

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 765**

51 Int. Cl.:
C07H 21/04 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04710183 .7**
96 Fecha de presentación: **11.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1613725**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Genes FAD2 y FAD3 Alterados en Brassica y la detección asistida por marcadores moleculares de éstos**

30 Prioridad:
11.02.2003 US 446429 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2012

73 Titular/es:
DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268, US

72 Inventor/es:
HU, XUEYI;
SULLIVAN-GILBERT, MANDY, LYNNE;
GUPTA, MANJU y
THOMPSON, STEVEN, ARNOLD

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 765 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Genes FAD2 y FAD3 Alterados en Brassica y la detección asistida por marcadores moleculares de éstos.

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere en general a métodos y materiales para uso en la mejora genética de plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la identificación asistida por marcadores de genes que codifican rasgos fenotípicos en especies de plantas de semillas oleaginosas y en especies de *Brassica* en particular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El género *Brassica* incluye canola, uno de los cultivos de semillas oleaginosas más importantes del mundo, y el cultivo de semillas oleaginosas más importante que se crece en regiones geográficas templadas. La canola se ha caracterizado tradicionalmente como *Brassica napus* (una especie derivada como resultado de cruces inter-específicos de *Brassica rapa* y *Brassica oleracea*) en la que el ácido erúxico y los glicosinolatos se han eliminado o reducido significativamente mediante mejora genética convencional. La mayor parte del aceite de canola está en la forma de aceites vegetales producidos para consumo humano. También existe un mercado creciente para el uso de aceite de canola en aplicaciones industriales.

15 La canola es una especie poliploide que se considera que ha surgido a partir de la hibridación de *Brassica oleracea*, que tiene un genoma diploide C, y *Brassica rapa*, que tiene un genoma diploide A. Las investigaciones citogenéticas revelaron que los genomas AA y CC muestran un grado de relación, siendo parcialmente homólogos entre sí y se piensa que han derivado de un genoma ancestral común (Prakash y Hinata, 1980). Aunque se clasifican técnicamente como diploides, los genomas de ambas especies progenitoras contienen un alto porcentaje de regiones duplicativas uno del otro (Song *et al.*, 1991). El análisis genético reveló que el genoma AA de *Brassica rapa* contribuía con diez cromosomas a *Brassica napus*, mientras que *Brassica oleracea* contribuía con nueve cromosomas de su genoma CC como el donante materno (Song *et al.*, 1992).

20 La calidad del aceite comestible e industrial derivado de una variedad particular de semilla de canola se determina por sus ácidos grasos constituyentes, ya que el tipo y cantidad de insaturación de los ácidos grasos tiene implicaciones para las aplicaciones tanto dietéticas como industriales. El aceite de canola convencional contiene aproximadamente 60% de ácido oleico (C18:1), 20% de ácido linoleico (C18:2) y 10% de ácido linolénico (18:3). Los niveles de ácido linolénico poliinsaturado típicos de canola convencional son indeseables ya que el aceite se oxida fácilmente, viéndose afectada la proporción de oxidación por varios factores, incluyendo la presencia de oxígeno, exposición a la luz y calor, y la presencia de antioxidantes y pro-oxidantes nativos o añadidos en el aceite. La oxidación causa sabores anormales y rancidez como resultado de fritura repetida (oxidación inducida) o almacenamiento durante un periodo prolongado (auto-oxidación). La oxidación también puede alterar las propiedades lubricantes y viscosas del aceite de canola.

25 Los aceites que presentan niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados e incrementos en el nivel de ácido oleico monoinsaturado respecto al aceite de canola convencional están asociados con una mayor estabilidad oxidativa. La susceptibilidad de los ácidos grasos individuales a la oxidación depende de su grado de insaturación. Así, la velocidad de oxidación del ácido linolénico, que posee tres enlaces dobles carbono-carbono, es 25 veces la del ácido oleico, que sólo tiene un doble enlace, y 2 veces la del ácido linoleico, que tiene dos enlaces. Los ácidos linoleico y linolénico son los que tienen el mayor impacto en el sabor y olor porque forman fácilmente hidroperóxidos. El aceite oleico alto ($\geq 70\%$ oleico) es menos susceptible a la oxidación durante el almacenamiento, fritura y refinamiento, y puede ser calentado a una temperatura más alta sin producir humo, haciéndolo más adecuado como aceite de cocina.

30 Generalmente se usan dos estrategias para incrementar la estabilidad oxidativa del aceite de canola. En una estrategia, se usa la hidrogenación parcial para disminuir el contenido de ácido linolénico. Desafortunadamente, la hidrogenación parcial da lugar a la formación de ácidos grasos trans, que se han asociado a niveles elevados de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL o colesterol "malo") en la sangre y, consecuentemente, a un riesgo incrementado de enfermedad cardíaca coronaria. La segunda estrategia principal implica programas de mejora genética para desarrollar variedades de canola con niveles altos de ácido oleico y bajos de linolénico respecto al aceite de canola convencional. Se han producido mutantes con oleico alto y linolénico bajo mediante mutagénesis (Rakow, 1973; Wong *et al.* 1991; Auld *et al.* 1992) y modificación transgénica (Debonte e Hitz, 1996). Los ejemplos de variedades de canola vendidas comercialmente que tienen un perfil de ácidos grasos de C18:1 por encima del 70% y C18:3 por debajo del 3,5% son las variedades Nexera™, comercializadas por Dow AgroSciences LLC (Indianapolis, IN), variedades que producen aceite Natreon™. Una de dichas líneas, AG019 (una variedad de Nexera™) contiene 71-78% ácido oleico (C18:1) y <3% linolénico (C18:3). AG019 se creó originariamente por mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS) y se describe en US 6.169.190 B1 de Sernyk, cedida al cesionario de la presente invención.

35 Los métodos actuales para producir semillas de *Brassica* híbridas F₁ tienen limitaciones definidas en términos de coste y pureza de las semillas. Generalmente, estos métodos requieren líneas parentales mejoradas estables,

incompatibles con hermanos y auto-incompatibles, casi homocigotas, líneas parentales mejoradas que están disponibles sólo después de autopolinización repetida para generar líneas endogámicas. Además, la endogamia para desarrollar y mantener las líneas parentales se consigue por técnicas de trabajo intensivas, tales como autopolinización en preantesis, ya que los sistemas de producción de semillas híbridas de *Brassica* basados en rasgos auto-incompatibles deben utilizar plantas fuertemente auto-incompatibles. Las condiciones medioambientales durante el proceso de mejora genética, tales como temperatura y humedad, afectan típicamente el metabolismo lipídico de la planta, afectando así también al nivel de contenido de ácidos grasos (Harwood, 1999). La variabilidad medioambiental hace, por lo tanto, que la selección fenotípica de las plantas sea menos fiable. Deng y Scarth (1998) encontraron que el incremento en la temperatura post-floración reducía significativamente los niveles de C18:3 e incrementaba los de C18:1. Se indicaron resultados similares en otros estudios (Yermanos y Goodin, 1965; Canvin, 1965).

La mejora genética para variedades con linolénico bajo es particularmente desafiante ya que el contenido de C18:3 es un rasgo multi-génico y se hereda de manera recesiva con una heredabilidad relativamente baja. Los análisis genéticos de una población derivada del cruce entre "Stellar" (que tiene un contenido bajo de C18:3 (3%)) y "Drakkar" (que tiene un nivel "convencional" de C18:3 (9-10%)) indicaron que el rasgo de C18:3 bajo estaba controlado por dos loci principales con efectos aditivos designados L1 y L2 (Jourden *et al.*, 1996b). Se encontró que estos dos loci principales que controlan el contenido de C18:3 correspondían a dos genes *fad3* (ácido graso desaturada 3); uno localizado en el genoma A (que se origina de *Brassica rapa*) y el otro en el genoma C (que se origina de (*Brassica oleracea*) (Jourden *et al.*, 1996; Barret *et al.*, 1999).

Los rasgos que están variando continuamente debido a influencias genéticas (aditivas, dominantes y epistáticas) y medioambientales se refieren comúnmente como "rasgos cuantitativos". Los rasgos cuantitativos pueden distinguirse de los rasgos "cualitativos" o "discretos" tomando como base dos factores: influencias medioambientales en la expresión génica que producen una distribución continua de los fenotipos; y el patrón de segregación complejo producido por herencia multigénica. La identificación de una o más regiones del genoma ligadas a la expresión de un rasgo cuantitativo dio lugar al descubrimiento de Loci de Rasgos Cuantitativos ("QTL"). Thormann *et al.* (1996) localizaron dos QTL que explicaban el 60% de la varianza para el contenido de linolénico, mientras que Somers *et al.* (1998) identificaron tres QTL que explicaban colectivamente el 51% de la variación fenotípica del contenido de C18:3. Un modelo aditivo de tres locus también fue indicado por Chen y Beversdorf (1990). Rucker y Röbbelen (1996) indicaron que varios genes menores estaban muy probablemente implicados en la etapa de desaturación.

La heredabilidad para el contenido de C18:3 se estimó que era 26-59% (Kondra y Thomas, 1975) (en la que la variabilidad de la heredabilidad es una función de la genética a diferencia de los factores medioambientales). La complejidad de la herencia del ácido linolénico puede deberse al hecho de que el ácido linolénico puede sintetizarse bien por la desaturación de C18:2 o la elongación de C16:3 (Thompson, 1983).

