

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 425**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2008 E 08854261 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2220239**

54 Título: **Planta de Brassica que comprende un alelo INDEHISCENT mutante**

30 Prioridad:

28.11.2007 EP 07023052

29.11.2007 US 4660 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.08.2015

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)

J.E. Mommaertslaan 14

1831 Diegem, BE

72 Inventor/es:

LAGA, BENJAMIN;

DEN BOER, BART y

LAMBERT, BART

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 543 425 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

Planta de Brassica que comprende un alelo INDEHISCENT mutante

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere al campo de productos agrícolas, especialmente plantas de cultivo, particularmente de la familia *Brassicaceae*, en particular la especie de *Brassica*, de las cuales se modulan las propiedades de dehiscencia del fruto. Más específicamente, la invención se refiere a métodos y medios mejorados para reducir el desgranado de la semilla, o retrasar el desgranado de la semilla hasta después de la cosecha, en plantas tales como plantas *Brassicaceae*, particularmente plantas *Brassicaceae* que se hacen crecer para la producción de semillas, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. Se describen moléculas de ácidos nucleicos tanto de tipo salvaje como mutantes que codifican proteínas INDEHISCENT (IND) de *Brassica*, y las proteínas como tales. También se proporcionan plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas de *Brassica napus*, y células, partes, semillas y progenie de las mismas, caracterizadas por que comprenden tres alelos *ind* mutantes completamente genosuprimidos en su genoma, promedio de lo cual se alteran significativamente las propiedades de dehiscencia del fruto. Además, se describen 10 aquí métodos para generar plantas de *Brassica* en las que se reduce el desgranado de semillas, o en el que se retrasa el desgranado de semillas hasta después de la cosecha, mientras que se mantiene preferiblemente una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas, como también se describen vainas de semillas y semillas obtenibles a partir de tales plantas. Se proporcionan además métodos para detectar la presencia de uno o más alelos *ind* mutantes y/o alelos *IND* de tipo salvaje en plantas según la invención. También se describen métodos para transferir uno o más alelos *ind* mutantes y/o alelos *IND* de tipo salvaje a otras plantas, y métodos para combinar diferentes alelos *ind* y/o *IND* en plantas. En particular, métodos para combinar un número adecuado de alelos *ind* mutantes, que codifican proteínas no funcionales o no *IND* y/o proteínas *IND* que tienen actividad significativamente reducida *in vivo*, de tal manera que se reduzca significativamente el desgranado de las semillas, o retrase el desgranado de las semillas hasta después de la cosecha, a la vez que mantienen al mismo tiempo una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. Además de los usos de las plantas, o sus partes, y/o su progenie, se describen semillas y aceites de semilla, y los métodos y/o kits de la invención. También se describen métodos y medios para incrementar la productividad, particularmente la productividad de granos y semillas. El fenotipo de incremento de la productividad se puede separar del fenotipo de desgranado reducido o retrasado de semillas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

30 Las silicuas o vainas de plantas de *Brassica* liberan sus semillas a través de un proceso denominado dehiscencia del fruto. Una silicua consiste en dos carpelos unidos margen con margen. La sutura entre los márgenes forma un nervio grueso, denominado replum. A medida que se acerca la madurez en las vainas, las dos valvas se separan progresivamente del replum, a lo largo de líneas designadas de debilidad en la vaina, dando eventualmente como resultado el desgranado de las semillas que estaban unidas al replum. La zona de dehiscencia define la localización exacta de la disociación de las valvas.

El desprendimiento de la semilla (también denominado como “desgranado de la semilla” o “desgranado de la vaina”) por vainas maduras antes o durante la cosecha del cultivo es un fenómeno universal con cosechas que desarrollan frutos dehiscentes secos. El desgranado prematuro de semillas da como resultado una recuperación reducida de semillas, lo que representa un problema en cultivos que se hacen crecer principalmente para las semillas, tales como plantas de *Brassica* productoras de aceite, particularmente colza. Otro problema relacionado con el desgranado prematuro de las semillas es un incremento en el crecimiento voluntario en el año subsiguiente de cultivo. En colza, las pérdidas de productividad relacionadas con el desgranado de las vainas son de media 20% (Child et al., 1998, J Exp Bot 49: 829-838), pero pueden alcanzar hasta 50%, dependiendo de las condiciones meteorológicas (MacLeod, 1981, Harvesting in Oilseed Rape, p. 107-120 Cambridge Agricultural Publishing, Cambridge).

Las variedades comerciales actuales de colza son extremadamente susceptibles al desgranado. Hay poca variación para la resistencia al desgranado dentro de los programas de cultivo de *B. napus* existentes, pero se han encontrado líneas resistentes dentro de los progenitores diploides de *B. napus* (*B. oleracea* y *B. rapa*) así como dentro de otros miembros del género de *Brassica*, principalmente *B. juncea*, *B. carinata* y *B. nigra*. Kadkol et al. (1986, Aust. J. Botany 34 (5): 595-601) dan a conocer una mayor resistencia frente al desgranado en ciertos registros de *B. campestris* que estaba asociada con la ausencia de una capa de separación en la región de unión de valvas de silicua al replum. Prakash y Chopra (1988, Plant breeding 101: 167-168) describen la introgresión de la resistencia al desgranado en *Brassica napus* desde *Brassica juncea* mediante recombinación no homóloga. Spence et al. (1996, J of Microscopy 181: 195-203) describen que algunas líneas de *Brassica juncea* muestran una tendencia reducida a desgranarse en comparación con líneas de *Brassica napus*. Morgan et al., 1998 (Fields Crop Research 58, 153-165) describen variación genética para la resistencia al desgranado de vainas entre líneas de colza desarrolladas a partir de *B. napus* sintético, y concluyen que las líneas que requirieron mucha energía para abrir sus vainas parecieron tener una mayor vascularización en la zona de dehiscencia y una degradación reducida de la pared celular en la zona de dehiscencia. Encontraron además una correlación negativa significativa entre la longitud del pico de las vainas y la fuerza necesaria para provocar el desgranado de las vainas. Child y Huttly (1999, Proc 10th Int.

Rapeseed Congress) describen la variación en la maduración de vainas en *B. napus* mutante inducida por irradiación y una población de sus variedades de cultivo progenitoras, Jet Neuf, en la que las plantas de tipo salvaje y mutantes más resistentes mostraron una gran lignificación de grupos de células a lo largo de la zona de dehiscencia, y en la que se describieron trazas vasculares situadas próximas al borde interno de la zona de dehiscencia en el mutante, para ayudar a asegurar las valvas. Child et al. (2003, J Exp Botany 54 (389): 1919-1930) describen además la asociación entre una mayor resistencia al desgranado de las vainas y cambios en la estructura vascular en vainas de una línea de *Brassica napus* resintetizada. Sin embargo, los métodos tradicionales para el cultivo no han tenido éxito a la hora de introducir resistencia al desgranado en variedades de cultivo de colza, sin interferir con otros rasgos deseables tales como floración temprana, maduración y resistencia al pie negro (Prakash y Chopra, 1990, Genetical Research 56: 1-2).

Se han identificados varios genes, que promueven o inhiben la dehiscencia de las vainas, en *Arabidopsis thaliana* a través del análisis de mutantes: mutantes combinados tanto en *SHATTERPROOF1* (*SHP1*; inicialmente denominado como *AGL1*) como en *SHATTERPROOF2* (*SHP2*; inicialmente denominado como *AGL5*) dan como resultado silicuas indehiscentes (es decir, silicuas que permanecen cerradas con la maduración en *Arabidopsis thaliana*) (Liljegren et al., 2000, Nature 404, 766-770). De forma similar, mutantes en el gen *INDEHISCENT* (denominado *IND1*) en *Arabidopsis thaliana* (Liljegren et al., 2004, Cell 116: 843-853; publicación PCT WO 01/79517), así como en *ALCATRAZ* (denominado como *ALC*; Rajani et al. 2001, Current Biology 11, 1914-1922) interfirieron con la dehiscencia de las vainas, conduciendo a resistencia al desgranado de las vainas. La expresión constitutiva de *FRUITFUL* (*FUL*), un represor de *SHP* e *IND*, en *Arabidopsis thaliana*, también dio como resultado silicuas indehiscentes (Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436-438). Se cree que estos factores de transcripción forman una red transcripcional no lineal que controla la identidad del margen de la valva y el desgranado de las vainas. Liljegren et al. (2004, Cell 116: 843-853) describen además que *IND*, un gen de hélice-bucle-hélice básica (bHLH) atípico, dirige la diferenciación del margen de la valva en las capas de separación y lignificadas en *Arabidopsis thaliana*. La capa de células lignificadas adyacente a la capa de separación junto con la capa *b* del endocarpio (una única capa de células lignificadas en cada valva) producen una tensión semejante a un muelle en el fruto que se está secando, que contribuye a su apertura. La lignificación de la capa *b* del endocarpio de la valva requiere las actividades de *IND*, *SHP*, *ALC*, y *FUL*, y un factor de transcripción de dominio MAD5 que se expresa a lo largo de las valvas (Liljegren et al., 2004, más arriba; Mandel y Yanofsky, 1995, Plant Cell 7, 1763-1771). Se ha encontrado que *FUL* y *REPLUMLESS* (*RPL*), un factor de transcripción de homeodominio que se expresa en el replum (Roeder et al., 2003, Curr Biol 13, 1630-1635), establecen los límites de los genes que confieren identidad del margen de la valva (Gu et al., 1998, Development 125, 1509-1517; Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436-438; Roeder et al., 2003, más arriba). Finalmente, se identificó que *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*) y *YABBY3* (*YAB3*), dos factores de transcripción de la familia *YABBY* (Sawa et al., 1999, Genes Dev 13, 1079-1088; Siegfried et al., 1999, Development 126, 4117-4128), y *JAGGED* (*JAG*), un factor de transcripción con dedos de cinc C2H2 (Dinneny et al., 2004, Development 131, 1101-1110; Ohno et al., 2004, Development 131, 1111-1122), contribuyen redundantemente al desarrollo apropiado de la valva y del margen de la valva al promover la expresión de *FUL* y *SHP* de una manera específica de la región (Dinneny et al., 2005, Development 132, 4687-4696). También se han identificado (véase, por ejemplo, documento WO 97/13865; Petersen et al., Plant. Mol. Biol., 1996, 31:517-527) genes para un número de enzimas hidrolíticas, tales como endopoligalacturonasas, que desempeñan un papel, durante la dehiscencia de las vainas, en la ruptura programada de la zona de dehiscencia en vainas de plantas de *Brassica*.

Liljegren et al. (2004, Cell 116: 843-853) describen cinco alelos mutantes de *IND* de *Arabidopsis*. Las células lignificadas en la zona de dehiscencia están ausentes o presentes en plantas que comprenden estos alelos mutantes, dependiendo de la severidad de las mutaciones (mutantes *ind* severos no contienen células lignificadas en la región que corresponde a la parte interna del margen de la valva en plantas de tipo salvaje), pero en todos los casos la silicua es indehiscente. Wu et al. (2006), Planta 224, 971-979) describen un sexto alelo mutante de *IND* de *Arabidopsis*. Las plantas que comprenden este alelo mutante no muestran células lignificadas en las uniones del margen de la valva y el replum, contienen menos células en una región de siete capas de células, que parece que engloba la zona de dehiscencia habitualmente conocida y el borde del replum en plantas salvajes, y muestran citocinesis incompleta en esta capa.

Los documentos US 2005/0120417 y US 2007/0006336 describen la identificación y aislamiento de dos ortólogos de *IND1* de *Brassica napus*.

Los documentos WO99/00503, WO01/79517 y WO0159122 describen la disminución de la expresión de los genes *ALC*, *IND*, *AGL1* y *AGL5* de *Arabidopsis*, y sus ortólogos, usando técnicas de silenciamiento génico (tales como supresión o cosupresión antisentido) y mutagénesis.

