k) la mutación de inserción 5'-TTGGTGAACAATC-3' en la posición correspondiente a 221 en SEC ID NO: 3,

35 l) la mutación de supresión 5'-GAA-3' en la posición que corresponde a 328-330 en SEC ID NO: 3,

II. los marcadores seleccionados del grupo de polimorfismos en la región del marcador NR2525 que consiste en

40 a) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 60 en SEC ID NO: 6,

b) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 92 en SEC ID NO: 6,

c) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 105 en SEC ID NO: 6,

- d) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una A en la posición que corresponde a la posición 158 en SEC ID NO: 6,
- e) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una C en la posición que corresponde a la posición 431 en SEC ID NO: 6,
- 5 f) el marcador de polimorfismo de un solo nucleótido que tiene una T en la posición que corresponde a la posición 82 en SEC ID NO: 6,
- g) la mutación de inserción 5'-TGAGCAAAA-3' en la posición que corresponde a 17 a 25 en SEC ID NO: 6,
- III. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SNP que consiste en
- 10 a) una señal positiva en un ensayo de SNP que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 11, y una señal negativa que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 12, y
- b) una señal positiva en un ensayo de SNP que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 18, y una señal negativa que usa una sonda de SNP que comprende la secuencia nucleotídica descrita por SEC ID NO: 17,
- 15 IV. los marcadores seleccionados del grupo de marcadores de SSR que consiste en:
- a) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente seleccionado del grupo de pesos moleculares aparentes que consiste en 94 (+/- 0,9) pb, 110,4 (+/- 0,5) pb, 112,3 (+/- 0,4) pb y 116,3 (+/- 0,4) pb, que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen las secuencias expuestas como SEC ID NO: 1 y 2, y
- 20 b) un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 183,8 (+/- 0,4) pb o un fragmento de PCR asociado a un alelo no fértil que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen las secuencias expuestas como SEC ID NO: 4 y 5,
- en los que el uno o más marcadores también incluyen una secuencia nucleotídica aislada seleccionada del grupo que consiste en secuencias las cuales
- 25 a) tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con, o
- b) se hibridan en condiciones restrictivas con, o
- c) comprenden al menos 25 nucleótidos consecutivos de las secuencias marcadoras definidas anteriormente en las secciones I. a IV.
- 30 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el alelo rf se caracteriza por las propiedades fenotípicas de
- a) no ser capaz de revertir a la fertilidad al fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms, y
- b) ser capaz de mantener un fenotipo estéril masculino conferido por el alelo Ms.
- 35 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 14, en el que el alelo rf se selecciona del grupo que consiste en
- a) el alelo rf obtenible de la semilla de *Brassica napus* depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 ó 41481, y
- b) sus variantes, que están en una forma homocigota capaz de mantener el fenotipo de esterilidad masculina conferido por el alelo Ms.
- 40 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 14 y 15, en el que el alelo rf está ligado a y/o asociado con los marcadores de SSR que consisten en un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 240,8 (+/- 0,4) pb que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen las secuencias expuestas como SEC ID NO: 19 y 20.
- 45 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fenotipo restaurador de la fertilidad y/o el alelo Rf está ligado a y/o asociado con una o más características seleccionadas del grupo que consiste en

- a) restaurar la fertilidad en las plantas F_1 obtenidas cruzándolas con la planta de *Brassica napus* que se hizo crecer a partir de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480, y
- 5 b) restaurar la fertilidad en las plantas F_1 obtenidas cruzándolas con la planta de *Brassica napus* que se hizo crecer a partir de la semilla obtenida a partir del cruce de la planta de *Brassica napus* obtenida de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41480 como planta estéril masculina femenina y la planta de *Brassica napus* obtenida a partir de la semilla depositada con el Número de Depósito NCIMB 41481 como planta fértil masculina.
- 10 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el alelo Rf y/o el alelo ms es obtiene de una línea fértil consanguínea de *Brassica napus* comercialmente disponible seleccionada del grupo que consiste en las variedades no híbridas de *Brassica napus* comercializadas como semilla para el crecimiento incluidas en la lista de OECD de variedades susceptibles de certificación de diciembre de 2006.
- 15 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 17 a 18, en el que el fenotipo restaurador de la fertilidad y/o el alelo Rf está ligado a y/o asociado con un marcador de SSR que consisten en la ausencia de un fragmento de PCR con un peso molecular aparente de 240,8 (+/- 0,4) pb que resulta de una reacción de PCR con los cebadores que tienen las secuencias expuestas como SEC ID NO: 19 y 20.
- 20 20. Un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo de secuencias descrito por las SEC ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20.
21. Una sonda que comprende como la parte de ácido nucleico una secuencia seleccionada del grupo de secuencias descritas por SEC ID NO: 11, 12, 17, y 19, en la que la sonda es adecuada para la detección de un polimorfismo de un solo nucleótido.
- 25 22. Una secuencia nucleotídica aislada seleccionada del grupo de las secuencias expuestas como SEC ID NO: 3, 6 y 21, en la que las secuencias nucleotídicas aisladas son marcadores útiles para detectar el alelo Ms, el alelo ms, el alelo Rf y/o el alelo rf en un germoplasma de *Brassica* y los fenotipos asociados.
- 30 23. Uso de una secuencia de ácido nucleico según las reivindicaciones 20 ó 22 en una selección a base de marcadores para introgresar alelos seleccionados del grupo que consiste en el alelo Ms, alelo ms, alelo Rf, y/o alelo rf, en un germoplasma de *Brassica* que carece de dicho conjunto de alelos.
24. Uso de una planta fértil masculina de *Brassica napus* con el genotipo RfRf en un método de producción de semilla híbrida fértil de *Brassica napus* según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 35 25. Uso según la reivindicación 23, en el que el método es un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 19.
- 40 26. Uso de una o más plantas de *Brassica napus* seleccionadas de plantas de *Brassica napus* condicionalmente estériles masculinas con el genotipo MsMsrfrrf y/o plantas de *Brassica napus* fértiles masculinas con el genotipo msmsrfrrf, en el método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, y 6 a 19, para producir una planta de *Brassica napus* condicionalmente estéril masculina con el genotipo Msmsrfrrf o semilla de la misma.