A diferencia del ácido linolénico, la herencia del ácido oleico es menos compleja, y la heredabilidad del ácido oleico es relativamente alta. Se indica que un contenido alto de ácido oleico está controlado por un locus principal denominado gen *fad2* (ácido graso desaturasa 2) que codifica la enzima responsable de la desaturación del ácido oleico en ácido linoleico (C18:2) (Tanhuanpaa *et al.*, 1998; Schierholt *et al.*, 2001). Todas las copias génicas funcionales del gen *fad2* que se han indicado y localizado hasta la fecha están localizadas en el grupo de ligamiento N5 originado del genoma A (Scheffter *et al.*, 1997; Schierholt *et al.*, 2000). Chen y Beversdorf (1990) indicaron que la acumulación de ácido oleico estaba controlada al menos por dos sistemas genéticos de segregación, uno que actúa en la elongación de la cadena y el otro que implica desaturación. La heredabilidad del contenido de C18:1 se estimó que era 53% a 78% (Kondra y Thomas 1975) y 94% (Schierholt y Becker, 1999), respectivamente. Debido a la alta heredabilidad, la expresión del contenido de C18:1 está menos afectada por el medioambiente y es relativamente estable (Schierholt y Becker, 1999).

En el germoplasma de canola Nexera™, se encontró que 1 a 2 genes controlan el contenido de C18:1 y al menos 3 genes están implicados en la expresión de C18:3. En progenies segregantes, la distribución del contenido de C18:3 en las semillas es continua, haciendo difícil de esta manera identificar las clases genotípicas con niveles deseables de C18:3. Además, existe una baja correlación en el contenido de ácidos grasos entre plantas crecidas en invernadero (GH) y en el campo, haciendo más desafiante la selección fiable de plantas GH con niveles deseables de C18:3.

La selección de marcadores moleculares se basa en los genotipos y por lo tanto es independiente de los efectos medioambientales. Los marcadores moleculares mitigarían el problema de la selección no fiable de plantas en el invernadero debido a la baja correlación en el contenido de ácidos grasos entre plantas crecidas en el invernadero y plantas crecidas en el campo. De forma significativa, los marcadores moleculares ligados firmemente a los genes que controlan el contenido de C18:1 y C18:3 permitirían una selección temprana de las plantas que portan los genes para C18:1 alto y C18:3 bajo. La selección asistida por marcadores en una etapa temprana ahorraría de forma significativa espacio en el invernadero, mejorando por lo tanto la eficacia del uso del invernadero y reduciendo la carga de trabajo de la mejora genética en el campo.

De forma más general, los marcadores moleculares tienen ventajas sobre los marcadores morfológicos porque: los marcadores moleculares pueden ser altamente polimórficos mientras que los marcadores morfológicos dependen

estrictamente del fenotipo; los marcadores morfológicos pueden interferir con la clasificación de determinados fenotipos cuantitativos mientras que los marcadores moleculares presentan una relación 1:1 entre el genotipo y el fenotipo (permitiendo así la clasificación sin ambigüedad de todos los genotipos posibles para un locus dado); y las interacciones epistáticas tienden a limitar el número de marcadores morfológicos útiles en una población, mientras que los marcadores moleculares no interactúan epistáticamente.

Se ha identificado que diferentes tipos de marcadores moleculares tales como marcadores RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente) (Tanhuanpaa *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1995; Rajcan *et al.*, 1999; Jourden *et al.*, 1996), marcadores RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción) (Thormann *et al.*, 1996) y marcadores SCAR (región amplificada caracterizada por secuencia) (Hu *et al.*, 1999) están asociados con niveles bajos de C18:3 en *Brassica napus*. También se han identificado marcadores moleculares para contenido alto de C18:1. Se identificó que un marcador RAPD estaba ligado al QTL que afectaba la concentración de ácido oleico en el nabo de primavera (*B. rapa sp. oleifera*) y posteriormente se convirtió en un marcador SCAR (Tanhuanpaa *et al.*, 1996). Schierholt *et al.* (2000) identificaron tres marcadores AFLP ligados a una mutación de ácido oleico alto en la colza de invierno (*B. napus L.*). Tanhuanpaa *et al.* (1998) desarrollaron un marcador de PCR específico de alelo para el ácido oleico comparando el alelo de ácido oleico de tipo salvaje con el alto del locus del gen *fad2* en el nabo de primavera (*B. rapa sp. oleifera*). Sin embargo, la mayor parte de estos marcadores son marcadores de bajo rendimiento de manera que RAPD, AFLP y RFLP no son adecuados para un cribado a gran escala mediante automatización.

Por lo tanto, lo que se necesita en la técnica son marcadores moleculares adecuados para identificar plantas de canola que producen un aceite de semilla con niveles deseados de ácido oleico alto y ácido linolénico bajo que convierten el aceite en suficientemente estable para usos en varias aplicaciones dietéticas e industriales. Sería más ventajoso localizar los genes responsables de la concentración de ácido oleico y linolénico y desarrollar marcadores de PCR de alto rendimiento ligados al contenido alto de ácido oleico y bajo de ácido linolénico con el fin de facilitar la selección de estos rasgos en la introgresión y mejora genética de rasgos de cultivos de semillas oleaginosas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos de selección asistida por marcadores en canola y otras especies de cultivos de semillas oleaginosas, así como ácidos nucleicos aislados para uso como marcadores moleculares en dichos métodos.

En una primera realización, se proporciona un marcador genético aislado y purificado asociado con un contenido alto de aceite oleico en *Brassica*. El marcador se localiza en un grupo de ligamiento seleccionado del grupo que consiste en N5 y N1 en el genoma de *Brassica*, y tiene la secuencia de SEQ ID NO. 5 o un derivado de ésta. También se proporciona un marcador genético aislado y purificado asociado con un contenido bajo de ácido linolénico en *Brassica*. El marcador se localiza en un grupo de ligamiento seleccionado del grupo que consiste en N14 y N4 en el genoma de *Brassica* y tiene la secuencia de SEQ ID NO. 6 o un derivado de ésta.

En otra realización, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico correspondientes a genes *fad2* y/o *fad3* mutados. Estos genes pueden introducirse en las plantas de canola u otras plantas con semillas oleaginosas mediante varios métodos conocidos en la técnica. Además, *fad2* y/o *fad3* de tipo salvaje pueden alterarse mediante métodos conocidos *in vivo* o *in vitro* para corresponder a los genes *fad2* y/o *fad3* de la presente invención.

En una realización adicional, se describen marcadores moleculares correspondientes a las mutaciones de los genes *fad2* y *fad3*. Los marcadores de la presente invención son muy útiles para la selección directa de alelos deseables *fad2* y *fad3* durante la introgresión y mejora genética de rasgos asistida por marcadores. En un aspecto de la realización, se proporcionan dos marcadores de polimorfismo de un único nucleótido (SNP) que corresponden a los alelos. Así, la presente invención permite ventajosamente a un experto en la técnica la mejora genética para los marcadores moleculares descritos en la presente memoria, o derivados de éstos, en lugar de la mejora genética para el fenotipo.

En una realización relacionada, se describen métodos para selección asistida por marcadores para plantas con semillas oleaginosas con oleico alto y/o linolénico bajo. En un aspecto de la realización, se proporcionan métodos para introgresar rasgos de manera fiable y predecible para contenido alto de oleico y/o bajo de linolénico en germoplasma de *Brassica*. Los métodos incluyen: (a) identificar uno o más marcadores de ácido nucleico para la selección asistida por marcadores en líneas de *Brassica* que se van a usar en un programa de mejora genética de *Brassica*, en el que los marcadores de ácido nucleico se localizan en al menos uno de los grupos de ligamiento N14, N4, N5 o N1 y en el que los marcadores de ácido nucleico se seleccionan de entre cualquiera de SEQ. ID. NOs. 5 y 6, y (b) introgresar dichos rasgos para contenido alto de oleico y/o bajo de linolénico en dicha *Brassica* realizando una selección asistida por marcadores. Se traza un método adicional para identificar ácido nucleico como un modulador de contenido alto de oleico y/o bajo de linolénico en *Brassica*, y comprende exponer ácido nucleico de *Brassica* a un marcador molecular seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. Nos. 5 y/o 6.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 muestra las secuencias de nucleótidos genómicas parciales del gen *fad2* clonado a partir de DMS100 y Quantum. La parte superior es la secuencia de DMS100 (SEQ. ID. NO. 7) y la parte inferior es la secuencia de Quantum (SEQ. ID. NO. 9). La punta de flecha indica una mutación en un único nucleótido de C a T, que resultó en un codón de parada (TAG) (sombreado). Los cebadores directos e inversos para el marcador específico de alelo mutante basado en PCR están en negrita y subrayados.

La FIG. 2 proporciona las secuencias de aminoácidos del gen *fad2*, degeneradas a partir de la secuencia de nucleótidos genómica clonada a partir de DMS100 (SEQ. ID. NO. 8), Quantum (SEQ. ID. NO. 10) y a partir de un gen *fad2* de *Brassica napus* publicado (BNfad2) (SEQ. ID. NO. 11). La punta de flecha indica la posición del codón de parada que resulta de una mutación en un único nucleótido (C a T) en DMS100.

La FIG. 3 muestra las secuencias de nucleótidos genómicas del gen *fad3c* clonado a partir de DMS100 y Quantum. La parte superior es la secuencia de DMS100 (SEQ. ID. NO. 12) y la parte inferior es la secuencia de Quantum (SEQ. ID. NO. 13). Los exones están en recuadrados, los intrones no están recuadrados, que corresponden a los exones 4, 5, 6 y 7 y a los intrones 4, 5 y 6 del gen *fad3* en *Brassica rapa* y *Arabidopsis*. La punta de flecha indica una mutación en un único nucleótido de G a A. Los cebadores directos e inversos para el marcador específico de alelo mutante basado en PCR están en negrita y subrayados.