Vancanneyt et al., 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, España 28 de junio-2 de julio; 2002) dieron a conocer que la expresión de *FUL* de *A. thaliana* bajo el control de un promotor de CaMV 35S en colza dio como resultado un número de transformantes resistentes al desgranado de las vainas. Las vainas de tales líneas resistentes al desgranado de las vainas no tuvieron zona de dehiscencia, y la apertura de las vainas solamente se pudo lograr mediante fractura al azar de las valvas aplicando una presión considerable.

Vancanneyt et al., 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, España 28 de junio-2 de julio; 2002) también dieron a conocer que el silenciamiento del gen *IND* en *Arabidopsis thaliana* usando las

denominadas técnicas de silenciamiento de ARNbc dio como resultado una resistencia casi completa al desgranado de las vainas. El noventa y ocho por ciento de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* desarrolló silicuas, que no se abrieron a lo largo de la sutura de la valva, y solo se pudieron abrir aplicando una presión considerable a las valvas.

5 Es importante observar que aunque el desgranado de las semillas constituye un problema importante en el cultivo de colza, que se puede resolver desarrollando líneas resistentes al desgranado de las vainas, finalmente la separación de las semillas de las vainas es todavía necesaria. En la práctica agrícola normal esto se logra trillando las vainas mediante una cosechadora combinada. El trillado de las vainas mediante una cosechadora combinada debe de ser total y debe de provocar un daño mínimo a las semillas así liberadas. Sin embargo, a medida que aumenta la fortaleza de las vainas, una acción más severa requerida para trillarlas provoca un nivel inaceptable de daño a la semilla. Las vainas de plantas *Brassicaceae* resistentes al desgranado de las vainas no deberían de ser así tan fuertes de manera que no puedan ser trilladas en una cosechadora combinada (Bruce et al. 2001, J. Agric. Engng Res. 80, 343-350).

10 El documento WO 2004/113542 describe que el silenciamiento génico de ARNbc moderado de genes implicados en el desarrollo de la zona de dehiscencia y márgenes de la valva de vainas en plantas *Brassicaceae* permite el aislamiento de líneas transgénicas con una mayor resistencia al desgranado de las vainas y un menor desgranado de las semillas, vainas las cuales, sin embargo, todavía se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas.

15 A pesar del hecho de que las secuencias de genes *IND* específicos y sus secuencias mutantes, particularmente secuencias de genes *IND* de *Arabidopsis* y de *Brassica napus* y secuencias de genes *IND* de *Arabidopsis* mutantes, están disponibles en la técnica, sigue existiendo la necesidad de secuencias de genes *IND* adicionales, por ejemplo, para permitir una modificación específicamente deseada del desgranado de semillas en plantas, tales como plantas de *Brassica napus*. El aislamiento de alelos mutantes que corresponden a *ind* en plantas *Brassicaceae* económicamente importantes, tales como colza, es una tarea laboriosa y que consume tiempo. Además, tal aislamiento se puede complicar por la anfidiploidía en colza y la redundancia funcional consiguiente de los genes correspondientes.

20 Estos y otros objetos se logran mediante la presente invención, como se indica mediante las diversas realizaciones descritas en el sumario de la invención, figuras, descripción detallada, ejemplos y reivindicaciones.

COMPENDIO DE LA INVENCION

25 Los inventores han descubierto que las propiedades de dehiscencia del fruto en plantas de *Brassica* se pueden controlar controlando el número de genes/alelos *IND* que son "expresados funcionalmente" en vainas de semillas, es decir, que dan como resultado proteína IND funcional (biológicamente activa). Combinando un número de alelos *IND* mutantes completamente genosuprimidos ("alelos *ind*"), a la vez que se mantiene un número mínimo de alelos *IND* de tipo salvaje, que da como resultado un nivel mínimo de proteína IND funcional, se pueden modificar las propiedades de dehiscencia de las vainas de semillas, más específicamente, se puede incrementar la resistencia al desgranado de las vainas y se puede reducir el desgranado de las semillas, o se puede retrasar el desgranado de las semillas hasta después de la cosecha, a la vez que se mantiene al mismo tiempo una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas, de manera que las vainas todavía se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas. Se piensa que es necesario un número mínimo de alelos *IND* de tipo salvaje para permitir todavía la separación de las semillas a partir de las vainas, en particular mediante la trilla de las vainas por una cosechadora combinada, de manera que la trilla de las vainas es completa y provoca un daño mínimo a las semillas así liberadas.

30 De este modo, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta de *Brassica napus* (y sus partes, tales como vainas de semillas y semillas), caracterizada por que comprende al menos dos alelos *IND* mutantes en un locus en su genoma. Dicha planta puede ser una planta que comprende tres alelos *IND* mutantes completamente genosuprimidos en su genoma, en particular de un gen *IND-A1* y/o un gen *IND-C1*, y en la que la resistencia de la planta al desgranado de las vainas está significativamente incrementada en comparación con la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que no comprende alelos *IND* mutantes, pero en la que la planta mantiene preferiblemente una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas.

35 También se describen secuencias de ácidos nucleicos (aisladas) que codifican proteínas IND de tipo salvaje y/o mutantes, así como sus fragmentos, y métodos para usar estas secuencias de ácidos nucleicos para modificar las propiedades de dehiscencia del fruto de las plantas. También se describen las propias proteínas y su uso.

40 La invención describe además una planta, y células, partes, semillas y progenie de la misma, que comprenden al menos un alelo *IND* mutante completamente genosuprimido, y de este modo una cantidad reducida de proteína IND funcional, en comparación con una planta, y células, partes, semillas y progenie de la misma, que comprenden un alelo *IND* que codifica la proteína IND funcional correspondiente. Tales plantas, y células, partes, semillas y progenie de las mismas, se pueden usar para obtener plantas con propiedades de dehiscencia del fruto modificadas, en particular para obtener plantas de *Brassica* con desgranado de semillas significativamente reducido que mantienen

una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. Como se usa aquí, “parte de la planta” incluye aquello derivado de una planta de la invención, incluyendo partes de la planta tales como células, tejidos, órganos, semillas, vainas de semillas, harina de semillas, torta de semillas, grasas o aceites de semilla.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a vainas de semillas con resistencia al desgranado modificada, que se pueden obtener a partir de una planta según la presente invención. Dichas vainas de semillas se pueden usar, por ejemplo, para sembrar y hacer crecer la progenie de las plantas.

10 Se describen métodos para generar y seleccionar plantas, y células, partes, semillas y progenie de las mismas, que contienen al menos un alelo *ind* completamente genosuprimido. En particular, se describen métodos para generar y seleccionar plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en particular plantas de *Brassica napus*, y células, partes, semillas y progenie de las mismas, que contienen al menos un alelo *ind* mutante completamente genosuprimido presente en al menos uno de los al menos dos loci *IND* diferentes en el genoma, por ejemplo, en al menos uno de los dos loci diferentes del gen *IND-A1* e *IND-C1* de *Brassica*, y para distinguir entre la presencia de alelos *ind* mutantes y alelos *IND* de tipo salvaje en una planta o parte de la planta. De este modo, se describen métodos (tales como selección asistida por mutagénesis y/o marcadores) para generar y/o identificar alelos *ind* o plantas o partes de la planta que comprenden tales alelos, y para combinar un número adecuado de alelos *ind* y/o diferentes tipos de alelos *ind* en una sola planta, con lo que se modifican significativamente las propiedades de dehiscencia del fruto de esta planta.

20 Los alelos *IND* mutantes, como se describen aquí, se pueden usar para incrementar la productividad de la semilla o grano cosechado de plantas de *Brassica*. La mayor productividad puede ser una consecuencia de reducir o retrasar el desgranado de las semillas, pero también puede ser independiente del desgranado reducido o retrasado de las semillas. En particular, se proporcionan plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, o una célula, parte, semilla o progenie de las mismas, caracterizadas por que estas plantas comprenden dos alelos *IND* homocigóticos mutantes como se describe aquí en su genoma.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

25 Figura 1 – Representación esquemática del gen *IND-A1*, que codifica una proteína *IND-A1* de tipo salvaje de *Brassica napus* (SEC ID NO: 5).

Figura 2 – Representación esquemática del gen *IND-C1*, que codifica una proteína *IND-C1* de tipo salvaje de *Brassica napus* (SEC ID NO: 7).

30 En la Figura 1 y 2, la posición de las mutaciones descritas en los Ejemplos (denominadas “EMSxx” según su nombre respectivo “*ind-x1-EMSxx*” como se describe en los Ejemplos) se indica con líneas verticales; la longitud y posición de las sondas específicas de *IND* (denominadas “ID xx” según su SEC ID NO: xx respectiva) se indican mediante líneas horizontales debajo de la representación esquemática de los genes *IND*; la posición de los cebadores específicos de *IND* (denominados “ID xx” según su SEC ID NO: xx respectiva) se indica mediante puntas de flecha.

DEFINICIONES GENERALES

35 “Incremento de la resistencia al desgranado de las vainas” y “reducción del desgranado de las semillas”, como se usan aquí, se refieren a una menor tendencia al desgranado de las semillas y/o un retraso en el momento del desgranado de las semillas, en particular hasta después de la cosecha, de plantas de *Brassica*, cuyos frutos normalmente no maduran de forma simultánea, sino secuencialmente, de manera que algunas vainas se abren y desgranaran sus semillas antes o durante la cosecha. El nivel de resistencia al desgranado de las vainas se correlaciona positivamente y se puede medir, por ejemplo, determinando la fuerza necesaria para romper las vainas en el “ensayo de separación por tracción” (Davies y Bruce, 1997, J Mat Sci 32: 5895-5899; Morgan et al., 1998, Fields Crop Research 58, 153-165), el número de vainas intactas que quedan después de por ejemplo 20 segundos (“IP20”; Morgan et al., 1998, más arriba), 9,7 o 17 segundos (Bruce et al., 2002, Biosystems Eng 81(2): 179-184) en un “ensayo de impactos aleatorios”, la semivida de la muestra de vainas (“LD50”) en un ensayo de impactos aleatorios, es decir, el tiempo de tratamiento que es necesario para provocar la apertura del 50% de las vainas en muestras de vainas ensayadas, y la “puntuación de campo para el desgranado” (Morgan et al., 1998, más arriba). Los ensayos de impactos aleatorios (RITs) y los algoritmos para definir las semividas de muestras de vainas en tales RITs han sido descritos por Bruce et al., 2002 (más arriba), Morgan et al., 1998 (más arriba) y en los Ejemplos más abajo. De forma breve, una muestra de vainas maduras intactas se coloca en un tambor cerrado junto con bolas de acero, y el tambor se agita vigorosamente entonces durante períodos crecientes de tiempo (por ejemplo 10 s, 20 s, 40 s, 80 s). Después de cada período, el tambor se abre y se cuenta el número de vainas rotas y dañadas. La estimación más exacta del nivel de resistencia al desgranado para cada línea se calcula ajustando una curva lineal x lineal a todos los datos disponibles y estimando el tiempo que tarda la mitad de las vainas en una muestra para romperse (“semivida de la muestra de vainas” o “LD50”). Sin embargo, es importante que las vainas se abran principalmente a lo largo de la zona de dehiscencia, y no se pulvericen simplemente, como puede ocurrir con vainas indehiscentes.