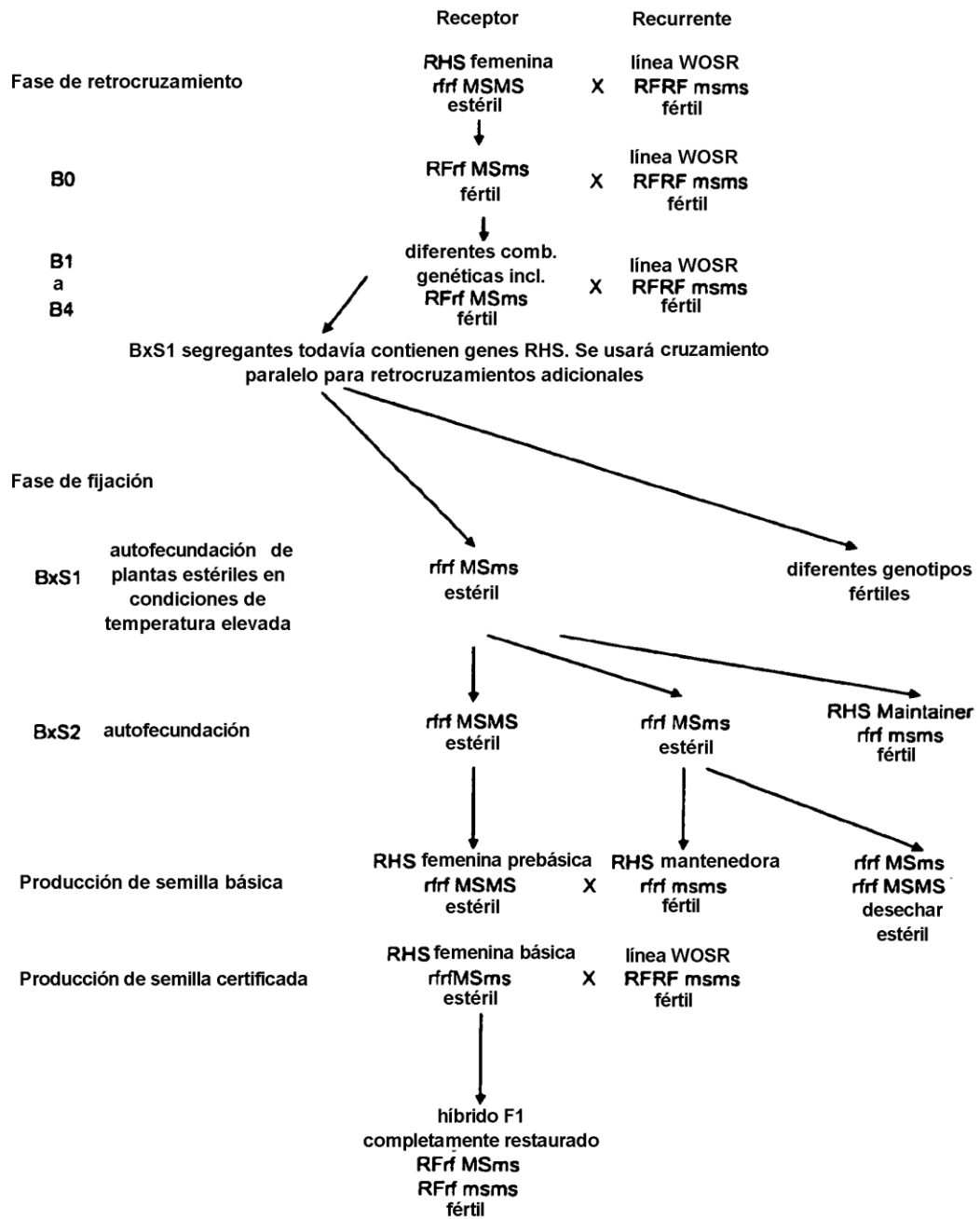


Fig. 1

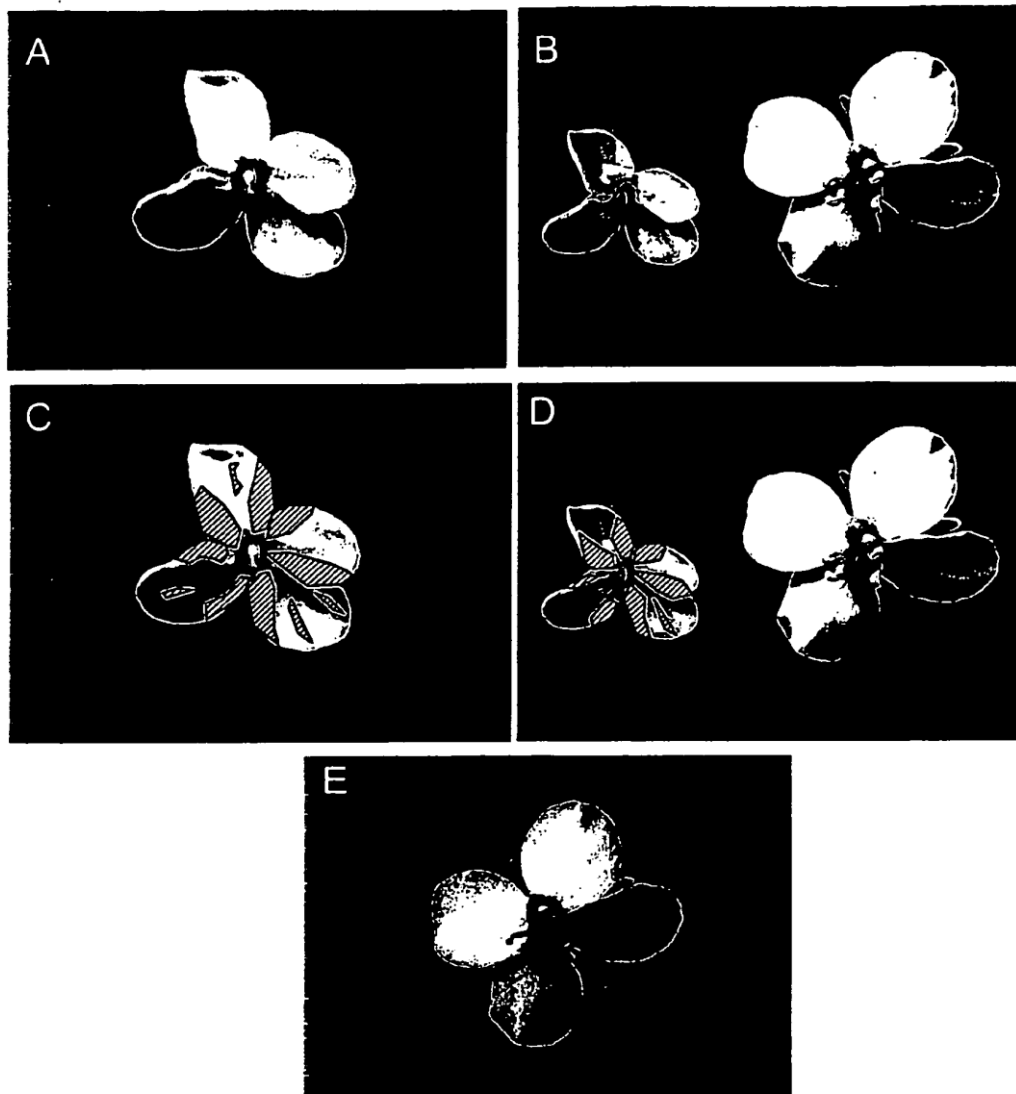


Fig. 2

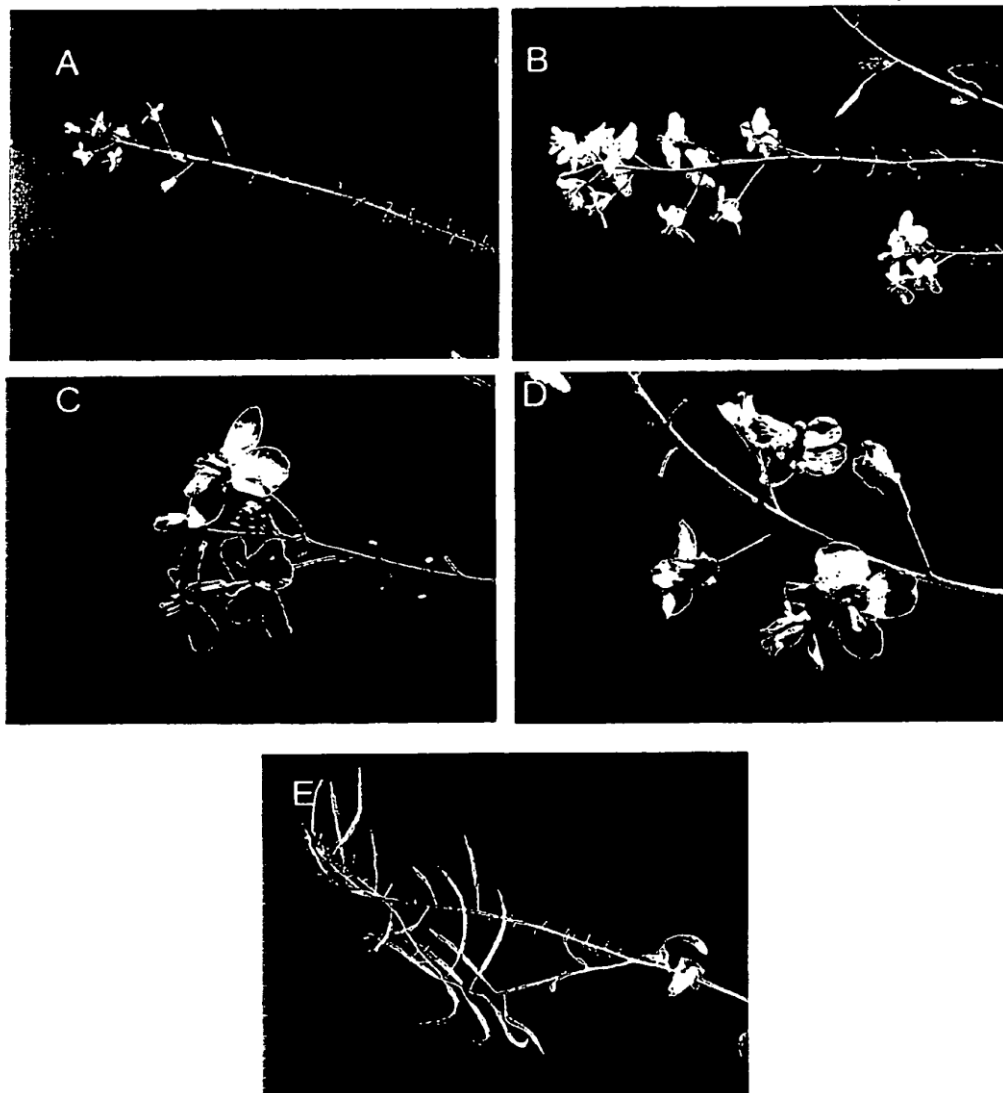


Fig. 3

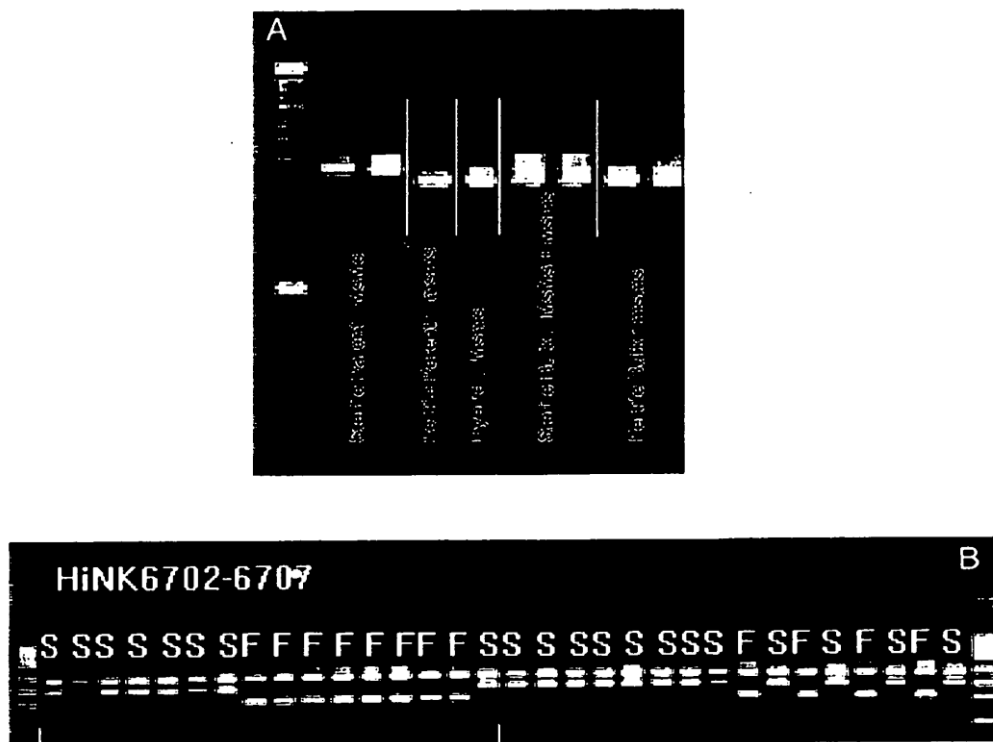


Fig. 4

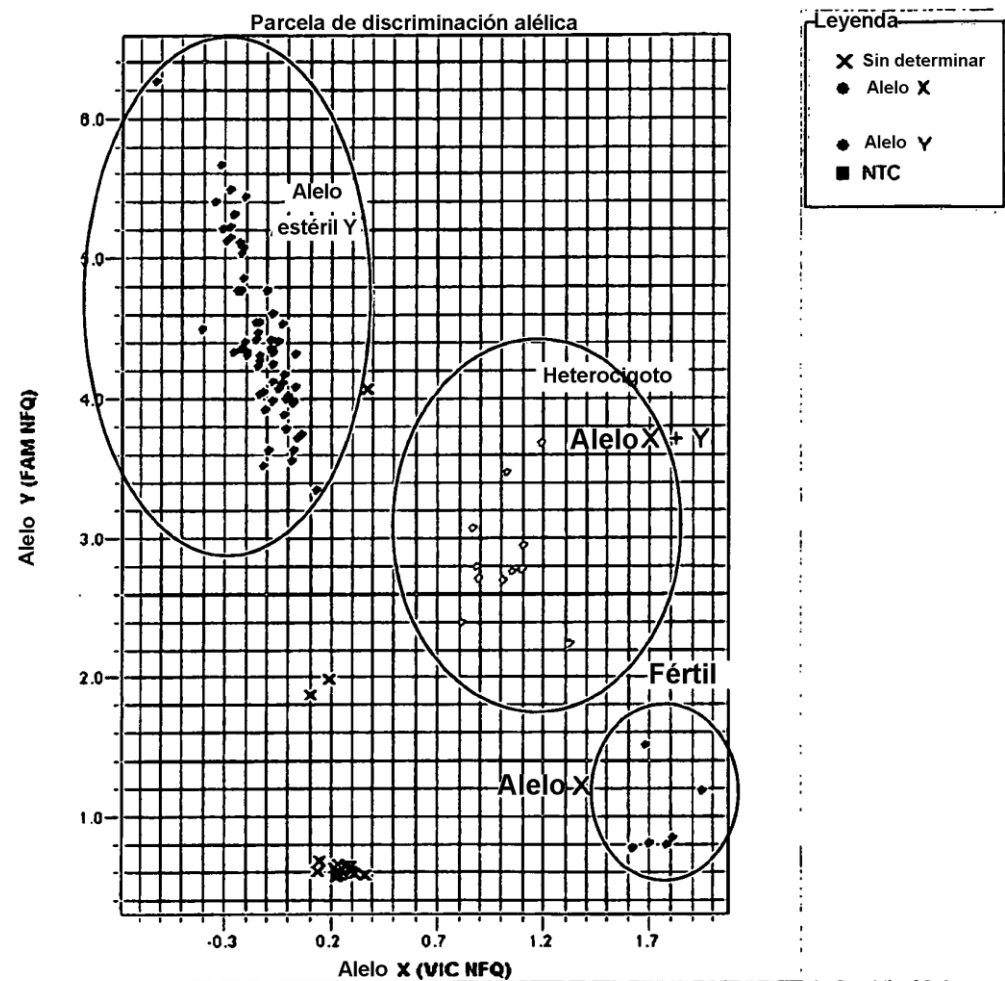


Fig. 5

NR1116

ACCCAATATTAGCACACACNNCCNNNTTNCCTTTTTTTTNNGGGCGCTAAGCTTGGTAACCGN