La FIG.4 proporciona una tabla que correlaciona los marcadores específicos de alelos mutantes y el contenido de ácidos grasos de 184 líneas DH derivadas del cruce de Quantum y DMS100, así como los resultados de electroforesis de los productos de PCR amplificados a partir del marcador específico de alelo mutante para el gen *fad2*.

La FIG. 5 es un mapa de QTL que muestra una región QTL principal (N5) y una menor (N1) para C18:1 alto y tres regiones QTL (N4 y N14) para C18:3 bajo detectadas por marcadores de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención se refiere en general a métodos y materiales para uso en la mejora genética de plantas. En una realización preferida, la presente invención se refiere a métodos y composiciones de contenido para la identificación asistida por marcadores de genes que codifican rasgos de oleico alto, linolénico bajo en canola.

Por "locus genético" se quiere decir una localización en un cromosoma.

Por "locus genómico" se quiere decir una localización en el conjunto completo de cromosomas de un organismo.

Tal y como se usa en la presente memoria, "desequilibrio de ligamiento" se refiere a una asociación estadística entre dos loci o entre un rasgo y un marcador.

Tal y como se usa en la presente memoria, "marcador" incluye referencias a un locus en un cromosoma que sirve para identificar una posición única en el cromosoma. Un genotipo puede definirse por el uso de uno o una pluralidad de marcadores.

El término "derivado", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una modificación de una secuencia descrita en la presente invención. Como ilustración de dichas modificaciones respecto a los marcadores moleculares serían la sustitución, inserción y/o delección de una o más bases respecto a una secuencia de ácido nucleico de un marcador descrito en la presente memoria que conserva, altera ligeramente o incrementa la función del marcador molecular para identificar uno o más rasgos de oleico alto y/o linolénico bajo en *Brassica* u otras especies de cultivos de semilla oleaginosa. Dichos derivados pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, usando técnicas de modelado informático para predecir y optimizar la estructura de la secuencia. El término "derivado" también incluye así las secuencias de ácido nucleico que tienen una homología de secuencia sustancial con las secuencias del marcador descritas en la presente memoria de manera que son capaces de tener las funcionalidades descritas para uso en la mejora genética asistida por marcadores.

El término "homología", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una que al menos inhibe parcialmente la hibridación de una secuencia idéntica con un ácido nucleico diana; se refiere usando el término funcional "homólogo sustancial". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o northern, hibridación en disolución y semejantes) bajo condiciones de astringencia baja. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia o sonda completamente homóloga a la secuencia diana bajo condiciones de astringencia baja. Esto no significa que las condiciones de astringencia baja son tales que se permite la unión no específica; las condiciones de astringencia baja requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede ensayarse por el uso de una segunda secuencia diana que carezca incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, menos de aproximadamente 30% de

identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no hibridará con la segunda secuencia diana no complementaria.

Los términos "identidad" y "similitud", tal y como se usan en la presente memoria, y como es conocido en la técnica, son relaciones entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias polinucleotídicas, como se determina comparando las secuencias. En la técnica, identidad también significa el grado de relación de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias polinucleotídicas, como se determina por la coincidencia entre dos cadenas de dichas secuencias. Tanto la identidad como la similitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); y Sequence Analysis Primer, Gribskov M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991)). Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, los descritos en Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la máxima coincidencia entre las dos secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos. Los métodos de programas informáticos típicos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen: paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA y TFASTA (Atschul, S.F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)).

Una "inserción" o "adición", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un cambio en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que resulta en la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, comparado con la molécula natural.

El término "estadísticamente asociado" se refiere a la tendencia de dos eventos a ocurrir conjuntamente en una frecuencia mayor de la atribuible al azar, en la que la frecuencia atribuible al azar se representa por un nivel de significancia pre-determinado. La asociación estadística puede determinarse por uno cualquiera de varios ensayos de significancia muy conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, ensayos ANOVA o de t. Véase, por ejemplo, Statistical Methods, Snedecor, G.W. y Cochran, W.G., Iowa State University Press, Ames, Iowa (1985). Los niveles de significancia para alfa son preferiblemente menores de 0,01. Por ejemplo, los niveles de significancia para esta invención podrían variar entre 0 y aproximadamente 0,250, por ejemplo, menos de aproximadamente 0,0001, 0,00050, 0,0010, 0,0050, 0,010, 0,025, 0,050, 0,100 ó 0,250.

El término "astringencia" se usa en la presente memoria para describir las condiciones de temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, bajo las cuales se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. Los expertos en la técnica reconocerán que las condiciones de "astringencia" pueden alterarse variando los parámetros ya descritos bien individualmente o conjuntamente. Con condiciones de "astringencia alta", el emparejamiento de bases de los ácidos nucleicos sólo ocurrirá entre fragmentos de ácido nucleico que tengan una frecuencia alta de secuencias de bases complementarias (por ejemplo, la hibridación bajo condiciones de "astringencia alta" puede ocurrir entre homólogos con aproximadamente 85-100% de identidad, preferiblemente aproximadamente 70-100% de identidad). Con condiciones de astringencia media, el emparejamiento de las bases de los ácidos nucleicos ocurrirá entre ácidos nucleicos con una frecuencia intermedia de secuencias de bases complementarias (por ejemplo, la hibridación bajo condiciones de "astringencia media" puede ocurrir entre homólogos con aproximadamente 50-70% de identidad). Así, las condiciones de astringencia "débil" o "baja" se requieren frecuentemente con ácidos nucleicos que se derivan de organismos que son genéticamente diversos, ya que la frecuencia de las secuencias complementarias es habitualmente menor.

Tal y como se usa en la presente solicitud, el término "homología sustancial de secuencia" se usa para indicar que una secuencia de nucleótidos (en el caso de ADN o ARN) o una secuencia de aminoácidos (en el caso de una proteína o polipéptido) presenta una equivalencia sustancial, funcional o estructural con otra secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Cualesquiera diferencias funcionales o estructurales entre secuencias que tienen una homología sustancial de secuencia serán *de minimis*; esto es, no afectarán a la capacidad de la secuencia para funcionar como se indica en la presente solicitud. Las secuencias que tienen homología sustancial de secuencia con las secuencias descritas en la presente memoria son habitualmente variantes de la secuencia descrita, tales como mutaciones, pero también pueden ser secuencias sintéticas.

Una "sustitución", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al reemplazo de uno o más aminoácidos o nucleótidos por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente.

Las variedades de canola DMS100 (tipo mutante) y Quantum (tipo salvaje) se usaron en la clonación de los alelos *fad2* (ácido graso desaturasa-2) y *fad3* (ácido graso desaturasa-3). La variedad DMS100 se derivó de un grupo de F₄ de una selección de plantas F₃ única que se origina del cruce de la línea hermana Global X AG019. DMS100 es una línea HOLL (High Oleic and Low Linolenic) con un contenido de ácido oleico de aproximadamente 77% y un contenido de ácido linolénico de aproximadamente 3%. Quantum es una variedad comercial y contiene bajo contenido de ácido oleico (~66%) y alto de ácido linolénico (~7%). Como se discute con detalle en la presente memoria, la secuenciación de clones genómicos de DMS100 de enzimas desaturasa *fad2* y *fad3* implicadas en la ruta de síntesis de los ácidos grasos reveló mutaciones en un único nucleótido en cada uno de los genes. Los

análisis de secuencia adicionales muestran que las mutaciones son la causa de los contenidos alterados de ácidos grasos en DMS100. Estas dos mutaciones son distintas de las mutaciones publicadas previamente (Tanhuanpää et al. 1998; Jourden 1996) y el uso de estas secuencias como ácido nucleico aislado que confieren rasgos HOLL es un aspecto de la presente invención.

5 El contenido de C18:1 en canola se ve influido por un gen *fad2* que codifica una enzima (oleato desaturasa delta 12 endoplásmica) responsable de la desaturación del ácido oleico (C18:1) a ácido linoleico (C18:2). En los Ejemplos siguientes, se secuenciaron 9 clones DMS100 y 10 clones Quantum. El análisis de la secuencia y el alineamiento de estos clones identificaron una mutación en un único nucleótido, C a T, en la posición 411 que ocurría consistentemente en la secuencia del gen *fad2* de todos los clones DMS100 (SEQ. ID. NO. 7) pero no en los clones
10 Quantum (SEQ. ID. NO. 9) (véase la FIG. 1). El análisis adicional indicó que esta mutación en un único nucleótido ocurría en la secuencia codificadora (exón) del gen *fad2* (véase la FIG. 2). Como se muestra adicionalmente en la FIG. 1, la mutación de C a T creó un codón de parada (TAG) que causa la terminación temprana de la cadena polipeptídica durante la traducción. El codón de parada resulta en la incorporación de sólo 185 aminoácidos en el polipéptido en lugar de los 384 aminoácidos del polipéptido de longitud completa (FIG. 2). El polipéptido truncado
15 parece tener poca, o ninguna, función como una desaturasa activa para la desaturación de ácido oleico a ácido linoleico, dando lugar así a la acumulación de ácidos oleicos en las semillas de la línea mutante. La ausencia de funcionalidad del gen *fad2* mutante explica el contenido significativamente mayor (77%) de C18:1 de DMS100 respecto a la línea de tipo salvaje Quantum (66%).