Un “incremento agrónomicamente relevante de resistencia al desgranado de las vainas”, como se usa aquí, se refiere a un incremento de la resistencia al desgranado de las vainas en una planta que da como resultado pérdidas

de productividad relacionadas con el desgranado de las vainas en el campo (pre-cosecha) por debajo de las observadas normalmente para esa planta en el campo. Para colza, existe información de que las pérdidas de productividad relacionadas con el desgranado de las vainas en el campo son de alrededor de 11% para una estación con unas condiciones medias buenas de crecimiento, y alrededor de 25% para una estación con unas condiciones medias malas de crecimiento. Se ha descubierto una correlación positiva entre estos niveles de pérdida de semillas y el nivel de pérdida de semillas a un tiempo de tratamiento de 9,7 s y 17 s, respectivamente, en el ensayo de impactos aleatorios como describen Bruce et al., 2002 (Biosystems Eng 81(2): 179-184). Como alternativa, para determinar si el nivel de resistencia al desgranado de vainas en una planta es agrónomicamente relevante, la semivida de la muestra de vainas ("LD50", véase anteriormente) de la planta se puede comparar con la semivida de la muestra de vainas de una planta que se sabe que tiene un nivel medio de resistencia al desgranado de las vainas, tales como, para colza, todas las variedades de colza comercialmente disponibles en la actualidad.

Como se usa aquí, "desgranado de las vainas o de las semillas" o "dehiscencia del fruto o de las vainas" se refiere a un proceso que tiene lugar en un fruto tras la maduración de las semillas, con lo que las valvas se desprenden del tabique central, liberando las semillas. La región que se rompe (es decir, la "zona de dehiscencia") corre a lo largo de toda la longitud del fruto entre las valvas y el replum (tabique externo). En la madurez, la "zona de dehiscencia" es esencialmente una capa no lignificada de células entre una región de células lignificadas en la valva y el replum. El desgranado se produce debido a la combinación de la soltura de la pared celular en la zona de dehiscencia y las tensiones establecidas por las propiedades mecánicas diferenciales de las células que se secan en la silicua.

Un "fruto" de *Brassica*, como se usa aquí, se refiere a un órgano de una planta de *Brassica* que se desarrolla a partir de un gineceo compuesto de carpelos fundidos, que, tras la fertilización, crece para convertirse en una "vaina (semilla)" o "silicua" que contiene las semillas en desarrollo. Una "vaina (semilla)" o "silicua" de *Brassica* consiste en una pared del fruto (carpelo) que encierra dos cavidades pequeñas separadas por el tabique. Las "zonas de dehiscencia" se desarrollan en los márgenes del carpelo adyacentes al tabique, y corren a lo largo de la longitud de la silicua. Las células de la zona de dehiscencia comienzan eventualmente a degradarse, y esto debilita el contacto entre las paredes del carpelo o valvas y el tabique. La pérdida de cohesión celular está confinada a las células de la zona de dehiscencia y resulta de la ruptura de la laminilla media (Meakin y Roberts, 1990, J Exp Bot 41, 995-1011).

"Zonas de dehiscencia", como se usa aquí, se refiere a capas de células parenquimatosas, simples, contenidas en las suturas situadas a ambos lados de la vaina bivalva de las plantas, en particular plantas de *Brassica*. Las zonas de dehiscencia están situadas entre el borde de la valva de la vaina y un replum central que contiene el haz vascular principal hasta el tallo o pedicelo. La disociación de las células en la zona de dehiscencia tiene lugar durante la senescencia de la vaina, y está terminada en el momento en el que las vainas alcanzan la madurez total (Meakin y Roberts, 1990, más arriba). Entonces puede tener lugar la separación de las valvas. La zona de dehiscencia contiene trazas vasculares, que pasan desde la pared de la vaina hasta el pedicelo (tallo) y el replum. El proceso de desgranado de las vainas tiene lugar solamente después de que una fuerza externa fractura los hilos vasculares delicados, permitiendo que las valvas se separen y que las semillas caigan al suelo. Esto ocurre durante la perturbación de la copa de la planta, por ejemplo, mediante contacto con la cosechadora durante la cosecha. El tejido vascular contiene células gruesas lignificadas, que forman los grupos colenquimatosos de células encontrados adyacentes a las células conductoras (Meakin y Roberts, 1990, más arriba). Esto proporciona rigidez al tejido y, presumiblemente, cierta resistencia a la fractura.

Como se usa aquí, "una capacidad de trilla agrónomicamente relevante" se refiere a la resistencia de una vaina, particularmente una vaina de colza, a abrirse a lo largo de la zona de dehiscencia de la vaina con liberación concurrente de las semillas, al aplicar fuerzas físicas que permiten la apertura completa de las vainas mientras previene el daño a las semillas, como se usan por ejemplo en una cosechadora combinada. Se ha descubierto una correlación positiva entre la semivida de la muestra de vainas ("LD50") en un ensayo de impactos aleatorios y su capacidad de trilla. Las semividas de muestras de vainas de colza, según se determinan en un RIT realizado como se describe en los Ejemplos, que corresponden a la capacidad de trilla agrónomicamente relevante, no deberían superar 80 segundos. Los valores de semivida de las muestras típicos para líneas de control de variedades de colza comercialmente disponibles son de alrededor de 10 segundos. De este modo, las líneas con resistencia al desgranado de las vainas significativamente incrementada con capacidad de trilla agrónomicamente relevante tienen una semivida de la muestra de vainas en RIT entre alrededor de 10 y alrededor de 80 segundos, entre alrededor de 10 y alrededor de 60 segundos, entre alrededor de 10 y alrededor de 50 segundos, entre alrededor de 20 y alrededor de 60 segundos, entre alrededor de 20 y alrededor de 50 segundos, entre alrededor de 40 y alrededor de 60 segundos, de alrededor de 57 segundos.

"Planta de cultivo" se refiere a la especie vegetal cultivada como un cultivo, tal como *Brassica napus* (AACC, 2n=38), *Brassica juncea* (AABB, 2n=36), *Brassica carinata* (BBCC, 2n=34), *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*) (AA, 2n=20), *Brassica oleracea* (CC, 2n=18) o *Brassica nigra* (BB, 2n=16). La definición no engloba malas hierbas, tales como *Arabidopsis thaliana*.

La expresión "secuencia de ácido nucleico" (o molécula de ácido nucleico) se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma mono o bicatenaria, particularmente un ADN que codifica una proteína o fragmento proteico como se describe aquí. Una "secuencia de ácido nucleico endógena" se refiere a una secuencia de ácido nucleico en una célula vegetal, por ejemplo, un alelo endógeno de un gen *IND* presente en el genoma nuclear de una célula de

Brassica. Una “secuencia de ácido nucleico aislada” se usa para referirse a una secuencia de ácido nucleico que ya no está en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula hospedante bacteriana o vegetal recombinante.

El término “gen” significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (, por ejemplo, en un pre-ARNm, que comprende secuencias intrónicas, que entonces se ajusta en un ARNm maduro, o directamente en un ARNm sin secuencias intrónicas) en una célula, ligada operablemente a regiones reguladoras (, por ejemplo, un promotor). Un gen puede así comprender varias secuencias ligadas operablemente, tal como un promotor, una secuencia líder de 5' que comprende por ejemplo secuencias implicadas en el inicio de la traducción, una región (ADNc o ADN genómico) codificante (de proteína), y una secuencia no traducida de 3' que comprende por ejemplo sitios de terminación de la transcripción. “Gen endógeno” se usa para diferenciarlo de un “gen extraño”, “transgén” o “gen quimérico”, y se refiere a un gen procedente de una planta de un cierto género, especie o variedad vegetal, que no se ha introducido en esa planta mediante transformación (es decir, no es un “transgén”), pero que normalmente está presente en plantas de ese género, especie o variedad, o que se introduce en esa planta a partir de plantas de otro género, especie o variedad vegetal, en las que normalmente está presente, mediante técnicas de reproducción normales o mediante hibridación somática, por ejemplo, mediante fusión de protoplastos. De forma similar, un “alelo endógeno” de un gen no se introduce en una planta o tejido vegetal mediante transformación vegetal, pero se genera, por ejemplo, mediante mutagénesis y/o selección vegetal, o se obtiene mediante identificación de poblaciones naturales de plantas.

“Expresión de un gen” o “expresión génica” se refiere a un proceso en el que una región de ADN, que está enlazada operablemente a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, es transcrita en una molécula de ARN. La molécula de ARN se procesa entonces adicionalmente (mediante procesos post-traduccionales) en la célula, por ejemplo, mediante ajuste de ARN e iniciación de la traducción y traducción en una cadena de aminoácidos (polipéptido), y terminación de la traducción mediante codones de parada de la traducción. La expresión “expresada funcionalmente” se usa aquí para indicar que se produce una proteína funcional; la expresión “no expresada funcionalmente” se usa para indicar que se produce una proteína con funcionalidad (actividad biológica) significativamente reducida o sin funcionalidad, o que no se produce ninguna proteína (véase adicionalmente más abajo).

Los términos “proteína” o “polipéptido” se usan de forma intercambiable, y se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción específico, tamaño, estructura tridimensional u origen. Un “fragmento” o “porción” de una proteína IND puede así todavía referirse como una “proteína”. Una “proteína aislada” se usa para referirse a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula hospedante bacteriana o vegetal recombinante. La expresión “factor de transcripción” se usa para referirse a una proteína que consiste en al menos dos dominios discretos – un dominio de unión a ADN y un dominio de activación o represión – que operan juntos para modular la velocidad de inicio transcripcional a partir de promotores génicos diana (Ptashne, 1988, Nature 335, 683-689). La expresión “factor de transcripción con dominio de hélice-bucle-hélice básica (bHLH)” se usa para referirse a un factor de transcripción que comprende, aparte del dominio de unión a ADN bHLH (Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770), dominios que se sabe que son importantes para la regulación de la expresión génica que pueden conservarse a nivel de aminoácidos en proteínas relacionadas procedentes de diferentes especies (Quong et al., 1993, Mol Cell Biol 13, 792-800). Los reguladores transcripcionales que comprenden un dominio bHLH se unen a ADN a través de restos en la región básica mientras que el dominio de hélice-bucle-hélice promueve la dimerización, permitiendo que los miembros de la familia formen hetero- u homodímeros (Murre et al., 1989, Cell 56, 777-783).

La expresión “gen *IND*” se refiere aquí a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína INDEHISCENT (IND), que es un factor de transcripción con dominio bHLH requerido para la dispersión de las semillas (Liljegren et al., 2004, Cell 116: 843-853).

Como se usa aquí, el término “alelo(s)” significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular. En una célula diploide (o anfidiplóide) de un organismo, los alelos de un gen dado están situados en una localización específica o locus (loci en plural) en un cromosoma. Un alelo está presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos.

Como se usa aquí, la expresión “cromosomas homólogos” significa cromosomas que contienen información para los mismos rasgos biológicos y contienen los mismos genes en los mismos loci pero posiblemente alelos diferentes de esos genes. Los cromosomas homólogos son cromosomas que se aparean durante la meiosis. Los “Cromosomas no homólogos”, que representan todos los rasgos biológicos de un organismo, forman un conjunto, y el número de conjuntos en una célula se denomina ploidía. Los organismos diploides contienen dos conjuntos de cromosomas no homólogos, en los que cada cromosoma homólogo se hereda de un progenitor diferente. En especies anfidiplóides, existen esencialmente dos conjuntos de genomas diploides, por lo que los cromosomas de los dos genomas se denominan como “cromosomas homeólogos” (y de forma similar, los loci o genes de los dos genomas se denominan como loci o genes homeólogos). Una especie vegetal diploide, o anfidiplóide, puede comprender un gran número de diferentes alelos en un locus particular.

Como se usa aquí, el término “heterocigótico” significa una condición genética que existe cuando dos alelos diferentes residen en un locus específico, pero están situados individualmente en pares correspondientes de

cromosomas homólogos en la célula. Por el contrario, como se usa aquí, el término “homocigótico” significa una condición genética que existe cuando dos alelos idénticos residen en un locus específico, pero están situados individualmente en pares correspondientes de cromosomas homólogos en la célula.