 AATNCTGTTANCCCGGGGAACCCGCCCACTTCATCTTCTGTGCAACCAATCCACCTGACAG
 ACAAATCTCCTCACATCGGACCACCACAACCTCTCTGTCCGTGAGCAACTCCTTAGCGATGA
 TGGAAGCAAGACGCCCCAACATGTGGTGCCTCGCGTCGACCACGACACGCTTCGCGCATATC
 CCTGAACCAGACACCATCTCTCCACTGATTTCGATTACTCTCGGGCTGCTTCAGAAGATTAT
 GAGTGTAGACTCAGTGGCGGATTATATACGACGCGGCTAGTGAAACAATTAGGGTTTCTCGT
 CTAAAACCTAATGTTAATGGGCTTTTGTAAATTAGATTTTAGGCCCAATAAAAGCCTCTTTAC
 CTTTACTTTCTTCTGTTTCTTGTCATTCTTCAAGGGATTCAATTCGGGTCTTCTTGTGTCAC
 CAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACACTTCGATGAATATAGCTTCGAG
 GATTCGACGAAGTTTCTTTAGAGAGGAGAAGAGGAAACTTCCTAGTATAAATGGATCCTCGA
 GCAGGAACGAAGATGATGATTGCTAGGAGTGACTGTTGAATTGATCGATCACGTCAGATCT
 TTCACCATTGACACGTTTAAGAACTTCTCTCTCTACGGTAATTTTGAATTTCGATTCTCAATT
 TGATGATTTTTTTTCTCGATTGGTGAACAATCAAGCAGTAGTGATATGGGGATTATGNTTGTG
 GGACTAGACGAANGAGCGTGTGTAAATCCTCTGGAAGAAGATGAGAAGTGAACCTCTTGAG
 AATGTGAAGAAAGTATTGTCTGATTGCCAGGANAAAANGCCGTCTCGTCTTGTCCAAATCC
 AAGGTTTTGATACTTCCTTCGCCCTAAAGATTGGACCTGCCCAGTTTTGGTTGTAAAAATAAT
 TTGTTTTTCGCGATTATAACATTGGGTAAATTTTTTAAGAGC