El gen *fad3* codifica la linoleico desaturasa delta-15 endoplásmica, una enzima responsable de la desaturación de ácido linoleico (C18:2) a ácido linolénico (C18:3). Se ha indicado que dos genes *fad3* (*fad31* y *fad32*) en particular controlan el contenido de linolénico. Se secuenciaron siete clones DMS100 y 6 clones Quantum de *fad31* y 6 clones DMS100 y 6 clones Quantum de *fad32*. El análisis de la secuencia y alineamiento no revelaron diferencias en la secuencia entre los clones DMS100 y Quantum para *fad31* (datos no mostrados). Sin embargo, el alineamiento de la secuencia reveló una mutación en un único nucleótido, G a A, en la primera base del sitio de corte y empalme 5' del
20 tercer intrón en el gen *fad32* (véase la FIG. 3). Este intrón corresponde al intrón 6 del gen *fad3* en *B. rapa* (Tanhuanpää, 2000) y *Arabidopsis* (Nishiuchi et al. 1994). El gen *fad3* de *B. rapa* y *Arabidopsis* contiene 8 exones y 7 intrones, mientras que la secuencia examinada cubre los exones 4 (parcial), 5, 6 y 7 (parcial) y los intrones 4, 5 y 6. Esta interpretación de exones/intrones en el gen *fad3* está apoyada por el hecho de que la secuencia del gen *fad3* está altamente conservada entre las especies secuenciadas de *Brassica* y *Arabidopsis*.

30 Los intrones de plantas contienen sitios de corte y empalme 5' (unión exón/intrón-AG/GTAAG) y sitios de corte y empalme 3' (unión intrón/exón-TGCAG/G) altamente conservados. Los dos primeros nucleótidos en la secuencia de unión de intrón en el sitio de corte y empalme 5', +1G y +2T, han mostrado 100% y 99% de conservación respectivamente entre más de 1.000 intrones de *Arabidopsis* estudiados (Lorkovic, 2000 y Brown, 1996). La exactitud del corte y empalme depende de los mecanismos del reconocimiento de la señal del intrón y de la
35 selección correcta de los sitios de corte y empalme 5' y 3'. Refiriéndonos de nuevo a la FIG. 3, la mutación de +1G a +1A en el sitio de corte y empalme 5' (posición 530) identificada en la presente memoria puede suprimir el corte y empalme o dar lugar a ausencia de exones, es decir, el exón afectado (exón 6) y los dos intrones flanqueantes se eliminan en un único evento de corte y empalme (Lorkovic et al., 2000; Simpson et al., 1998). Dicha ausencia de exones podría dar lugar a la síntesis de un polipéptido que carece de los aminoácidos codificados por el exón 6 del
40 gen *fad3*. La mutación también podría bloquear el corte y empalme en el sitio de corte y empalme 5' normal y activar sitios de corte y empalme crípticos en diferentes posiciones, lo que puede causar el corte y empalme críptico del exón afectado junto con el intrón en 3' (McCullough et al., 1993). Dicho corte y empalme críptico podría dar lugar a la terminación temprana de la traducción y a la síntesis de un polipéptido más corto para la linoleato desaturasa delta-15 codificada por *fad3*. Esto ocurrirá porque el intrón contiene codones de parada en todos los 3 marcos de lectura
45 posibles y, por lo tanto, los exones 7 y 8 no se traducirán. La traducción incompleta de *fad3* puede inactivar la enzima y bloquear la desaturación de ácido linoleico (C18:2) a ácido linolénico (C18:3), lo que resulta en la disminución de la acumulación de C18:3 en las semillas de canola.

Estos datos sugieren fuertemente que las mutaciones en un único nucleótido identificadas en los genes *fad2* y *fad3* son factores que son responsables del incremento en los contenidos de ácido oleico y disminución en los de ácido linolénico en la línea de canola DMS100. Usando los marcadores moleculares de la presente invención o marcadores con homología sustancial con éstos, estas dos mutaciones pueden servir para permitir la introgresión asistida por marcadores en líneas de canola usando DMS100, su progenie o derivados, o versiones transgénicas de sus genes *fad2* y *fad3* mutados (SEQ. ID. NO. 7 (véase la FIG. 1) y SEQ. ID. NO. 12 (véase la FIG. 3) respectivamente), para propósitos de desarrollar canola HOLL.

55 Identificación de mutaciones en los genes *fad2* y *fad3*

Respecto a la FIG. 1, los cebadores homólogos a la secuencia del gen *fad2* de *Arabidopsis* se usaron para amplificar fragmentos de ADN genómico del gen *fad2* de las líneas de *B. napus* DMS100 y Quantum. El par de cebadores FAD2-2F: CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACC (SEQ. ID. NO. 1) y FAD2-6R: CCTTTCTTGTCACCTTCCCTGTCC (SEQ. ID. NO. 2) amplificó un fragmento de *fad2* de la misma longitud (986 pb) de cada uno de los dos parentales. Los fragmentos amplificados se clonaron y secuenciaron para investigar las
60 diferencias en la secuencia del gen *fad2* entre los dos parentales.

Los fragmentos de ADN genómico correspondientes a los genes *fad31* y *fad32* se amplificaron de las líneas DMS100 y Quantum usando PCR. Los cebadores para la amplificación se diseñaron a partir de las secuencias publicadas de los genes *fad31* y *fad32* de *B. napus* (Brunel *et al.* 1999, Registro GenBank AF056569 y AF056570, respectivamente). Los fragmentos de *fad31* amplificados por los pares de cebadores BNFD31-CF (GAGGCTTGGACGACCACTTG) (SEQ. ID. NO. 3) y BNFD31-CR (GACTGGACCAACGAGGAATG) (SEQ. ID. NO. 4) y los fragmentos de *fad32* amplificados por los pares de cebadores BNFD32-CF (CAAGAATTTGTCCCACAGTACAC) (SEQ. ID. NO. 4) y BNFD32-CR (CAACTGTTGTTAATCCTCCACG) (SEQ. ID. NO. 15) se clonaron porque estos fragmentos cubren más secuencias de cada gen. Se secuenciaron siete clones DMS100 y 6 clones Quantum de *fad31* y 6 clones DMS100 y 6 clones de Quantum de *fad32*. El análisis de la secuencia y alineamiento no revelaron diferencias en la secuencia entre DMS100 y Quantum para *fad31* (datos no mostrados). Sin embargo, el alineamiento de la secuencia reveló una mutación en un único nucleótido, G a A, en la primera base del sitio de corte y empalme 5' del tercer intrón en el gen *fad32* (véase la FIG. 3). Este intrón corresponde al intrón 6 del gen *fad3* en *B. rapa* (Tanhuanpää, 2000) y *Arabidopsis* (Nishiuchi *et al.* 1994). El gen *fad3* de *B. rapa* y *Arabidopsis* contiene 8 exones y 7 intrones, mientras que la secuencia examinada cubre los exones 4 (parcial), 5, 6 y 7 (parcial) y los intrones 4, 5 y 6. Esta interpretación de exones/intrones en el gen *fad3* está apoyada por el hecho de que la secuencia del gen *fad3* está altamente conservada entre las especies secuenciadas de *Brassica* y *Arabidopsis*.

Los intrones de plantas contienen sitios de corte y empalme 5' (unión exón/intrón-AG/GTAAG) y sitios de corte y empalme 3' (unión intrón/exón-TGCAG/G) altamente conservados. Los dos primeros nucleótidos en la secuencia de unión de intrón en el sitio de corte y empalme 5', +1G y +2T, han mostrado 100% y 99% de conservación respectivamente entre más de 1.000 intrones de *Arabidopsis* estudiados (Lorkovic, 2000 y Brown, 1996). La exactitud del corte y empalme depende de los mecanismos del reconocimiento de la señal del intrón y de la selección correcta de los sitios de corte y empalme 5' y 3'. Refiriéndonos de nuevo a la FIG. 3, la mutación de +1G a +1A en el sitio de corte y empalme 5' (posición 530) identificada en la presente memoria puede suprimir el corte y empalme o dar lugar a ausencia de exones, es decir, el exón afectado (exón 6) y los dos intrones flanqueantes se eliminan en un único evento de corte y empalme (Lorkovic *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 1998). Dicha ausencia de exones podría dar lugar a la síntesis de un polipéptido que carece de los aminoácidos codificados por el exón 6 del gen *fad3*. La mutación también podría bloquear el corte y empalme en el sitio de corte y empalme 5' normal y activar sitios de corte y empalme crípticos en diferentes posiciones, lo que puede causar el corte y empalme críptico del exón afectado junto con el intrón en 3' (McCullough *et al.*, 1993). Dicho corte y empalme críptico podría dar lugar a la terminación temprana de la traducción y a la síntesis de un polipéptido más corto para la linoleato desaturasa delta-15 codificada por *fad3*. Esto ocurrirá porque el intrón contiene codones de parada en todos los 3 marcos de lectura posibles y, por lo tanto, los exones 7 y 8 no se traducirán. La traducción incompleta de *fad3* puede inactivar la enzima y bloquear la desaturación de ácido linoleico (C18:2) a ácido linolénico (C18:3), lo que resulta en la disminución de la acumulación de C18:3 en las semillas de canola.

Estos datos sugieren fuertemente que las mutaciones en un único nucleótido identificadas en los genes *fad2* y *fad3* son factores que son responsables del incremento en los contenidos de ácido oleico y disminución en los de ácido linolénico en la línea de canola DMS100. Como se muestra en las FIGs. 1 y 3, respectivamente, los cebadores específicos de mutante FAD2GM (CGCACCGTGATGGTTAACGGTTT) (SEQ. ID. NO. 5) y FAD3cGM (ATAAATAATGTTGATCTACTTAT) (SEQ. ID. NO. 6) se diseñaron para propósitos de detectar los alelos HOLL mutantes de *fad2* y *fad32* usando amplificación por PCR. Usando los marcadores moleculares de la presente invención, estas dos mutaciones pueden servir para permitir la introgresión asistida por marcadores en líneas de *Brassica* usando los alelos HOLL de DMS100, su progenie o derivados, o versiones transgénicas de sus genes *fad2* y *fad3* mutados (SEQ. ID. NO. 7 (FIG. 1) y SEQ. ID. NO. 12 (FIG. 3) respectivamente), para propósitos de desarrollar canola HOLL.