5 Como se usa aquí, el término “locus” (loci en plural) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma en el que por ejemplo se encuentra un gen o marcador genético. , por ejemplo, el “locus *IND-A1*” se refiere a la posición en un cromosoma del genoma A en la que se puede encontrar el gen *IND-A1* (y dos alelos *IND-A1*), mientras que el “locus *IND-C1*” se refiere a la posición en un cromosoma del genoma C en la que se puede encontrar el gen *IND-C1* (y dos alelos *IND-C1*).

10 Siempre que se haga referencia a una “planta” o “plantas” según la invención, se entiende que están englobadas aquí, excepto que se indique de otro modo, partes de la planta (células, tejidos u órganos, vainas de semillas, semillas, partes cortadas tales como raíces, hojas, flores, polen, etc.), progenie de las plantas que retiene las características distintivas de los progenitores (especialmente las propiedades de dehiscencia del fruto), tal como la semilla obtenida mediante autofertilización o cruce, por ejemplo, semilla híbrida (obtenida cruzando dos líneas parentales endogámicas), plantas híbridas y partes de plantas derivadas de ellas.

15 Un “ensayo molecular” (o ensayo) se refiere aquí a un ensayo que indica (directa o indirectamente) la presencia o ausencia de uno o más alelos *IND* particulares en uno o ambos loci *IND* (, por ejemplo, en uno o ambos de los loci *IND-A1* o *IND-C1*). Puede permitir determinar si un alelo particular (tipo salvaje o mutante) es homocigótico o heterocigótico en el locus en cualquier planta individual.

20 “Tipo salvaje” (también escrito “tiposalvaje” o “tipo-salvaje” en los términos en inglés), como se usa aquí, se refiere a una forma típica de una planta o un gen como aparece más habitualmente en la naturaleza. Una “planta de tipo salvaje” se refiere a una planta con el fenotipo más habitual de tal planta en la población natural. Un “alelo de tipo salvaje” se refiere a un alelo de un gen requerido para producir el fenotipo de tipo salvaje. Por el contrario, una “planta mutante” se refiere a una planta con un fenotipo raro diferente de tal planta en la población natural, o producido por intervención humana, por ejemplo, mediante mutagénesis, y un “alelo mutante” se refiere a un alelo de un gen requerido para producir el fenotipo mutante.

25 Como se usa aquí, la expresión “*IND* de tipo salvaje” (, por ejemplo, *IND-A1* o *IND-C1* de tipo salvaje) significa un alelo *IND* de origen natural encontrado en plantas, en particular plantas *Brassicaceae*, especialmente plantas de *Brassica*, que codifica una proteína *IND* funcional (, por ejemplo, una *IND-A1* o *IND-C1* funcional, respectivamente). Por el contrario, el término “*IND* mutante” (por ejemplo *IND-A1* o *IND-C1* mutante), como se usa aquí, se refiere a un alelo *IND* que no codifica una proteína *IND* funcional, es decir, un alelo *IND* que codifica una proteína *IND* no funcional (, por ejemplo, una *IND-A1* o *IND-C1* no funcional, respectivamente), que, como se usa aquí, se refiere a una proteína *IND* que no tiene actividad biológica o que tiene una actividad biológica significativamente reducida en comparación con la proteína *IND* funcional de tipo salvaje correspondiente, o que no codifica ninguna proteína *IND* en absoluto. Tal “alelo *IND* mutante” (también denominado alelo “genosuprimido completamente” o “nulo”) es un alelo *IND* de tipo salvaje que comprende una o más mutaciones en su secuencia de ácido nucleico, por lo cual la mutación o mutaciones dan preferiblemente como resultado una cantidad (absoluta o relativa) significativamente reducida de proteína *IND* funcional en la célula *in vivo*. Como se usa aquí, un “alelo *IND* completamente genosuprimido” es un alelo *IND* mutante cuya presencia en estado homocigótico en cada locus *IND* en la planta (, por ejemplo, una planta de *Brassica napus* con dos alelos *IND-A1* completamente genosuprimidos y dos alelos *IND-C1* completamente genosuprimidos) da como resultado un incremento de la resistencia al desgranado de las vainas en esa planta, que es demasiado alto para ser todavía agrónomicamente relevante. Los alelos mutantes de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína *IND* se designan aquí como “*ind*” (por ejemplo *ind-a1* o *ind-c1*, respectivamente). Los alelos mutantes pueden ser alelos “mutantes naturales”, que son alelos mutantes encontrados en la naturaleza (, por ejemplo, producidos espontáneamente sin la aplicación humana de mutágenos), o alelos “mutantes inducidos”, que son inducidos por intervención humana, por ejemplo, mediante mutagénesis.

30 Una “cantidad significativamente reducida de proteína *IND* funcional” (por ejemplo proteína *IND-A1* o *IND-C1* funcional) se refiere a una reducción en la cantidad de una proteína *IND* funcional producida por la célula que comprende un alelo *IND* mutante en al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% (es decir, no se produce proteína *IND* funcional por la célula) en comparación con la cantidad de la proteína *IND* funcional producida por la célula que no comprende el alelo *IND* mutante. Esta definición engloba la producción de una proteína *IND* “no funcional” (, por ejemplo, proteína *IND* truncada) que no tiene actividad biológica *in vivo*, la reducción en la cantidad absoluta de la proteína *IND* funcional (, por ejemplo, no obteniéndose proteína *IND* funcional debido a la mutación en el gen *IND*), y/o la producción de una proteína *IND* con actividad biológica significativamente reducida en comparación con la actividad de una proteína *IND* de tipo salvaje funcional (tal como una proteína *IND* en la que uno o más restos de aminoácidos que son cruciales para la actividad biológica de la proteína *IND* codificada, como se ejemplifica más abajo, se sustituyen por otro resto de aminoácido). La expresión “proteína *IND* mutante”, como se usa aquí, se refiere a una proteína *IND* codificada por una secuencia de ácido nucleico *IND* mutante (“alelo *ind*”), por lo que la mutación da como resultado una actividad *IND* significativamente reducida y/o ninguna actividad *IND in vivo*, en comparación con la actividad de la proteína *IND* codificada por una secuencia *IND* de tipo salvaje no mutante (“alelo *IND*”).

“Mutagénesis”, como se usa aquí, se refiere al proceso en el que células vegetales (, por ejemplo, una pluralidad de semillas de *Brassica* u otras partes, tal como polen, etc.) se someten a una técnica que induce mutaciones en el ADN de las células, tal como contacto con un agente mutágeno, tal como una sustancia química (tal como metanosulfonato de etilo (EMS), etilnitrosourea (ENU), etc.) o radiación ionizante (neutrones (tales como en mutagénesis con neutrones rápidos, etc.), rayos alfa, rayos gamma (tales como los suministrados por una fuente de Cobalto 60), rayos X, radiación UV, etc.), o una combinación de dos o más de estos. De este modo, la mutagénesis deseada de uno o más alelos *IND* se puede lograr mediante el uso de medios químicos tales como mediante el contacto de uno o más tejidos vegetales con metanosulfonato de etilo (EMS), etilnitrosourea, etc., mediante el uso de medios físicos tales como rayos X, etc., o mediante radiación gamma, tal como la suministrada por una fuente de Cobalto 60. Aunque las mutaciones creadas por irradiación son a menudo grandes supresiones u otras lesiones gruesas tales como translocaciones o reordenamientos complejos, las mutaciones creadas por mutágenos químicos son a menudo lesiones más discretas, tales como mutaciones de punto. , por ejemplo, EMS alquila bases de guanina, lo que da como resultado un desemparejamiento de bases: una guanina alquilada se emparejará con una base de timina, dando como resultado principalmente transiciones de G/C a A/T. Tras la mutagénesis, las plantas de *Brassica* se regeneran a partir de las células tratadas, usando técnicas conocidas. , por ejemplo, las semillas de *Brassica* resultantes se pueden sembrar según procedimientos de cultivo convencionales y, tras la autopolinización, se forma la semilla en las plantas. Como alternativa, se pueden extraer plántulas doblemente haploides para formar inmediatamente plantas homocigóticas, por ejemplo, como describen Coventry et al. (1988, Manual for Microspore Culture Technique for *Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). La semilla adicional que se forma como resultado de tal autopolinización en la presente generación o en una generación subsiguiente se puede cosechar e identificar en busca de la presencia de alelos *IND* mutantes. Se conocen varias técnicas para identificar alelos mutantes específicos, por ejemplo, Deleteagene™ (Delete-a-gene; Li et al., 2001, Plant J 27: 235-242) usa ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar mutantes por supresión generados mediante mutagénesis con neutrones rápidos, TILLING (lesiones locales inducidas dirigidas en genomas; McCallum et al., 2000, Nat Biotechnol 18:455-457) identifica mutaciones de punto inducidas por EMS, etc. En los Ejemplos más abajo se describen técnicas adicionales para identificar la presencia de alelos *IND* mutantes específicos.

Como se usa aquí, la expresión “de origen no natural”, cuando se usa con referencia a una planta, significa una planta con un genoma que se ha modificado por el hombre. Una planta transgénica, por ejemplo, es una planta de origen no natural que contiene una molécula de ácido nucleico exógena, por ejemplo, un gen quimérico que comprende una región transcrita que, cuando se transcribe, produce una molécula de ARN biológicamente activa capaz de reducir la expresión de un gen endógeno, tal como un gen *IND* como se describe aquí, y por lo tanto ha sido modificada genéticamente por el hombre. Además, una planta que contiene una mutación en un gen endógeno, por ejemplo, una mutación en un gen *IND* endógeno, (por ejemplo en un elemento regulador o en la secuencia codificante) como resultado de una exposición a un agente mutágeno, también se considera una planta no natural, puesto que se ha modificado genéticamente por el hombre. Además, una planta de una especie particular, tal como *Brassica napus*, que contiene una mutación en un gen endógeno, por ejemplo, en un gen *IND* endógeno, que en la naturaleza no aparece en esa especie vegetal particular, como resultado de, por ejemplo, procesos de reproducción dirigida, tal como reproducción asistida por marcadores y selección o introgresión, con una planta de la misma especie o de otra especie, tal como *Brassica juncea* o *rapa*, de esa planta también se considera una planta de origen no natural. Por el contrario, una planta que contiene solamente mutaciones espontáneas o de origen natural, es decir, una planta que no ha sido modificada genéticamente por el hombre, no es una “planta de origen no natural” como se define aquí, y por lo tanto no está englobada en la invención. Un experto en la técnica entiende que, aunque una planta de origen no natural tiene típicamente una secuencia nucleotídica que está alterada en comparación con una planta de origen natural, una planta de origen no natural también puede ser modificada genéticamente por el hombre sin alterar su secuencia nucleotídica, por ejemplo, modificando su patrón de metilación.

El término “ortólogo” de un gen o proteína se refiere aquí al gen o proteína homólogos encontrados en otra especie, que tiene la misma función que el gen o proteína, pero (habitualmente) diverge en secuencia desde el momento cuando las especies que poseen los genes divergieron (es decir, los genes evolucionaron desde un ancestro común mediante especiación). Los ortólogos de los genes *IND* de *Brassica napus* se pueden así identificar en otras especies vegetales (por ejemplo *Brassica juncea*, etc.) basándose tanto en comparaciones de secuencias (por ejemplo basándose en porcentajes de identidad de secuencia a lo largo de toda la secuencia o a lo largo de dominios específicos) como/o en análisis funcional.

Una “variedad” se usa aquí de acuerdo con la convención UPOV, y se refiere a un agrupamiento vegetal en un único taxón botánico del rango conocido más bajo, agrupamiento el cual se puede definir mediante la expresión de las características que resultan de un genotipo dado o combinación de genotipos, se puede distinguir de cualquier otro agrupamiento vegetal mediante la expresión de al menos una de las mencionadas características, y se considera como una unidad con respecto a su idoneidad para ser propagado sin cambios (estable).