Fig. 6

NR2525

AACGGAGATCTGATTCTCGCCCTGTGGTGGAAATTCTGTTTGATATGACCTAAGTAACATCAG
 CGGGGAACAAAGAAAATGTTTACAACAAAGAAAATGATTAATGAGCAAAAGCAAAACAAGTT
 TACAACACACTTTATGCATCAGCTGAAAGGAACAGTGACACAAAGGGACTTTCTGCTACCCCT
 CAAACAGTCATCAGGCCCTTTAAAATTCCTCAAGATTAAAGCTTTCAATAAATCCTAATAGCA
 ACCTTAGATTTAACATTACTTATTCATTTGACACACATTACAACAGCTAATTGGGCTTATTT
 CACTATTCGTATCAATAACAATAGTTTCCCAATCAACAACACCTACTAAAAACAAAAGGGAA
 AGAAAACCCACCTTCGTTTACATTCTAAAATCCAAATAATTGGACTCAATATGAAGCTAAAA
 CCCCTAACACTCGACAAGTTCACTGCCTACATTGAAGCAGAGAATCAGAAAACGCAACAAAT
 AAAGATACAGAAACCACATTACCATTTCACGAATCTATAGGAGCTGCTTGAGAGAAGTGA
 ATCCATGGCCGGAGAGTTCCAATGCTCTTAAACCCTAAAAGAGTTAGATCTACTGGCAATTT
 TAAGTAAAGTGAGCTGCTTTAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
GGAGAGATGAATAGAGCACAGATATCGATACAAGAGTTGAGAAAGAGACTCATTGCCGT

Fig. 7**NR2219**

ggaagtgccttttagtggagagtgcttctgaaactcttcaggctttggcgatccaaagagc
 acgatttgcaataaaaacttagcagatgatgatgatgattcaccagtgccttgtcttagtt
 agtaatttttcccagagccactctttgcgagtgcgcacgaacaatcctgcgcgaggtttgac
 tgaataagccagaaaaaggtcgtaacacgtgcgttggttagccgagacagatcccaattga
 agacatctaacacctgattggatatgatcatcatttttagccggaggaggattatcctctcgc
catttcaccatatctttatacatgagtgcgcacgtgcacccatttcattaccatatattcc
 ttatttaactaaaaaggcccatatcttcgcgagatacttatatatatatatatatatata
tatatatatatatatatatatatatataaaaaagctggactaaccagatctggtatgtac
 cacagcgactccagtggaagatagagctcgtaggaggtgttcaggagtttggttttggtctc
 cataggctgtgactgtgatggagacaggaccagtgtagcctagctccttgaaagctccttcc
 aaactgggacggacccacgagcatcgataccctctggaaccggacagtcaaacatgtccca
 ccacaccgctattttagccgccgccgcgcgcagcagcatcgttcccacccattctctctaca
 ccttttaaca

Fig. 8

A: Consenso 1 (SEC ID NO: 3)

GAGAGAGAGAGAGAGACACTTCGATGAATATAGCTTCGAGGATTCGACGAAGTTTCTTTAGA
 GAGGAGAAGAGGAACTTCCTA (G/A) T (A/G) TAAATGGATCCTCGAGCAGGAACGAAGAT
 GATGATTTGCTAGGAGTGA CTG (T/A) TGAATTGATCGATCACGTCAGATCTTTCACCATTG
 ACACGTTTAAGAACTTCTCTCTCTACGGTAATTTTCGAAT (T/C) CGA (T/G) TCTCAATTTG
 ATGATTTTTTTCTCGA (TTGGTGAACAATC / .) AAGCAGTAGTGATATGGGG (A/G) TTATG
 TTT (G/A) TGGAAGTAGACGAAGAAGCGTGTGT (A/T) AATCCT (C/T) TGGAAGAA (. /GA
 A) GATGAAGAAGTGAGCTCCTCTGAGAATG (T/C) GAAGAAGTATTGTCTGATTGCC

B: Consenso 2 (SEC ID NO: 6)

CAGAGAAAATGATTAA (TGAGCAAAA / .) GCAAAAGTTTACAACACAAAGGGACTTTCTGCT
 A (C/A) CCTCAACAGTCATCAGGCCTT (T / .) AAAATTCCT (C/T) AAGATTAAAGCT (C/T
) TCAATTAATCCTAATAGCAACCTTAGATTTAACATTACTTCTTCATTTGACA (A/C) ACAT
 TACCACAGCTAATTGGGCTTATTTCACTATTCATATCAATAACAATAGTTTCCCAATCAAC (.
 TAAAAACAGAAGGGAAAACCCACCTTCGTTTAACATTCTAAAATCCAAATAATTGGACTCAA
 TATGAAGCTAAAAGCCC / AACACCTAC) TAACAATCCGACAAGTTCACGGCCTACATTGAAG
 CAGAGAACCAGAAAACGCAACAAATAAA (T/G) ATCAGAAACCACATTACCATTTCCAACGA
 ATCTATAGGAGCTGCTTGAGAGAAGTGAA (T/C) CCATGG (C/T) CGG