Desarrollo de marcadores SNP específicos de alelo mutante para los genes *fad2* y *fad3*

En una realización actualmente preferida, las mutaciones en un único nucleótido presentes en los genes *fad2* y *fad3* se usan como marcadores SNP para tomar como diana los genes *fad2* y *fad3* para la selección de C18:1 alto y C18:3 bajo en la mejora genética de canola. Los cebadores específicos de mutante FAD2GM (CGCACCGTGATGGTTAACGGTTT) (SEQ. ID. NO. 5) y FAD3cGM (ATAAATAATGTTGATCTACTTAT) (SEQ. ID. NO. 6)) se diseñaron con el fin de detectar los alelos mutantes de *fad2* y *fad32* usando amplificación por PCR. Los cebadores se diseñaron de manera que la base mutada (SNP) estuviera en el extremo 3' de uno de los cebadores para la amplificación por PCR específica de alelo (FIGs. 1 y 3). Los cebadores específicos para *fad2* amplificaron una banda polimórfica que estaba presente en DMS100 y grupos de ADN para ácido oleico alto (C18:1) pero que estaban ausentes en Quantum y grupos de ADN para ácido oleico bajo (FIG. 4).

Este marcador específico de gen se ensayó en una población doble haploide (DH) derivada del cruce de Quantum y DMS100, en la que se encontró que la distribución de alelos estaba altamente correlacionada con C18:1 alto (véase la FIG. 4, Tabla 1). Los cebadores específicos de alelo de *fad3* también amplificaron un fragmento polimórfico que estaba presente en DMS100 pero ausente en Quantum. El análisis con la población DH indicó que este marcador específico de alelo estaba estadísticamente asociado con C18:3 bajo (véase la FIG. 4, Tabla 1). Así, se desarrollaron con éxito dos marcadores basados en PCR específicos de gen dirigidos directamente a las mutaciones de los genes *fad2* y *fad3*. Dada la descripción, serán evidentes para un experto en la técnica, variaciones o

derivados de los marcadores descritos en la presente memoria (incluyendo marcadores de varios tipos) basados por ejemplo en la homología sustancial sobre un número suficiente de pares de bases.

5 Mediante la localización genética y de QTL usando la población DH derivada del cruce de Quantum x DMS100, se encontraron una región QTL principal (N5) y una menor (N1) para C18:1 alto, y tres regiones QTL (N4 y N14) para C18:3 bajo (FIG. 5). Este resultado de localización de QTL es consistente con el análisis genético de que C18:1 alto está controlado por un gen principal y C18:3 bajo está controlado por múltiples genes. El marcador basado en el gen *fad2* se localizó exactamente en la localización en el mapa del locus de QTL principal para C18:1, lo que apoya el hecho de que este QTL corresponde al gen *fad2* funcional que se ve afectado por la mutación en DMS100. Esto también es consistente con los estudios previos de que el gen *fad2* está localizado en el grupo de ligamiento N5 (Schierholt, 2000). La localización del marcador basado en el gen *fad3* coincide exactamente a la localización en el mapa de uno de los loci principales de QTL para C18:3 en el grupo de ligamiento 14 (genoma C), lo que apoya la conclusión de que este QTL es el gen *fad3c* (*fad3* en el genoma C, denominado previamente *fad32*) y también se ve afectado por la segunda mutación en DMS100.

15 Para los métodos de marcadores moleculares, véase en general, *The DNA Revolution* por Andrew H. Paterson 1996 (Capítulo 2) en: *Genome Mapping in Plants* (ed. Andrew H. Paterson) por Academic Press/R.G. Landis Company, Austin, Tex., p. 7-21.

A no ser que se indique otra cosa en la presente memoria, para los propósitos de la presente invención pueden usarse métodos estándar de purificación de ADN, digestión con enzimas de restricción, análisis en gel de agarosa, aislamiento de fragmentos de ADN, ligación y transformación. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2a ed., 1989), y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Nueva York: John Wiley and Sons) (1987).

Ejemplos

Ejemplo 1: Material Vegetal

25 En este estudio se usaron las variedades de canola DMS100 (tipo mutante) y Quantum (tipo salvaje) para clonar los alelos *fad2* (ácido graso desaturasa-2) y *fad3* (ácido graso desaturasa-3). DMS100 es una línea HOLL (High Oleic and Low Linolenic) con un contenido de ácido oleico de aproximadamente 77% y un contenido de ácido linolénico de aproximadamente 3%. Se deriva de un grupo de F4 de una selección de plantas F3 única que se origina del cruce de la línea hermana Global X AG019. Quantum es una variedad comercial y contiene bajo contenido de ácido oleico (~66%) y alto de ácido linolénico (~7%). Se desarrolló una población doble haploide (DH) por cultivo de microesporas de plantas F1 del cruce entre las líneas de canola Quantum y DMS100. La población DH comprendía 604 líneas. Se implementó un análisis completo de ácidos grasos de las semillas de las líneas DH y sus parentales usando cromatografía de gas. De las 604 líneas DH, 183 se seleccionaron aleatoriamente para análisis y localización de marcadores.

Ejemplo 2: Extracción y cuantificación de ADN genómico

35 Se extrajo el ADN de ambas líneas parentales y 183 líneas DH de las hojas de plantas crecidas en invernadero de 2 semanas usando el Kit de Ensayo de Plantas DNeasy 96 de Qiagen. Los detalles de los procedimientos de la extracción de ADN se describen en el Manual del Kit de Ensayo de Plantas DNeasy™ 96. Este kit permitió extraer el ADN en un formato de 96 pocillos para una extracción de alto rendimiento.

40 Para la cuantificación del ADN, el agente de tinción PicoGreen se diluyó 200 veces en tampón 1X TE. En una placa de microtitulación, se añadieron 100 µl de la disolución diluida del agente de tinción PicoGreen en cada pocillo y después se añadieron 5 µl de cada muestra de ADN o estándares de ADN (5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml). La placa se agitó en un agitador de placas brevemente y se leyó usando el fluorímetro de microplacas Spectra Max GEMINIS XS de Molecular Devices.

Ejemplo 3: Amplificación por PCR

45 Las reacciones de amplificación por PCR contenían 20-30 ng de ADN genómico, 0,25 µM de cebador 10-mer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, tampón de PCR 1 X y 0,6 unidades de ADN polimerasa *Taq*. Las amplificaciones se realizaron en un Sistema de PCR GeneAmp 9700 programado para 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 55-60°C, 1 min a 72°C y finalizando con 7 min a 72°C.

Ejemplo 4: Clonación de los alelos *fad2* y *fad3*

50 Los fragmentos de *fad2* de las líneas parentales DMS100 y de la línea de tipo salvaje Quantum se amplificaron usando los cebadores homólogos a las secuencias del gen *fad2* de *Arabidopsis* o *B. rapa* (Tanhuanpää *et al.* 1998). Los fragmentos de *fad2* amplificados de cada uno de los parentales por los cebadores FAD2-2F y FAD2-6R se clonaron y secuenciaron. Los cebadores FAD2-2F y FAD2-6R corresponden a los cebadores 2 y 6 de Tanhuanpää *et al.* (1998), respectivamente. Las secuencias de estos dos cebadores son:

FAD2-2F: CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACC

FAD2-6R: CCTTTCTTGTCACCTTCCCTGTCC

- Las secuencias de ADN de los loci *fad31* y *fad32* para C18:3 de *B. napus* se buscaron y recuperaron en GenBank. Los números de registro de GenBank para *fad31* y *fad32* son AF056569 y AF066570, respectivamente. Se diseñaron tres pares de cebadores para cada locus *fad31* y *fad32* a partir de las secuencias de los genes *fad31* y *fad32* usando software de diseño de cebadores Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Los fragmentos de *fad31* amplificados por los cebadores BNFD31-CF y BNFD31-CR y los fragmentos de *fad32* amplificados por los cebadores BNFD32-CF y BNFD32-CR de cada uno de los parentales se clonaron y secuenciaron.
- Los productos de la amplificación por PCR de interés se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa, y las bandas de interés se cortaron del gel. Las bandas cortadas se pusieron en un tubo de microfuga que contenía agua esterilizada y se calentaron durante 5 min en agua hirviendo. El ADN disuelto se amplificó por PCR con los pares de cebadores correspondientes. Los productos amplificados se ligaron al vector de clonación PCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TA (Invitrogen Corp., San Diego, Calif) según las instrucciones del fabricante. Los productos ligados se transformaron en células competentes y se plaquearon en placas de agar LB que contenían ampicilina o kanamicina, X-GAL e IPTG para permitir la selección blanco/azul. Las colonias blancas en las placas de transformación se cogieron y se verificó la identificación de los productos de PCR clonados por una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, lo que reveló el fragmento de ADN del vector y el fragmento del inserto con el tamaño deseado. Los clones positivos que contenían el inserto se secuenciaron por Sequetech Corporation (Mountain View, Calif.).