El término “que comprende” se ha de interpretar como que especifica la presencia de las partes, etapas o componentes señalados, pero no excluye la presencia de una o más partes, etapas o componentes adicionales. De este modo, una planta que comprende un rasgo puede comprender rasgos adicionales.

Se entiende que cuando se hace referencia a una palabra en singular (por ejemplo planta o raíz), el plural también está incluido aquí (, por ejemplo, una pluralidad de plantas, una pluralidad de raíces). De este modo, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno del elemento, excepto que el contexto requiera claramente que tiene que haber uno y solamente uno de los elementos. El artículo indefinido “un” o “una” significa así habitualmente “al menos uno”.

Para los fines de esta invención, la “identidad de secuencia” de dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias óptimamente alineadas que tienen restos idénticos (x100) dividido entre el número de posiciones comparadas. Un espacio, es decir, una posición en un alineamiento en el que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con restos no idénticos. El “alineamiento óptimo” de dos secuencias se encuentra alineando las dos secuencias a lo largo de toda la longitud según el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J Mol Biol 48(3):443-53) en The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276-277; véase, por ejemplo, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) usando ajustes por defecto (penalización de apertura de espacio = 10 (para nucleótidos)/10 (para proteínas) y penalización de extensión del espacio = 0,5 (para nucleótidos)/0,5 (para proteínas)). Para nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto usada es EDNAFULL, y para proteínas, la matriz de puntuación por defecto es EBLOSUM62.

“Sustancialmente idéntica” o “esencialmente similar”, como se usa aquí, se refiere a secuencias, que, cuando se alinean óptimamente como se define anteriormente, comparten al menos un cierto porcentaje mínimo de identidad de secuencia (como se define adicionalmente más abajo).

“Condiciones de hibridación restrictivas” se puede usar para identificar secuencias nucleotídicas, que son sustancialmente idénticas a una secuencia nucleotídica dada. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia, y serán diferentes en diferentes circunstancias. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean 5°C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (la fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente coincidente. Típicamente, se escogerán condiciones restrictivas en las que la concentración de sal es alrededor de 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es al menos 60°C. La reducción de la concentración de sal y/o el incremento de la temperatura aumentan la restricción. Las condiciones restrictivas para hibridaciones ARN-ADN (transferencias Northern usando la sonda de por ejemplo 100 nt) son por ejemplo aquellas que incluyen al menos un lavado en 0,2X SSC a 63°C durante 20 min., o condiciones equivalentes.

“Condiciones muy restrictivas” se pueden proporcionar, por ejemplo, mediante hibridación a 65°C en una disolución acuosa que contiene 6x SSC (20x SSC contiene 3,0 M de NaCl, 0,3 M de citrato de sodio, pH 7,0), 5x Denhardt (100X Denhardt contiene 2% de Ficoll, 2% de polivinilpirrolidona, 2% de seroalbúmina bovina), 0,5% de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 20 µg/ml de ADN portador desnaturizado (ADN de esperma de pescado monocatenario, con una longitud media de 120-3000 nucleótidos) como competidor no específico. Tras la hibridación, el lavado de restricción elevada se puede realizar en varias etapas, con un lavado final (alrededor de 30 min.) a la temperatura de hibridación en 0,2-0,1 x SSC, 0,1% de SDS.

“Condiciones de restricción moderada” se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la disolución descrita anteriormente, pero a alrededor de 60-62°C. El lavado de restricción moderada se puede realizar a una temperatura de hibridación en 1x SSC, 0,1% de SDS.

“Baja restricción” se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la disolución descrita anteriormente a alrededor de 50-52°C. El lavado de baja restricción se puede realizar a la temperatura de hibridación en 2x SSC, 0,1% de SDS. Véanse también Sambrook et al. (1989) y Sambrook y Russell (2001).

“Productividad cosechada incrementada” o “productividad incrementada de semillas o granos” se refiere a la mayor cantidad de semilla o grano cosechada de una pluralidad de plantas, que comprenden cada una alelos IND mutantes según la invención, cuando se compara con la cantidad de semilla o grano cosechada de un número similar de plantas isogénicas sin los alelos IND mutantes. La productividad se expresa típicamente en unidades de volumen de semilla cosechada por unidades de superficie, tal como bushels/acre o kg/ha. El incremento de la productividad se expresa típicamente en porcentaje, por lo que la productividad de la planta de referencia o de control se refiere como 100% y la productividad de las plantas según las invenciones se expresa en % con respecto a la productividad de la planta de control. Los incrementos de productividad observados en plantas de Brassica según la invención oscilaron desde al menos 101% hasta al menos 124%, y se espera que sean factibles mayores incrementos de la productividad. El incremento de la productividad también puede oscilar desde 104% hasta 108%, o 105% hasta 110%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Brassica napus (genoma AACC, $2n=4x=38$), que es una especie alotetraploide (anfidiplóide) que contiene esencialmente dos genomas diploides (el genoma A y el genoma C) debido a su origen de ancestros diploides, comprende dos genes *IND* en su genoma. Los inventores descubrieron que un gen *IND* está situado en el genoma A

(denominado aquí como “*IND-A1*”) y uno en el genoma C (denominado aquí como “*IND-C1*”). Se afirma que el gen *IND-A1* es “homeólogo” al gen *IND-C1*, es decir, el “gen A” se encuentra en el genoma A y se origina a partir del ancestro diploide *B. rapa* (AA), mientras que el “gen C” se encuentra en el genoma C de *B. napus* y se origina a partir del ancestro diploide *B. oleracea* (CC).

5 Al igual que en cualquier genoma diploide, puede haber dos “alelos” *in vivo* para cada gen *IND* en cada locus *IND* en el genoma (siendo un alelo la secuencia génica encontrada en un cromosoma, y el otro en el cromosoma homólogo). La secuencia nucleotídica de estos dos alelos puede ser idéntica (planta homocigótica) o diferente (planta heterocigótica) en cualquier planta dada, aunque el número de alelos posibles diferentes que existen para cada gen *IND* puede ser mucho más grande que dos en la población de la especie como un todo.

10 Se descubrió además que plantas de *Brassica napus*, que son homocigóticas para un alelo *ind* completamente genosuprimido en solamente uno de los dos genes *IND*, es decir, en *IND-A1* o *IND-C1*, no muestran un incremento significativo en la resistencia al desgranado de las vainas en comparación con plantas de *Brassica napus* que no comprenden alelos *IND* mutantes, mientras que en plantas de *Brassica napus*, que son homocigóticas para un alelo *ind* completamente genosuprimido en ambos genes *IND*, la resistencia al desgranado de las vainas está significativamente incrementada, pero el nivel de resistencia al desgranado de las vainas es demasiado elevado para mantener una capacidad de trilla agrónomicamente relevante. Por el contrario, la resistencia al desgranado de las vainas está significativamente incrementada en plantas de *Brassica napus* que comprenden tres alelos *ind* completamente genosuprimidos de los dos genes *IND* de *Brassica napus*, hasta un nivel mediante el cual las plantas mantienen una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas. Se piensa que la presencia de tres alelos *ind* completamente genosuprimidos en una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular en una planta de *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y un gen *IND-C1*, puede ser necesaria a fin de obtener una planta que muestre una mayor resistencia al desgranado de las vainas mientras mantiene una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas.

25 De este modo, en una realización de la invención, se proporciona aquí una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta de *Brassica napus* que comprende un gen *IND-A1* y un gen *IND-C1*, que comprende 3 alelos *ind*, mediante lo cual los alelos *ind* dan como resultado una cantidad significativamente reducida de proteína *IND* funcional del tipo codificado por el equivalente de tipo salvaje de estos alelos mutantes, y de este modo una cantidad significativamente reducida global de las proteínas *IND* funcionales producidas en las células de la planta, específicamente en las vainas de semillas en desarrollo, *in vivo*.

30 Se piensa además que combinando suficientes copias de alelos *ind* (mutantes) específicos con suficientes copias de alelos *IND* (tipo salvaje) específicos en una planta, en particular una planta de *Brassica*, es posible afinar la cantidad y/o tipo de proteínas *IND* funcionales obtenidas, lo que a su vez influye en las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta. La cantidad absoluta y relativa de las proteínas *IND* se puede afinar así de tal manera para proporcionar plantas que producen suficiente proteína o proteínas *IND* para permitir una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas de las semillas, a la vez que se reduce el desgranado de las semillas antes o durante la cosecha.

De este modo, en una realización de la invención, se proporciona una planta, en particular una planta de *Brassica*, que comprende al menos un alelo *IND* expresado funcionalmente, que codifica una proteína *IND* completamente funcional, mientras que los alelos restantes pueden ser alelos *ind* (mutantes).

40 En un aspecto de la invención, se proporciona una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una planta de *Brassica napus*, que comprende *n*-tuplos alelos *ind* de al menos 2 genes *IND* diferentes en esa planta de *Brassica*, en particular de los genes *IND-A1* y *IND-C1*, por lo cual $n \leq 3$ (por ejemplo $n = 1, 2, \text{ o } 3$), de manera que al menos un alelo produce una proteína *IND* funcional.

45 Es adecuada para la invención una planta de un solo mutante *IND* homocigótica ($n = 2$, es decir, homocigótica para un alelo mutante de un gen *IND*) y/o una planta mutante doble *IND* homocigótica ($n = 4$, es decir, homocigótica para un alelo mutante de dos genes *IND*) de una especie de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular de *Brassica napus*, mediante lo cual los alelos mutantes son alelos mutantes de 2 genes *IND* diferentes en esa planta de *Brassica*, en particular de los genes *IND-A1* y/o *IND-C1*. Tales plantas mutantes se pueden usar con fines reproductivos. De este modo, en una realización de la invención, se proporciona aquí una planta de *Brassica napus* mutante única *IND* homocigótica, en la que el genotipo de la planta puede ser descrito como *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/IND-C1*, o *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1/ind-c1*. También es adecuada una planta de *Brassica napus* mutante doble *IND* homocigótica, en la que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*.

55 En un aspecto adicional de la invención, la planta mutante individual ($n = 2$) *IND* homocigótica de la especie de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en particular de *Brassica napus*, comprende un alelo *IND* mutante adicional, en el que la planta mutante es heterocigótica para el alelo *IND* mutante adicional (es decir, $n = 3$), y en el que el alelo mutante es un alelo mutante del gen *IND* de tipo salvaje que queda en esa planta de *Brassica*, en particular del gen *IND-A1* o *IND-C1*. De este modo, en una realización adicional de la invención, se proporciona aquí una planta de *Brassica napus* mutante individual *IND* homocigótica que comprende un alelo *IND* mutante adicional,

en la que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/ind-c1*, o *IND-A1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*.

5 Se describen además aquí secuencias de ácidos nucleicos de genes/alelos *IND* de tipo salvaje y mutantes procedentes de la especie de *Brassica*, así como las proteínas *IND* de tipo salvaje y mutantes. También se describen métodos para generar y combinar alelos *IND* mutantes y de tipo salvaje en plantas de *Brassica*, así como plantas de *Brassica* y partes de plantas que comprenden combinaciones específicas de alelos *IND* de tipo salvaje y mutantes en su genoma, mediante lo cual se reduce el desgranado de las semillas en estas plantas. El uso de estas plantas para transferir alelos *IND* mutantes a otras plantas es también adecuado para la invención, como lo son los productos vegetales de cualquiera de las plantas descritas. Además, se proporcionan kits y métodos para la selección asistida por marcadores (MAS) para detectar genes y/o alelos *IND* en las plantas según la invención. Cada 10 una de las realizaciones de la invención se describe con detalle aquí más abajo.