Fig. 9

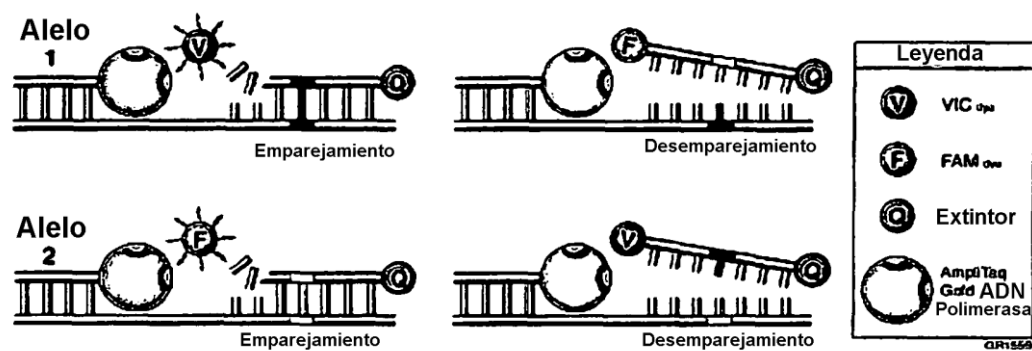


Fig. 10

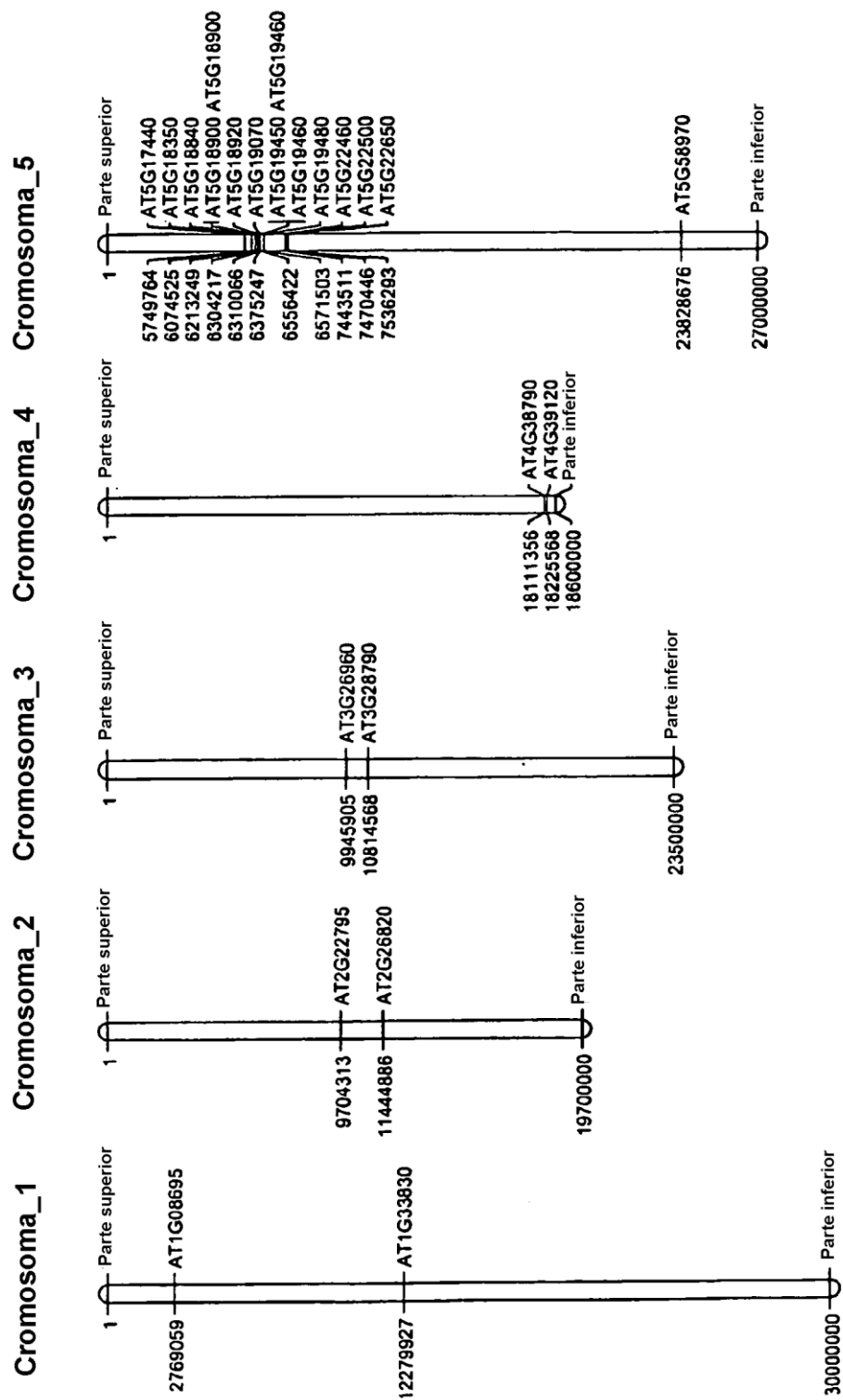


Fig. 11

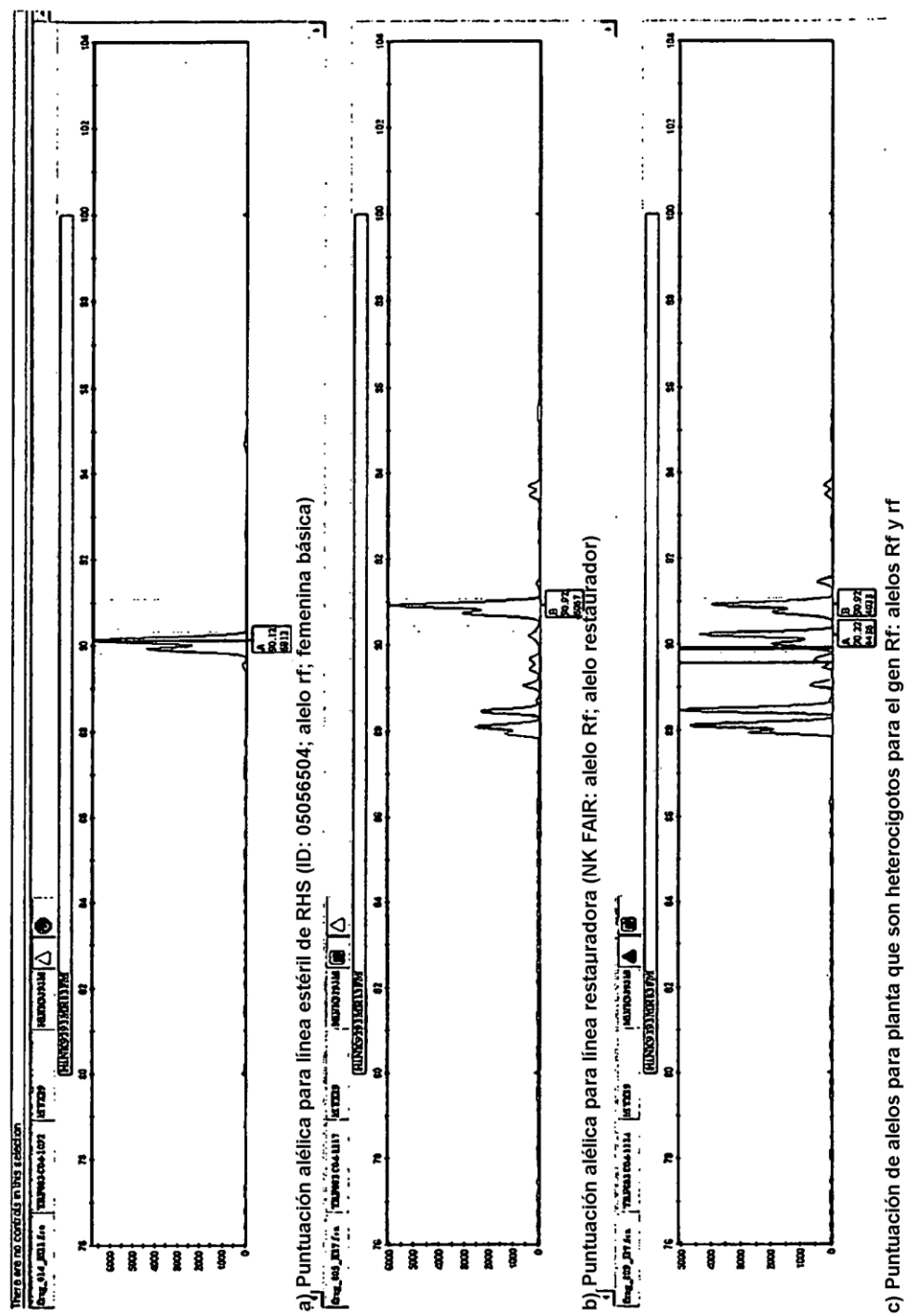


Fig. 12

NR3454 (acceso Genbank: DQ973844)

CTCAGAAGCGGTGTGGATCTTGTCTTTCCCTCGTCTCTTCCTCGTCGCTAAGACCAGAACCCA
 TTTCTTGATTGCTGCTTGAGATGTTGGACTCTTGAAGTTTCTCATCTGATGACCTTTTGAGA
 TTAGTGAGACTCTTGGTACCCACCTCAAAGGATGGGGATGGTGATGGTGATGGTGATAGGTC
 TTCTCTGTATGACGAATGGTCCAGTAGTACTTTCTGCCTTTTGAGACGTGGACCATCATCAC
 CACCACAGCTTTCGGTTTCATCCAGTTCTTCTTCTTCTGTTGTTTTATTATTGCACGCTTGT
 TGTTCAACTGGGAATGGAGAGTGACCTATGCTCGTCACTTCATCATCATCACTCTCGCAATC
 ATCATTGTCTTCATCATCAGAATACAGTAGTGCGTTAATTTCCCTCAGTGTCTTCGTGCATCT
 CTGACTCCTTCTCTTCGCCATTGACATGATCTTCATGGAGGAATATCTTTTCTGGGAATGGC
 ATGATCTTTACTTAACCCTTCTCTAGGTTTAGAAAATTGAGAAATTTCTCTGGATCAGTAG
 CCACAAAAGAGGGAAAACGAACT

Fig. 13