Ejemplo 5: Ensayo invasor

- Los kits del Ensayo Invasor para mutaciones en los genes *fad2* y *fad3* se desarrollaron mediante Third Wave Technologies (Madison, Wisconsin). La concentración de las muestras de ADN para el Ensayo Invasor se normalizó a 15 ng/μl usando el Bio-Robot 3000 de Qiagen (Valencia, California). El Ensayo Invasor se realizó en placas de 96 pocillos según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de ADN se desnaturalizaron a 95°C durante 10 minutos. Se añadieron 7 μl del ADN desnaturalizado (15 ng/μl) y 8 μl de la mezcla de reacción (3 μl de mezcla de oligos y 5 μl de 24 mM de MgCl₂) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos del Ensayo Invasor. Después, cada reacción se cubrió con 15 μl de aceite mineral y las placas se incubaron en el BioOven III de St. John Associates, Inc. (Bellville, Maryland) a 63°C durante 4 horas. Las placas de reacción se leyeron usando el fluorímetro de microplacas Spectra Max GEMINIS XS de Molecular Devices para señales fluorescentes. El porcentaje de señal por encima del fondo para el alelo mutante se dividió por el porcentaje de señal para el alelo de tipo salvaje para cada muestra para calcular la proporción. Los genotipos de las muestras se determinaron tomando como base la proporción calculada.

Ejemplo 6: Análisis de las secuencias y de los datos

- Las secuencias se analizaron y alinearon usando el software de análisis de secuencia basado en internet SeqWeb (versión 2) en el paquete de software GCG (Universidad de Wisconsin). La asociación de ligamiento entre los marcadores y los rasgos de oleico alto o linolénico bajo (HO/LL) se determinó por análisis de ensayo *t*. El mapa del ligamiento genético se generó con software informático JoinMap V2.0 usando un LOD mínimo de 3.0. La distancia en el mapa se convirtió en centiMorgans usando la función de Kosambi. Las regiones QTL posibles asociadas con C18:1 y C18:3 se localizaron por mapeo de intervalo usando el software MapQTL V 3.0. Una puntuación de LOD de 3.0 se usó para identificar las regiones que afectan potencialmente los dos rasgos de ácidos grasos.

Referencias

- Arondel, V., B. Lemieux, I. Hwang, S. Gibson, H.M. Goodman y C.R. Somerville. 1992. Map-based cloning of a gene controlling Omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* 258: 1353-1355.
- Auld, D. L., M. K. Heikkinen, D. A. Erickson, J. L. Sernyk, J. E. Romero. 1992. Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. *Crop Sci.* 32, 657-662.
- Barret, P., R. Delourme, D. Brunet, C. Jourden, R. Horvais y M. Renard. 1999. Mutations in L1 and L2 genes of *Brassica napus* L. induce low linolenic acid content in the seeds. GCIRC 1999 Canberra, Australia.
- Brown, J.W.S. 1996. *Arabidopsis* intron mutations and pre-mRNA splicing. *Plant J.* 10: 771-780.
- Brunel, D., N. Froger y G. Pelletier. 1999. Development of amplified consensus genetic markers (ACGM) in *Brassica napus* from *Arabidopsis thaliana* sequences of known biological function. *Genome* 42: 387-402.
- Canvin, D.T. (1965). The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Canadian Journal of Botany*, 43, 63 - 69.
- Debonte, L.R. y W.D. Hitz. Canola oil having increased oleic acid and decreased linolenic acid content and its manufacture using transgenic plants. CODEN: USXXAM. US 5850026 A 981215. Solicitud: US 96-675650 960703. CAN 130:65607.
- Chen, J. L. y W. D. Beversdorf, 1990. A comparison of traditional and haploid-derived populations of oilseed rape (*Brassica napus* L.) for fatty acid composition of the seed oil. *Euphytica* 51: 59-65.
- Deng, X. y R. Scarth. 1998. Temperature effects on fatty acid composition during development of low linolenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75:759-766.
- J.L. Harwood, *Lipid Synthesis and Manufacture* (ed. F.D. Gunstone) Sheffield Academic Press, Sheffield (1999).
- Hu J., Quiros C., Arus P., Struss D. y Röbbelen G. 1995. Mapping of a gene determining linolenic acid concentration in rapeseed with DNA-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 258-262.
- Hu J., Li G., Struss D. y Quiros C.F. 1999. SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon fatty acids in rapeseed, *Brassica napus*. *Plant Breeding* 118: 145-150.

Jourdren C., P. Barret, D. Brunel, R. Delourme y M. Renard. 1996. Specific molecular marker of the genes controlling linolenic acid content in rapeseed. TAG 93:512-518.

Kondra, Z.P., y P.M. Thomas. 1975. Inheritance of oleic, linoleic and linolenic acids in seed oil of rapeseed (*Brassica napus*). Can. J. Plant Sci. 55:205–210.

Lorkovic, Z.J., D.A.W. Kirk, M.H.L. Lambermon y W. Fillpowicz. 2000. Pre-mRNA splicing in higher plants. Trends in Plant Science. 5: 160-167.

McCullough, A.J., H. Lou y M.A. Schuler. 1993. Factors affecting authentic 5' splice site selection in plant nuclei. Mol. Cell. Biol. 13: 1323-1331.

Nishiuchi, T., M. Nishimura, V. Arondel y K. Iba. 1994. Genomic nucleotide sequence of a gene encoding a microsomal ω -3 fatty acid desaturase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 105: 767-768.

Prakash, S. y K. Hinata, 1980 Taxonomy, cytogenetics, and origin of crop *Brassica*, a review. Opera. Bot. 55:1-59.

Rajcan I., Kasha K.J., Kott L.S. y Beversdorf W.D. 1999. Detection of molecular markers associated with linolenic and erucic acid levels in spring rapeseed (*Brassica napus*). Euphytica 105: 173–181.

Rakow, G. 1973. Selektion auf linol- und linolen-sauregehalt in rapssamen nach mutagener behand-lung. Z. Pflanzen.69:205-209.

Rücker, B.; Röbbelen, G. (1996): Impact of low linolenic acid content on seed yield of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Breeding 115 p. 226-230.

Scheffler, J.A., A.G. Sharpe, H. Schmidt, P. Sperling, I.A.P. Parkin, W. Lühs, D.J. Lydiate y E. Heinz. 1997. Dasaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. Theor Appl Genet 94:583-591.

Schierholt A., B. Rücker y H.C. Becker Ecke. 2001. Inheritance of high oleic acid mutations in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Crop Sci. 41: 1444-1449.

Schierholt A., H.C. Becker y W. Ecke. 2000. Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Theor Appl Genet 101: 897-901.

Schierholt, A. y H.C.Becker. 1999. Genetic and environmental variability of high oleic acid content in winter oilseed rape. GCIRC 1999. Canberra, Australia.

Simpson CG, McQuade C, Lyon J, Brown JWS (1998). Characterization of exon skipping mutants of the *COP1* gene from *Arabidopsis*. *Plant J* 17: 125–131.

Somers D.J., Friesen K.R.D. y Rakow G. 1998. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 96: 897–903.

Song, KM, JY Suzuki, MK Slocum, PH Williams, TC Osborn (1991) A linkage map of *Brassica rapa* (syn. *campestris*) based on restriction fragment length polymorphism loci. *Theor Appl Genet* 82:296-304.

Tanhuanpää, P. 2000. Mapping and cloning of *Fad3* gene in *Brassica rapa* subsp. *Oleifera*. GenBank direct submission. **Registro Genbank** AF308975, AF308976, AF308977 y AF308978.

Tanhuanpää P., J. Vilkki y M. Vihinen. 1998. Mapping and cloning of *FAD2* gene to develop allele-specific PCR for oleic acid in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*). *Molecular Breeding* 4: 543-550.

Tanhuanpää P.K., Vilkki J.P. y Vilkki H.J. 1995. Association of a RAPD marker with linolenic acid concentration in the seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genome* 38: 414–416.

Thompson K.F. 1983. Breeding winter oilseed rape, *Brassica napus*. *Adv. Appl. Biol* 7: 1–104.

Thormann C.E., Romero J., Mantet J. y Osborn T.C. 1996. Mapping loci controlling the concentrations of erucic and linolenic acids in seed oil of *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet* 93: [00100]282–286.

Wong, R., J.D. Patel, I. Grant, J. Parker, D. Charne, M. Elhalwagy y E. Sys. 1991. The development of high oleic canola. GCIRC 1991 Congress, Saskatoon, Canada. A16:53.

Yadav, N.S., A. Wierzbicki, M. Aegerter, C.S. Caster, L. Perez-Grau, A.J. Kinney, W.D. Hitz, J. R. Booth Jr., B. Schweiger, K.L. Stecca, S.M. Allen, M. Blackwell, R.S. Reiter, T.J. Carlson, S.H. Russell, K.A. Feldmann, J. Pierce y J. Browse. 1993. Cloning of higher plant ω -3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* 103: 467-476.

Yermanos, D.M y J. R. Goodin. 1965. Effects of temperatures during plant development on fatty acid composition of linseed oil. *Agronomy. J.* 57:453-454.