Las plantas de *Brassica* descritas aquí, que muestran desgranado reducido o retrasado de las semillas, tienen un incremento en la productividad de semilla cosechada. Sin embargo, se observó, inesperadamente, que la productividad de semilla cosechada de plantas de *Brassica* que comprenden solamente dos alelos *IND* mutantes en estado homocigótico, es decir, en las que el genotipo de la planta se puede describir como *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/IND-C1*, o *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1/ind-c1*, también aumentó significativamente, cuando se compara con plantas de *Brassica* isogénicas que no comprenden los alelos *IND* mutantes, a pesar de la ausencia de un fenotipo de desgranado de semillas reducido o retrasado observable en las plantas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* mutantes. La invención proporciona también de este modo plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *IND*, en las que al menos dos alelos producen una proteína *IND* funcional, plantas las cuales tienen una mayor productividad de semillas. Estará claro que los dos alelos mutantes en el locus *IND-A* o en el locus *IND-C* pueden ser el mismo alelo mutante o un alelo mutante diferente. 15 20

Secuencias de ácidos nucleicos

Se describen aquí tanto secuencias de ácidos nucleicos *IND* de tipo salvaje que codifican proteínas *IND* funcionales como secuencias de ácidos nucleicos *ind* mutantes (que comprenden una o más mutaciones, preferiblemente mutaciones que dan como resultado ninguna o una actividad biológica significativamente reducida de la proteína *IND* modificada, o que no se produzca proteína *IND*) de genes *IND* de *Brassicaceae*, particularmente de la especie de *Brassica*, especialmente de *Brassica napus*, pero también de otras especies de cultivo de *Brassica*. , por ejemplo, la especie de *Brassica* que comprende un genoma A y/o C puede comprender diferentes alelos de los genes *IND-A* o *IND-C*, que se pueden identificar y combinar en una única planta según la invención. Además, se pueden usar métodos de mutagénesis para generar mutaciones en los alelos *IND* de tipo salvaje, generando de ese modo alelos *ind* mutantes para uso según la invención. Debido a que los alelos *IND* específicos se combinan preferiblemente en una planta mediante cruce y selección, las secuencias de ácidos nucleicos *IND* y/o *ind* se pueden proporcionar en una planta (es decir, endógenamente), por ejemplo, una planta de *Brassica*, preferiblemente una planta de *Brassica* que se puede cruzar con *Brassica napus* o que se puede usar para obtener una planta de *Brassica napus* "sintética". La hibridación entre diferentes especies de *Brassica* se describe en la técnica, por ejemplo, como se cita en Snowdon (2007, Chromosome research 15: 85-95). La hibridación interespecífica se puede usar, por ejemplo, para transferir genes desde, por ejemplo, el genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma C en *B. carinata* (BBCC), o incluso, por ejemplo, desde el genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma B en *B. juncea* (AABB) (mediante el suceso esporádico de recombinación ilegítima entre sus genomas C y B). Las líneas de *Brassica napus* "resintetizadas" o "sintéticas" se pueden producir cruzando los ancestros originales, *B. oleracea* (CC) y *B. rapa* (AA). Las barreras de incompatibilidad interespecífica, y también intergenérica, se pueden superar con éxito en cruces entre especies de cultivo de *Brassica* y sus parientes, por ejemplo, mediante técnicas de rescate de embriones o mediante fusión de protoplastos (véase, por ejemplo, Snowdon, anteriormente). 25 30 35 40

45 Sin embargo, también se describen aquí secuencias de ácidos nucleicos *IND* e *ind* aisladas (, por ejemplo, aisladas de la planta mediante clonación u obtenidas sintéticamente mediante síntesis de ADN), así como sus variantes y fragmentos de cualquiera de estas, ya que estas se pueden usar para determinar qué secuencia está presente endógenamente en una planta o parte de la planta, si la secuencia codifica una proteína funcional, una proteína no funcional, o ninguna proteína (, por ejemplo, mediante expresión en una célula hospedante recombinante como se describe más abajo), y para la selección y transferencia de alelos específicos de una planta a la otra, a fin de generar una planta que tiene la combinación deseada de alelos funcionales y mutantes. 50

Las secuencias de ácidos nucleicos de *IND-A1* e *IND-C1* se han aislado de *Brassica napus* como se dan en el listado de secuencias. Se dan las secuencias *IND* de tipo salvaje, mientras que las secuencias *ind* mutantes de estas secuencias, y de secuencias esencialmente similares a estas, se describen aquí más abajo y en los Ejemplos, con referencia a las secuencias *IND* de tipo salvaje. El ADN genómico que codifica la proteína *IND* de *Brassica napus* no comprende ningún intrón. 55

"Secuencias de ácidos nucleicos *IND-A1*" o "secuencias de ácidos nucleicos variantes *IND-A1*", según la invención, son secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 60

97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 5. Estas secuencias de ácidos nucleicos también se pueden citar aquí como “esencialmente similares” o “esencialmente idénticas” a las secuencias *IND* proporcionadas en el listado de secuencias.

5 “Secuencias de ácidos nucleicos *IND-C1*” o “secuencias de ácidos nucleicos variantes *IND-C1*”, según la invención, son secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 4 (*IND-C1-larga*) o con SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 210 (*IND-C1-corta*), o secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 3 (*IND-C1-larga*), con SEC ID NO:3 desde el nucleótido en la posición 46 hasta el nucleótido en la posición 633 (*IND-C1-corta*) o con SEC ID NO: 7. Estas secuencias de ácidos nucleicos también se pueden citar como “esencialmente similares” o “esencialmente idénticas” a las secuencias *IND* proporcionadas en el listado de secuencias.

15 De este modo, se describen tanto secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *IND-A1* e *IND-C1* funcionales, de tipo salvaje, incluyendo variantes y fragmentos de las mismas (como se definen adicionalmente más abajo), así como secuencias de ácidos nucleicos de cualquiera de estas, mediante lo cual la mutación en la secuencia de ácido nucleico da como resultado preferiblemente que se inserte, suprima o sustituya uno o más aminoácidos, en comparación con la proteína *IND* de tipo salvaje. Preferiblemente, la mutación o mutaciones en la secuencia de ácido nucleico da como resultado uno o más cambios de aminoácidos (es decir, en relación con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje, se inserta, suprime y/o sustituye uno o más aminoácidos), con lo que la actividad biológica de la proteína *IND* se reduce significativamente o se suprime completamente. Una reducción significativa o una supresión completa de la actividad biológica de la proteína *IND* se refiere aquí a una reducción o supresión de la actividad de unión a ADN, la capacidad de dimerización y/o la actividad reguladora transcripcional de la proteína *IND*, de manera que se incrementa la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que expresa la proteína *IND* mutante en comparación con una planta que expresa la proteína *IND* de tipo salvaje correspondiente.

25 Para determinar la funcionalidad de un alelo/proteína *IND* específico en plantas, particularmente en plantas de *Brassica*, se puede determinar el nivel de resistencia al desgranado de las vainas en las plantas llevando a cabo ensayos macroscópicos, microscópicos e histológicos sobre frutos y flores de las plantas que comprenden el alelo/proteína *IND* específicos y de plantas de tipo salvaje correspondientes, análogos a los ensayos llevados a cabo sobre frutos y flores de *Arabidopsis* como describen Liljegren et al. (2004, más arriba), o como se describe en los Ejemplos más abajo. De forma breve, los cambios en la resistencia al desgranado de las vainas se pueden evaluar y/o medir, por ejemplo, mediante ensayos macroscópicos, tal como inspección de las vainas de semillas a simple vista para evaluar, por ejemplo, la presencia o ausencia de los márgenes de la valva, la longitud del pico de las vainas, etc.; un ensayo de impacto manual (MIT) para comparar el nivel de resistencia al desgranado de las vainas entre diferentes líneas *IND* mutantes y las líneas de tipo salvaje correspondientes evaluando la facilidad de apertura de las vainas al retorcer suavemente las vainas; un ensayo de impactos aleatorios (RIT) para comparar la capacidad de trilla de las vainas de semillas de plantas de diferentes líneas *IND* mutantes y las líneas de tipo salvaje correspondientes, respectivamente, midiendo la semivida de las muestras de vainas de estas líneas; y/o mediante ensayos microscópicos para examinar, por ejemplo, si y cómo las células en el margen de la valva y en la zona de dehiscencia de vainas de semillas se ven afectadas por mutaciones en *IND*. Una vez que se identifica y caracteriza la pareja de dimerización de la proteína *IND* (, por ejemplo, la propia proteína *IND* en caso de que su funcionamiento dependa de la formación de un homodímero, u otra proteína en caso de que su funcionamiento dependa de la formación de un heterodímero) y/o el gen o genes cuya transcripción está regulada por la proteína *IND*, la funcionalidad de un alelo/proteína *IND* específicos se puede evaluar como alternativa mediante técnicas de ADN recombinante como se conocen en la técnica, por ejemplo, coexpresando ambas parejas del dímero en una célula hospedante (, por ejemplo, una bacteria, tal como *E. coli*) y evaluando si todavía se pueden formar dímeros, si los dímeros todavía se pueden unir al sitio de unión a bHLH del gen o genes regulados, y/o si la transcripción de este gen o genes todavía está regulada por esta unión.

50 Se describen aquí secuencias de ácidos nucleicos tanto endógenas como aisladas. También se describen fragmentos de las secuencias *IND* y secuencias de ácidos nucleicos variantes *IND* definidas anteriormente, para uso como cebadores o sondas y como componentes de kits como se describe aquí (véase adicionalmente más abajo). Un “fragmento” de una secuencia de ácido nucleico *IND* o *ind*, o variante de la misma (como se define), puede ser de diversas longitudes, tal como al menos 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 200, 500, 600 nucleótidos contiguos de la secuencia *IND* o *ind* (o de la secuencia variante).

55 Secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *IND* funcionales

Las secuencias de ácidos nucleicos dadas en el listado de secuencias codifican proteínas *IND* funcionales, de tipo salvaje, de *Brassica napus*. De este modo, estas secuencias son endógenas a las plantas de *Brassica napus* de las que se aislaron. Se pueden identificar otras especies de cultivo, variedades, líneas de reproducción o accesos salvajes de *Brassica* en busca de otros alelos *IND*, que codifican las mismas proteínas *IND* o sus variantes. , por ejemplo, se pueden usar técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (, por ejemplo, análisis de transferencia Southern, usando por ejemplo condiciones de hibridación restrictivas) o técnicas a base de PCR para identificar

alelos *IND* endógenos a otras plantas de *Brassica*, tales como diversas variedades, líneas o accesos de *Brassica napus*, pero también se pueden identificar plantas, órganos y tejidos de *Brassica juncea* (especialmente alelos *IND* en el genoma A), *Brassica carinata* (especialmente alelos *IND* en el genoma C), y *Brassica rapa* (genoma A) y *Brassica oleracea* (genoma C) en busca de otros alelos *IND* de tipo salvaje. Para identificar tales plantas, órganos vegetales o tejidos en busca de la presencia de alelos *IND*, se pueden usar las secuencias de ácidos nucleicos *IND* proporcionadas en el listado de secuencias, o variantes o fragmentos de cualquiera de estas. , por ejemplo, se pueden usar secuencias completas o fragmentos como sondas o cebadores. , por ejemplo, se pueden usar cebadores específicos o degenerados para amplificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *IND* del ADN genómico de la planta, órgano vegetal o tejido. Estas secuencias de ácidos nucleicos *IND* se pueden aislar y secuenciar usando técnicas de biología molecular estándar. Entonces se pueden usar análisis bioinformáticos para caracterizar el alelo o alelos, por ejemplo, a fin de determinar a qué alelo *IND* corresponde la secuencia y qué proteína *IND* o variante proteica es codificada por la secuencia.

Si una secuencia de ácido nucleico codifica una proteína *IND* funcional se puede analizar mediante técnicas de ADN recombinante como se conocen en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de complementación genética usando, por ejemplo, una planta de *Arabidopsis*, que es homocigótica para un alelo mutante *ind* completamente genosuprimido, o una planta de *Brassica napus*, que es homocigótica para un alelo mutante *ind* completamente genosuprimido tanto del gen *IND-A1* como del gen *IND-C1*.

Además, se entiende que las secuencias de ácidos nucleicos *IND* y sus variantes (o fragmentos de cualquiera de estas) se pueden identificar *in silico*, identificando bases de datos de ácidos nucleicos en busca de secuencias esencialmente similares. Igualmente, una secuencia de ácido nucleico se puede sintetizar químicamente. También se describen fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos adecuados para la invención, que se describen adicionalmente más abajo. Los fragmentos incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifican solamente el dominio bHLH, o fragmentos más pequeños que comprenden parte del dominio bHLH, tal como el dominio básico o el dominio HLH, etc.

Secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *IND* mutantes

Las secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una o más supresiones, inserciones o sustituciones nucleotídicas con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos de tipo salvaje son adecuadas para la invención, como lo son fragmentos de tales moléculas de ácidos nucleicos mutantes. Tales secuencias de ácidos nucleicos mutantes (denominadas secuencias *ind*) se pueden generar y/o identificar usando diversos métodos conocidos, como se describen adicionalmente más abajo. Nuevamente, tales moléculas de ácidos nucleicos son adecuadas tanto en forma endógena como en forma aislada. La mutación o mutaciones pueden dar como resultado uno o más cambios (supresiones, inserciones y/o sustituciones) en la secuencia de aminoácidos de la proteína *IND* codificada (es decir, no es una "mutación silenciosa"). La mutación o mutaciones en la secuencia de ácido nucleico pueden dar también como resultado una actividad biológica significativamente reducida o completamente suprimida de la proteína *IND* codificada con respecto a la proteína de tipo salvaje.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden comprender de este modo una o más mutaciones, tales como:

(a) una "mutación de sentido erróneo", que es un cambio en la secuencia de ácido nucleico que da como resultado la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido;

(b) una "mutación sin sentido" o "mutación de codón de PARADA", que es un cambio en la secuencia de ácido nucleico que da como resultado la introducción de un codón de PARADA prematuro y de este modo la terminación de la traducción (dando como resultado una proteína truncada); los genes vegetales contienen los codones de parada de la traducción "TGA" (UGA en ARN), "TAA" (UAA en ARN) y "TAG" (UAG en ARN); de este modo, cualquier sustitución, inserción, supresión nucleotídica que dé como resultado uno de estos codones en el ARNm maduro que se está traduciendo (en el marco de lectura) terminará la traducción;

(c) una "mutación de inserción" de uno o más aminoácidos, debido a que se ha añadido uno o más codones en la secuencia codificante del ácido nucleico;

(d) una "mutación de supresión" de uno o más aminoácidos, debido a que se ha suprimido uno o más codones en la secuencia codificante del ácido nucleico;

(e) una "mutación de desplazamiento del marco de lectura", que da como resultado que la secuencia de ácido nucleico se traduzca en un marco diferente en dirección 3' de la mutación. Una mutación de desplazamiento del marco de lectura puede tener diversas causas, tales como la inserción, supresión o duplicación de uno o más nucleótidos.

Como ya se mencionó, se desea que la mutación o mutaciones en la secuencia de ácido nucleico dé como resultado preferiblemente una proteína mutante que comprende actividad biológica significativamente reducida o ninguna actividad biológica *in vivo*, o la producción de ninguna proteína. Básicamente, cualquier mutación que dé como resultado una proteína que comprende al menos una inserción, supresión y/o sustitución de aminoácidos con respecto a la proteína de tipo salvaje puede conducir a una actividad biológica significativamente reducida o a

ninguna actividad biológica. Sin embargo, se entiende que las mutaciones en ciertas partes de la proteína den como resultado más probablemente una función reducida de la proteína IND mutante, tales como mutaciones que conducen a proteínas truncadas, con lo cual faltan porciones significativas de los dominios funcionales, tales como el dominio de unión a ADN ("b"), el dominio de dimerización ("HLH") y/o dominios reguladores de la transcripción.

5 Según la base de datos de The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>), la proteína INDEHISCENT de *Arabidopsis* (locus At4g00120.1; SEC ID NO: 10) tiene una longitud de 198 aminoácidos y comprende un dominio de "dimerización de hélice-bucle-hélice básica (bHLH)" situado entre los aminoácidos en la posición 121 y 168 (dominio pfam PF00010), entre los aminoácidos en la posición 124 y 173 (dominio smart SM00353), o entre los aminoácidos en la posición 112 y 168 (dominio prosite PS50888), y un dominio de "unión a ADN de hélice-bucle-hélice (HLH)" entre los aminoácidos en la posición 114 y 196 o 198 (dominio superfam G3D.4.10.280.10 o SSF47459, respectivamente) de SEC ID NO: 10.

15 La proteína IND-A1 de *Brassica* descrita aquí tiene alrededor de 185 aminoácidos de longitud (SEC ID NO:2), y la proteína IND-C1 alrededor de 195 (SEC ID NO:4 desde el aminoácido en la posición 16 hasta 210) o 210 (SEC ID NO:4) aminoácidos, y comprenden el dominio de "dimerización de bHLH básica" situado entre los aminoácidos en la posición 120 y 167 en SEC ID NO: 2 y la posición 133 y 180 en SEC ID NO: 4 (dominio pfam PF00010), entre los aminoácidos en la posición 123 y 172 en SEC ID NO: 2 y posición 136 y 185 en SEC ID NO: 4 (dominio smart SM00353), o entre los aminoácidos en la posición 111 y 167 en SEC ID NO: 2 y la posición 124 y 180 en SEC ID NO: 4 (dominio prosite PS50888), y el dominio de "unión a ADN HLH" entre los aminoácidos en la posición 127 y 208 o 210 en SEC ID NO: 4 (dominio superfam G3D.4.10.280.10 o SSF47459, respectivamente), según se determina alineando óptimamente las proteínas IND de *Brassica* y de *Arabidopsis* y en base a la información de anotación en la base de datos de TAIR.

25 Como describen Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747), la secuencia del dominio de bHLH de consenso de 133 genes del factor de transcripción bHLH de *Arabidopsis* consiste en aproximadamente 56 aminoácidos (Heim et al., Fig. 1; que corresponden a la posición 119-174 en SEC ID NO: 10). Este dominio bipartito comprende (1) la región básica, situada en el extremo N-terminal del dominio, que está implicada en la unión a ADN y que consiste en alrededor de 13 aminoácidos con un número elevado de restos básicos ("b"; que corresponden a la posición 119-131 en SEC ID NO: 10), y (2) la región de hélice-bucle-hélice, situada en el extremo C-terminal, que funciona como un dominio de dimerización y está constituida por alrededor de 43 restos de aminoácidos principalmente hidrófobos (que corresponden a la posición 132-174 en SEC ID NO: 10) que forman dos hélices alfa anfipáticas de alrededor de 15 aminoácidos ("H1"; que corresponden a la posición 132-146 en SEC ID NO: 10) y 22 aminoácidos ("H2"; que corresponden a la posición 153-174 en SEC ID NO: 10), respectivamente, separadas por una región de bucle de alrededor de 6 y hasta alrededor de 14 aminoácidos ("L"; que corresponden a la posición 147-152 en SEC ID NO: 10), que es la región más divergente del dominio de bHLH en términos de tamaño y composición de aminoácidos. Las dos hélices alfa promueven la dimerización, permitiendo la formación de homo- y/o heterodímeros entre diferentes miembros de la familia (Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15: 1749-1770). Mientras que el dominio de bHLH está evolutivamente conservado (Atchley y Fitch, 1997, PNAS 94: 5172-5176), hay poca similitud de secuencia entre diferentes miembros de la familia de bHLH más allá de este dominio (Morgenstern y Atchley, 1999, Mol Biol Evol 16: 1654-1663).

40 Dentro de esas proteínas bHLH con habilidad demostrada para unirse a ADN, los aminoácidos en la posición 5, 9, y 13 de la secuencia del dominio de bHLH de consenso definida por Heim et al. (más arriba) son los más críticos. Para proteínas bHLH no vegetales, se mostró que un resto His (H) en la posición 5, un resto Glu (E) en la posición 9 y un resto Arg (R) en la posición 13 (todos dentro de la región básica) fueron críticos para la unión a ADN (Brownlie et al., 1997, Structure 5, 509-520; Atchley et al., 1999, J Mol Evol 48, 501-516; Ledent y Vervoort, 2001, Genome Res 11, 754-770). Sin embargo, algunas proteínas vegetales tienen una variación de la configuración H-E-R. , por ejemplo, según Heim et al. (más arriba), el motivo 5-9-13 del dominio de bHLH codificado por el gen de *Arabidopsis* At4g00120 (que corresponde al gen *IND* de *Arabidopsis* representado en SEC ID NO: 9) consiste en los restos de aminoácidos Gln (Q), Ala (A) y Arg (R), respectivamente (que corresponden a las posiciones 123, 127 y 131, respectivamente, en SEC ID NO: 10) (Figura 4 de Heim et al. (más arriba)). Tales proteínas vegetales, que tienen una variación de la configuración H-E-R, pueden contener además prolinas que rompen la hélice en la región básica, por ejemplo, miembros del Grupo VIII y X, características que pueden interferir con la afinidad por ADN. Estas variaciones pueden permitir que estas proteínas actúen como reguladores negativos, reteniendo la capacidad para dimerizarse con otras proteínas bHLH pero careciendo de la capacidad para unirse a ADN. Aunque el motivo 5-9-13 es importante para la unión a ADN, la cadena de ADN está en contacto con los restos básicos en las posiciones 10 y 12 (ambos Arg (R) en la secuencia del dominio de bHLH de consenso), que también se conservan en la mayoría de las proteínas vegetales (que corresponden a las posiciones 128 y 130 en SEC ID NO: 10).

55 Además, Heim et al. (más arriba) describen que los restos hidrófobos muy conservados en la posición 16, 20, 23, 27 en la hélice 1 (que corresponden a la posición 134, 138, 141, 145 en SEC ID NO: 10) y en la posición 36, 39, 43, 49, 53, y 56 en la hélice 2 (que corresponden a la posición 154, 157, 161, 167, 171, 174 en SEC ID NO: 10), por ejemplo, el resto de leucina en la posición 23 en el dominio de la hélice 1 (que corresponde a la posición 141 en SEC ID NO: 10) y los restos hidrófobos conservados en la hélice 2 que están situados a un lado de la hélice, son necesarios para la dimerización o estabilización de la formación del dímero.

ES 2 543 425 T3

Finalmente, Heim et al. (más arriba; Fig. 4) indican secuencias de aminoácidos conservadas fuera del dominio de unión a ADN, algunas de las cuales se piensa que actúan como dominio de activación o son importantes para la interacción con otros módulos del complejo de transcripción, o son dianas para cadenas de transducción de señales.