REIVINDICACIONES

1. Un marcador genético aislado y purificado asociado con contenido de aceite oleico alto en *Brassica*, localizándose dicho marcador en un grupo de ligamiento seleccionado del grupo que consiste en N5 y N1 en el genoma de *Brassica*, teniendo dicho marcador una secuencia de SEQ. ID. NO. 5.
- 5 2. Un marcador genético aislado y purificado asociado con contenido de aceite linolénico bajo en *Brassica*, localizándose dicho marcador en un grupo de ligamiento seleccionado del grupo que consiste en N14 y N4 en el genoma de *Brassica*, teniendo dicho marcador una secuencia de SEQ. ID. NO. 6.
3. El marcador genético aislado y purificado de las reivindicaciones 1 ó 2 en el que *Brassica* es canola.
- 10 4. Un método para identificar ácido nucleico como un modulador de contenido de ácido oleico alto y/o de ácido linolénico bajo en *Brassica*, comprendiendo el método:

exponer ácido nucleico de *Brassica* a un marcador molecular seleccionado del grupo que consiste en SEQ. ID. No. 5 y/o 6, en el que el marcador mostrado como SEQ ID NO: 5 está asociado con contenido de aceite oleico alto y en el que el marcador mostrado como SEQ ID NO: 6 está asociado con contenido de aceite linolénico bajo.
- 15 5. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID. No. 7 o una variante degenerada de SEQ. ID. No. 7.
6. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. No. 8.
- 20 7. Un ácido nucleico aislado de una especie de *Brassica* que comprende un gen *fad32* que tienen una mutación en la secuencia de +1G a +1A en el sitio de corte y empalme 5' correspondiente a la posición 530 del gen *fad32* de DMS100 de SEQ ID NO: 12.
8. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7 en el que la especie de *Brassica* es canola.
- 25 9. Un ácido nucleico aislado de una especie de *Brassica* que comprende un gen *fad2* que tiene una mutación en una posición correspondiente a la posición 411 del gen *fad2* de DMS100 de SEQ ID NO: 7, en el que la mutación crea un codón de parada.
10. Uso del marcador genético de las reivindicaciones 1 ó 2 para la selección de plantas con semillas oleaginosas con oleico alto y/o linolénico bajo en el que el marcador mostrado como SEQ ID NO: 5 está asociado con contenido de aceite oleico alto y en el que el marcador mostrado como SEQ ID NO: 6 está asociado con contenido de aceite linolénico bajo.

```

1 CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACCTCATCTGGGACATCATCATAGCCTCC 50
  |||
1 CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACCTCATCTGGGACATCATCATAGCCTCC 50

51 TGCTTCTACTACGTGCGCCACCACCTTACTTCCCTCTCCTCCCTCACCTCT 100
  |||
51 TGCTTCTACTACGTGCGCCACCACCTTACTTCCCTCTCCTCCCTCACCTCT 100

101 CTCCTACTTTCGCCTGGCCTCTCTACTGGGCTGCCAGGGCTGCGTCCTAA 150
  |||
101 CTCCTACTTTCGCCTGGCCTCTCTACTGGGCTGCCAGGGCTGCGTCCTAA 150

151 CCGGCGTCTGGGTCATAGCCACGAGTGGGGCCACCACGCCCTTCAGCGAC 200
  |||
151 CCGGCGTCTGGGTCATAGCCACGAGTGGGGCCACCACGCCCTTCAGCGAC 200

201 TACCAGTGGCTGGACGACACCGTCGGCCTCATCTTCCACTCCTTCTCCT 250
  |||
201 TACCAGTGGCTGGACGACACCGTCGGCCTCATCTTCCACTCCTTCTCCT 250

251 CGTCCCTTACTTCTCCTGGAAGTACAGTCATCGACGCCACCATTCCAACA 300
  |||
251 CGTCCCTTACTTCTCCTGGAAGTACAGTCATCGACGCCACCATTCCAACA 300

301 CTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTTTGTCCCAAGAAGAAGTCAGAC 350
  |||
301 CTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTTTGTCCCAAGAAGAAGTCAGAC 350

351 ATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAACAACCCTTTGGGACCGCACCGTGAT 400
  |||
351 ATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAACAACCCTTTGGGACCGCACCGTGAT 400
                                     Cebador
401 GTTAAACGGTTCAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTTGTACTTAGCCTTCAACG 450
  |||
401 GTTAAACGGTTCAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTTGTACTTAGCCTTCAACG 450
  directo ▼
451 TCTCGGGGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTTCCACCCCAAC 500
  |||
451 TCTCGGGGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTTCCACCCCAAC 500

501 GCTCCCATCTACAACGACCGTGAGCGTCTCCAGATATACATCTCCGACGC 550
  |||
501 GCTCCCATCTACAACGACCGTGAGCGTCTCCAGATATACATCTCCGACGC 550

551 TGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTCTCTACCGCTACGCTGCTGTCCAAG 600
  |||
551 TGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTCTCTACCGCTACGCTGCTGTCCAAG 600

```

---- Continúa

Fig. 1

Fig 1 cont.

```

601 GAGTTGCCTCGATGGTCTGCTTCTACGGAGTTCCTCTTCTGATTGTCAAC 650
    |||
601 GAGTTGCCTCGATGGTCTGCTTCTACGGAGTTCCTCTTCTGATTGTCAAC 650

651 GGGTTCTTAGTTTTGATCACTTACTTGCAGCACACGCATCCTTCCCTGCC 700
    |||
651 GGGTTCTTAGTTTTGATCACTTACTTGCAGCACACGCATCCTTCCCTGCC 700

701 TCACTATGACTCGTCTGAGTGGGATTGGTTGAGGGGAGCTTTGGCCACCG 750
    |||
701 TCACTATGACTCGTCTGAGTGGGATTGGTTGAGGGGAGCTTTGGCCACCG 750

751 TTGACAGAGACTACGGAATCTTGAACAAGGTCTTCCACAATATCACGGAC 800
    |||
751 TTGACAGAGACTACGGAATCTTGAACAAGGTCTTCCACAATATCACGGAC 800
    Cebador inverso
801 ACGCACGTGGCGCATCACCTGTTCTCGACCATGCCGCATTATCATGCGAT 850
    |||
801 ACGCACGTGGCGCATCACCTGTTCTCGACCATGCCGCATTATCATGCGAT 850

851 GGAAGCTACGAAGGCGATAAAGCCGATACTGGGAGAGTATTATCAGTTCCG 900
    |||
851 GGAAGCTACGAAGGCGATAAAGCCGATACTGGGAGAGTATTATCAGTTCCG 900

901 ATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAGGCGAAGGAGTGTATC 950
    |||
901 ATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAGGCGAAGGAGTGTATC 950

951 TATGTGGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAAAGG 985
    |||
951 TATGTGGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAAAGG 985
    
```

Figura 1. Secuencias de nucleótidos genómicas del gen *fad2* clonado a partir de DMS100 y Quantum. La parte superior es la secuencia de DMS100 y la parte inferior es la secuencia de Quantum. La punta de flecha indica una mutación de un único nucleótido de C a T, que resultó en un codón de parada (TAG) sombreado en amarillo. Los cebadores directos e inversos para el marcador específico de alelo mutante basado en PCR están en negrita y subrayados.

	1					50
DMS100	-----	-----	-----	-----	-----	-----IP
Quantum	-----	-----	-----	-----	-----	-----IP
Bnfad2	MGAGGRMQVS	PPSKKSETDT	IKRVP CETPP	FTVGELKKAI	PPHCFKRSIP	
	51					100
DMS100	RSFSYLIWDI	IIASCFYYVA	TTYFPLLPHP	LSYFAWPLYW	ACQGCVLTVG	
Quantum	RSFSYLIWDI	IIASCFYYVA	TTYFPLLPHP	LSYFAWPLYW	ACQGCVLTVG	
Bnfad2	RSFSYLIWDI	IIASCFYYVA	TTYFPLLPHP	LSYFAWPLYW	ACQGCVLTVG	
	101					150
DMS100	WVIAHECGHH	AFSDYQWLDD	TVGLIFHSFL	LVPYFSWKYS	HRRHHSNTGS	
Quantum	WVIAHECGHH	AFSDYQWLDD	TVGLIFHSFL	LVPYFSWKYS	HRRHHSNTGS	
Bnfad2	WVIAHECGHH	AFSDYQWLDD	TVGLIFHSFL	LVPYFSWKYS	HRRHHSNTGS	
	151					200
DMS100	LERDEVFVPK	KKSDIKWYGK	YLNPLGRTV	MLTV [▼] FTLGW	PLYLAFNVSG	
Quantum	LERDEVFVPK	KKSDIKWYGK	YLNPLGRTV	MLTVQFTLGW	PLYLAFNVSG	
Bnfad2	LERDEVFVPK	KKSDIKWYGK	YLNPLGRTV	MLTVQFTLGW	PLYLAFNVSG	
	201					250
DMS100	RPYDGGFACH	FHPNAPIYND	RERLQIYISD	AGILAVCYGL	YRYAAVQGVA	
Quantum	RPYDGGFACH	FHPNAPIYND	RERLQIYISD	AGILAVCYGL	YRYAAVQGVA	
Bnfad2	RPYDGGFACH	FHPNAPIYND	RERLQIYISD	AGILAVCYGL	FRYAAAQGVA	
	251					300
DMS100	SMVCFYGVPL	LIVNGFLVLI	TYLQHTHPSL	PHYDSSEWDW	LRGALATVDR	
Quantum	SMVCFYGVPL	LIVNGFLVLI	TYLQHTHPSL	PHYDSSEWDW	LRGALATVDR	
Bnfad2	SMVCFYGVPL	LIVNGLLVLI	TYLQHTHPSL	PHYDSSEWDW	LRGALATVDR	
	301					350
DMS100	DYGILNKVFH	NITDTHVAHH	LFSTMPHYHA	MEATKAIKPI	LGEYYQFDGT	
Quantum	DYGILNKVFH	NITDTHVAHH	LFSTMPHYHA	MEATKAIKPI	LGEYYQFDGT	
Bnfad2	DYGILNKVFH	NITDTHVAHH	LFSTMPHYHA	MEATKAIKPI	LGEYYQFDGT	
	351					384
DMS100	PVVKAMWREA	KECIYVEPDR	EGDKK-----	-----		
Quantum	PVVKAMWREA	KECIYVEPDR	EGDKK-----	-----		
Bnfad2	PVVKAMWREA	KECIYVEPDR	QGEKKG VFWY	NNKL		

Figura 2. Secuencias de aminoácidos del gen *fad2*, clonado a partir de DMS100, Quantum y del gen *fad2* publicado de *Brassica napus* (BNfad2). La punta de flecha indica la posición del codón de parada que resulta de una mutación en un único nucleótido (C a T) en DMS100.

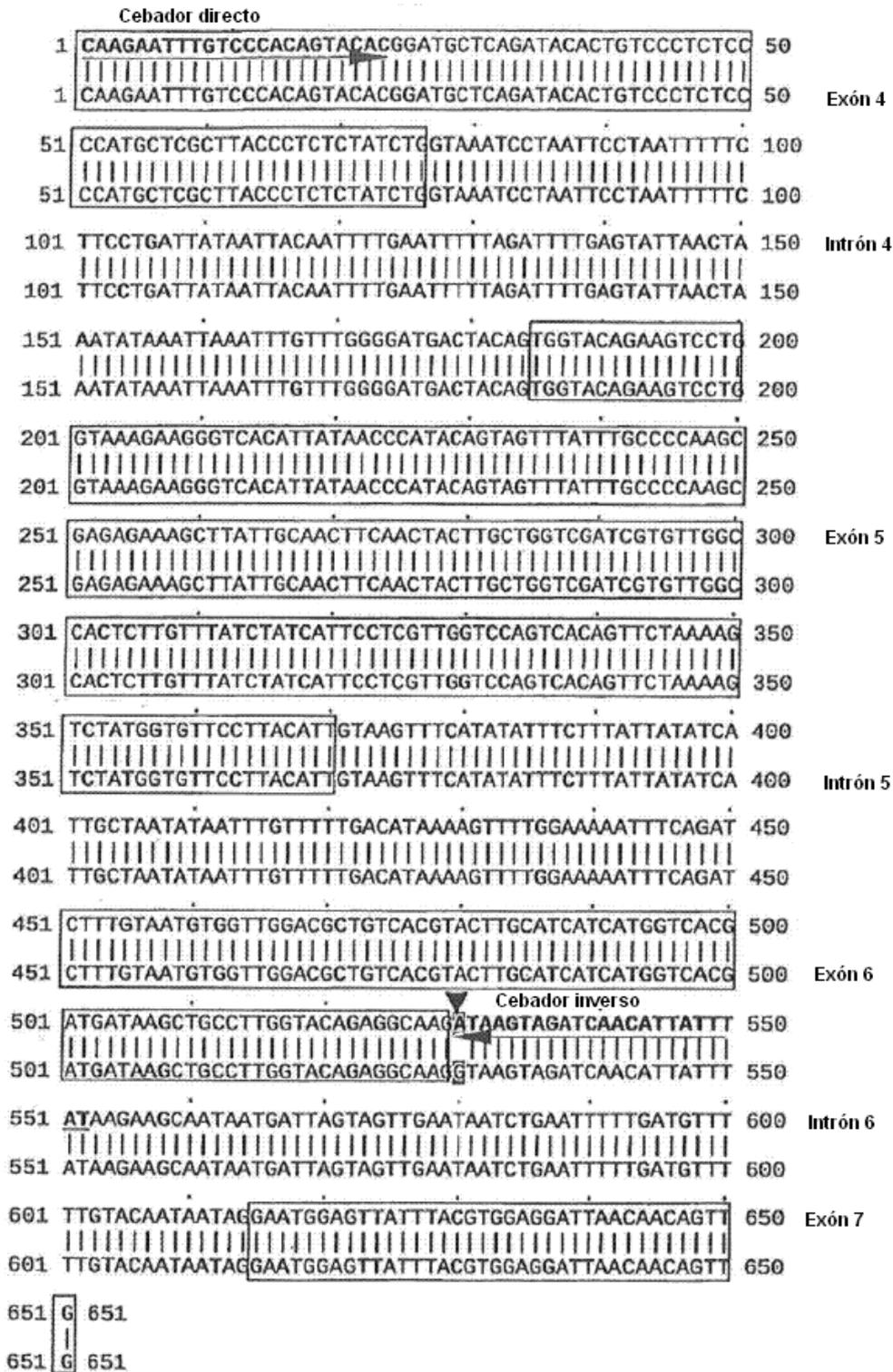


Figura 3. Secuencias de nucleótidos genómicas del gen *fad3c* clonado a partir de DMS100 y Quantum. La parte superior es la secuencia de DMS100 y la parte inferior es la secuencia de Quantum. Los exones están recuadrados, los intrones no están recuadrados, que corresponden a los exones 4, 5, 6 y 7 y a los intrones 4, 5 y 6 del gen *fad2* en *Brassica rapa* y *Arabidopsis*. La punta de flecha indica una mutación en único nucleótido de G a A. Los cebadores directos e inversos para el marcador específico de alelo mutante basado en PCR están en negrita y subrayados

Fig. 4

Tabla 1. La correlación de los marcadores específicos de alelo mutante y el contenido de ácidos grasos de 184 líneas DH derivadas del cruce de Quantum y DMS100

Marcador	Rasgo	No. de líneas ensayadas		Contenido medio de ácidos grasos		valor <i>t</i>
		Con marcador	Sin marcador	Con marcador	Sin marcador	
FAD2GM	C18:1	85	98	75,67	64,23	15,49**
FAD3cGM	C18:3	74	99	2,81	5,42	13,13**

** significativo a $t = 0,01$.



Figura 4. Productos de PCR amplificados a partir del marcador específico de alelo mutante para el gen *fad2*. M, escalera de ADN de 100 pb; Carril 1, DMS100; carril 2, Quantum; carriles 3-27, líneas DH del cruce de Quantum y DMS100. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Fig. 5

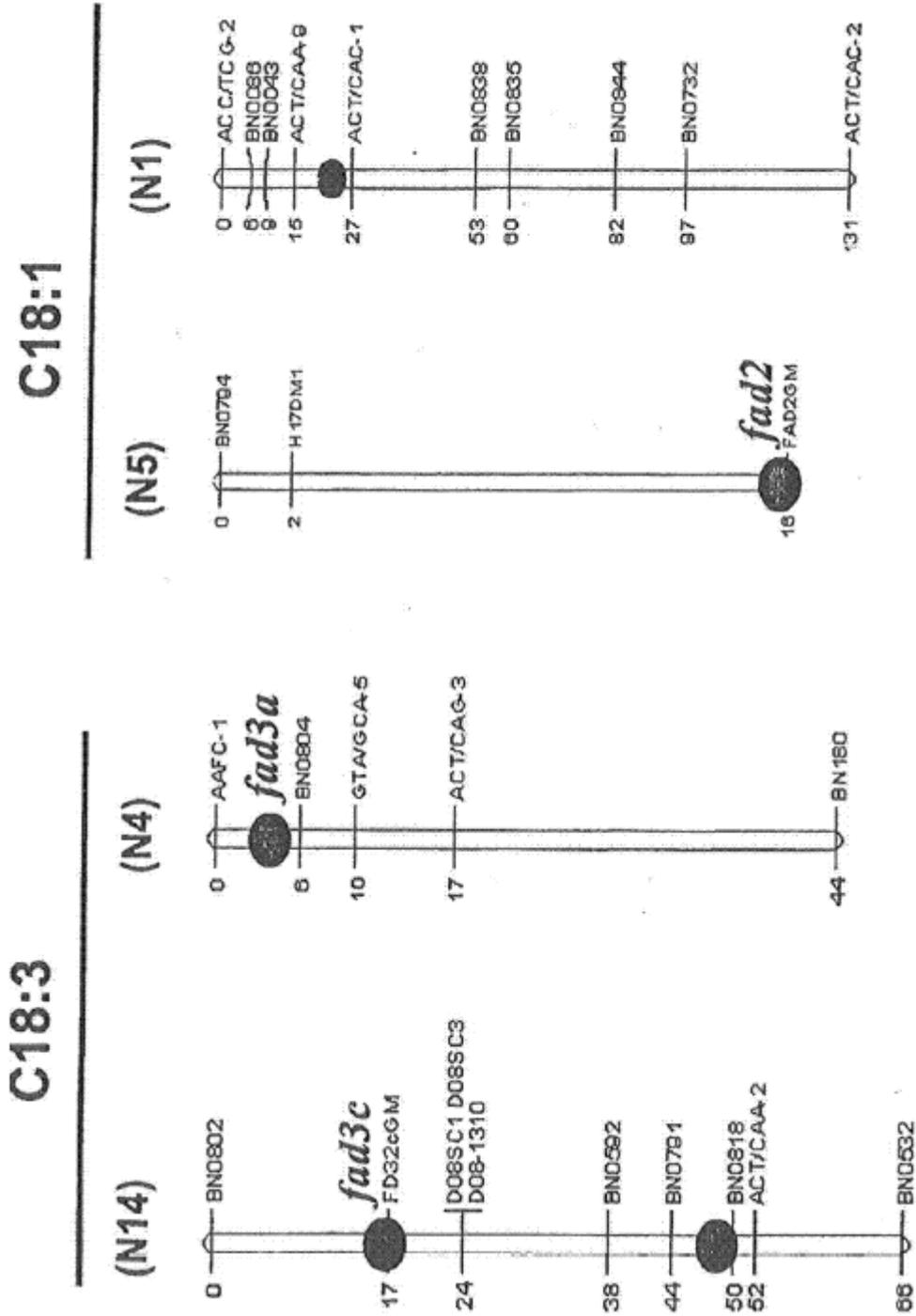


Figura 5. Localizaciones en el mapa de los loci QTL para C18:1 alto y C18:3 bajo. Se muestra la distancia en el mapa en cM en el lado de la izquierda y el nombre de los marcadores en el lado de la derecha de cada grupo de ligamiento.