Tabla 1 Proteínas IND – regiones y posiciones de aminoácidos (AA)

		AtIND1 (SEC ID NO: 10)	AtIND1 (SEC ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEC ID NO: 2/6)	BnIND-C1a/b (SEC ID 4/8 de 16-210 / SEC ID 4/8)
Región codificante	TAIR:	1-198 (198 AA)	1-594	1-185 (185 AA)	16-210 / 1-210 (195 / 210 AA)
	PF00010	121-168	361-504	120-167	133-180
	SM00353	124-173	370-519	123-172	136-185
	PS50888	112-168	334-504	111-167	124-180
	G3D.4.10.280.10	114-196	340-588	-	127-208
	SSF47459	114-198	340-594	-	127-210
	Liljegren et al.	30-198 (169 AA)	88-594		
bHLH:	Heim et al.	119-174	355-523	118-173	131-186
	Toledo-Ortiz et al.	115-167	343-501	114-166	127-179
	Liljegren et al.	119-167	355-501	118-166	131-179
b	Heim et al.	119-131	355-393	118-132	131-145
	Toledo-Ortiz et al.	115-131	343-393	114-132	127-145
	Liljegren et al.	119-131	355-393	118-132	131-145
H1	Heim et al.	132-146	394-438	133-145	146-158
	Toledo-Ortiz et al.	132-146	394-438	133-145	146-158
	Liljegren et al.	132-145	394-435	133-144	146-157
L	Heim et al.	147-152	439-456	146-151	159-164
	Toledo-Ortiz et al.	147-152	439-456	146-151	159-164
	Liljegren et al.	146-152	436-456	145-151	158-164
H2	Heim et al.	153-174	457-523	152-173	165-186
	Toledo-Ortiz et al.	153-167	457-501	152-166	165-179
	Liljegren et al.	153-167	457-501	152-166	165-179
AA conservados	N (1 ^T)	115	343-345	114	127
	V (2 ^I)	116	346-348	115	128
	Q (5 ^H)	123	367-379	122	135

ES 2 543 425 T3

		AtIND1 (SEC ID NO: 10)	AtIND1 (SEC ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEC ID NO: 2/6)	BnIND-C1a/b (SEC ID 4/8 de 16-210 / SEC ID 4/8)
	A (9 ^H - 13 ^T)	127	379-381	126	139
	R (10 ^H - 14 ^I)	128	382-384	127	140
	R (12 ^H - 16 ^I)	130	388-390	129	142
	R (13 ^H)	131	391-393	130	143
	I (16 ^H - 20 ^T)	134	400-403	133	146
	S (21 ^T)	135	404-406	134	147
	I (20 ^H -24 ^T)	138	412-414	137	150
	L (23 ^H -27 ^I)	141	421-423	140	153
	K (28 ^I)	142	424-426	141	154
	V (27 ^H)	145	433-435	144	157
	K (39 ^T)	150	448-450	149	162
	T (42 ^I)	153	460-463	152	165
	A (36 ^H)	154	460-462	153	166
	M (45 ^I)	156	466-468	155	168
	L (39 ^H -46 ^I)	157	469-471	156	169
	A (49 ^I)	160	478-480	159	172
	I (43 ^H -50 ^T)	161	481-483	160	173
	Y (52 ^T)	163	487-489	162	175
	T (53 ^I)	164	490-492	163	176
	L (49 ^H -56 ^I)	167	499-501	166	179
	V (53 ^H)	171	511-513	170	183
	L (56 ^H)	174	580-582	173 (A)	186
En ind	<i>ind-5</i> (W13>STOP) ^L	42	124-126	25	41
	<i>ind-2</i> (A26>FS) ^L	55	163-165	-	-
	<i>ind-6</i> ^w	Inserción después de 61	Inserción después de 185	-	-
	<i>ind-4</i> (Q63>STOP) ^L	92	274-276	91	104
	<i>ind-3</i> (R99>H) ^L	128	382-384	127	140
	<i>ind-1</i> (L112>F) ^L	141	421-423	140	153

Heim et al.,^H: Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; Toledo-Ortiz et al.,^T: Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15: 1749-1770; Liljegren et al.,^L: Liljegren et al., 2004, Cell, 116, 843-853;^W: Wu et al., 2006, Planta 224, 971-979.

De forma similar, como describen Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749-1770; Figura 1), el dominio de bHLH de la familia del factor de transcripción de bHLH de *Arabidopsis* consiste en aproximadamente 56 aminoácidos (Toledo-Ortiz et al.; que corresponden a la posición 115-167 en SEC ID NO: 10). Este dominio bipartito comprende (1) la región básica, situada en el extremo N-terminal del dominio, que está implicada en la unión a ADN y que consiste en alrededor de 17 aminoácidos con un número elevado de restos básicos ("b"; que corresponden a la posición 115-131 en SEC ID NO: 10), y (2) la región HLH, situada en el extremo C-terminal, que funciona como un dominio de dimerización y está constituida por alrededor de 39 restos de aminoácidos principalmente hidrófobos (que corresponden a la posición 132-167 en SEC ID NO: 10) que forman dos hélices alfa anfipáticas de alrededor de 15 aminoácidos ("H1" que corresponden a la posición 132-146 en SEC ID NO: 10, y "H2" que corresponden a la posición 152-167 en SEC ID NO: 10) separadas por una región de bucle de alrededor de 9 aminoácidos ("L"; que corresponden a la posición 147-151 en SEC ID NO: 10), que es la región más divergente del dominio de bHLH en términos de tamaño y composición de aminoácidos.

En base a patrones de conservación de secuencias, se generó por Atchley et al. (1999) un motivo de consenso hipotético, que representa los aminoácidos más conservados en la región de bHLH, que incluye 19 aminoácidos dispersos a lo largo del dominio de bHLH (18 de b, H1 y H2; 1 de L). Los aminoácidos conservados identificados corresponden a los aminoácidos en la posición 1, 2, 13, 14, 16 (en b); 20, 21, 24, 27, 28 (en H1); 39 (en L); 42, 45, 46, 49, 50, 52, 53, y 56 (en H2) del dominio de bHLH de *Arabidopsis* definido por Toledo-Ortiz et al. (2003, más arriba), que corresponden a los aminoácidos en la posición 115, 116, 127, 128, 130 (en b); 134, 135, 138, 141, 142 (en H1); 150 (en L); 153, 156, 157, 160, 161, 163, 164, y 167 (en H2) de SEC ID NO: 10

Según Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843-853), el dominio de bHLH del gen *IND* de *Arabidopsis* comprende una región básica de 13 aminoácidos (SEC ID NO: 10 desde el aminoácido en la posición 119 hasta 131) y dos hélices alfa de 14 y 15 aminoácidos, respectivamente, (SEC ID NO: 10 desde el aminoácido en la posición 132-145 y desde el aminoácido en la posición 153 hasta 167, respectivamente), separadas por una región de bucle variable de 7 aminoácidos (SEC ID NO: 10 desde el aminoácido en la posición 146 hasta 152).

El alineamiento óptimo de las secuencias de ácidos nucleicos *IND* (SEC ID NO: 9) y de aminoácidos (SEC ID NO: 10) de *Arabidopsis* con secuencias de ácidos nucleicos *IND*, en particular las secuencias de ácidos nucleicos *IND* (SEC ID NO: 1 y 3) y de aminoácidos (SEC ID NO: 2 y 4) de *Brassica* de la presente invención, permite determinar las posiciones de los dominios y aminoácidos conservados correspondientes en estas secuencias de *Brassica* (véase la Tabla 1 para las secuencias *IND* de *Brassica* de SEC ID NO: 1 a 4).

De este modo, se describen secuencias de ácidos nucleicos que comprenden uno o más de cualquiera de los tipos de mutaciones descritos anteriormente. También, se describen secuencias *ind* que comprenden una o más mutaciones de codón de parada (sin sentido), una o más mutaciones de sentido erróneo, y/o una o más mutaciones de desplazamiento del marco de lectura. Cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos mutantes se describen *per se* (en forma aislada), como lo son las plantas y partes vegetales que comprenden tales secuencias endógenamente. En las tablas aquí más abajo, se describen los alelos *ind* más preferidos, y se han depositado los depósitos de semillas de semillas de *Brassica napus* que comprenden uno o más alelos *ind*.

Una mutación sin sentido en un alelo *IND*, como se usa aquí, es una mutación en un alelo *IND* mediante la cual se introducen uno o más codones de parada de la traducción en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente. Los codones de parada de la traducción son TGA (UGA en el ARNm), TAA (UAA) y TAG (UAG). De este modo, cualquier mutación (supresión, inserción o sustitución) que conduzca a la generación de un codón de parada en el marco en la secuencia codificante dará como resultado la terminación de la traducción y el truncamiento de la cadena de aminoácidos. Un alelo *IND* mutante que comprende una mutación sin sentido puede ser un alelo *IND* en el que se introduce un codón de parada en el marco en la secuencia del codón *IND* mediante una sustitución de un solo nucleótido, tal como la mutación de CAG a TAG, TGG a TAG, TGG a TGA, o CAA a TAA. Un alelo *IND* mutante que comprende una mutación sin sentido también puede ser un alelo *IND* en el que se introduce un codón de parada en el marco en la secuencia del codón *IND* mediante sustituciones de dos nucleótidos, tales como la mutación de CAG a TAA, TGG a TAA, o CGG a TAG o TGA. Un alelo *IND* mutante que comprende una mutación sin sentido también puede ser un alelo *IND* en el que se introduce un codón de parada en el marco en la secuencia del codón *IND* mediante sustituciones de tres nucleótidos, tal como la mutación de CGG a TAA. La proteína truncada carece de los aminoácidos codificados por el ADN codificante en dirección 3' de la mutación (es decir, la parte C-terminal de la proteína *IND*), y mantiene los aminoácidos codificados por el ADN codificante en dirección 5' de la mutación (es decir, la parte N-terminal de la proteína *IND*). Un alelo *IND* mutante que comprende una mutación sin sentido también puede ser un alelo *IND* en el que la mutación sin sentido está presente en cualquier parte delante del resto de Leu conservado del dominio H2 (en la posición 56 en la secuencia del dominio de bHLH de consenso como describen Heim et al., 2003, véase anteriormente), de manera que falta al menos el resto de Leu conservado. Cuanto más truncada esté la proteína *IND* mutante en comparación con la proteína *IND* de tipo salvaje, mejor puede el truncamiento dar como resultado una actividad significativamente reducida o ninguna actividad de la proteína *IND*. De este modo, se describe (véase la Tabla 1) un alelo *IND* mutante que comprende una mutación sin sentido que da como resultado una proteína

ES 2 543 425 T3

5 truncada de menos de alrededor de 170 aminoácidos (que carece de Leu conservado), menos de alrededor de 150 aminoácidos (que carece del dominio H2), menos de alrededor de 145 aminoácidos (que carece de los dominios L y H2), menos de alrededor de 130 aminoácidos (que carece del dominio HLH), menos de alrededor de 115 aminoácidos (que carece del dominio bHLH), o incluso menos aminoácidos de longitud, tales como alelos *IND* mutantes que corresponden a los alelos *ind-4* o *ind-5* de *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2004, más arriba).

Las Tablas aquí más abajo describen un intervalo de posibles mutaciones sin sentido en las secuencias *IND* de *Brassica napus* descritas aquí:

Tabla 2a Mutaciones de codones de PARADA potenciales en *IND-A1* (SEC ID NO: 1)

Posición de aminoácidos	de	Posición de nucleótido	Tipo salvaje → codón mutante	Tipo salvaje → aminoácido mutante
25		74	tgg → tag	TRP → STOP
		75	tgg → tga	TRP → STOP
		74+75	tgg → taa	TRP → STOP
57		169	cag → tag	GLN → STOP
		169+171	cag → taa	GLN → STOP
91		271	caa → taa	GLN → STOP
98		292	cag → tag	GLN → STOP
		292+294	cag → taa	GLN → STOP
122		364	cag → tag	GLN → STOP (1)
		364+366	cag → taa	GLN → STOP
128		382+383	cgg → tag	ARG → STOP
		382+384	cgg → tga	ARG → STOP
		382+383+384	cgg → taa	ARG → STOP
138		412+413	cgg → tag	ARG → STOP
		412+414	cgg → tga	ARG → STOP
		412+413+414	cgg → taa	ARG → STOP
168		502+503	cgg → tag	ARG → STOP
		502+504	cgg → tga	ARG → STOP
		502+503+504	cgg → taa	ARG → STOP
169		505	cag → tag	GLN → STOP
		505+507	cag → taa	GLN → STOP
181		542	tgg → tag	TRP → STOP
		543	tgg → tga	TRP → STOP
		542+543	tgg → taa	TRP → STOP

10 (1) Las semillas que comprenden un alelo *IND-A1* mutante que comprende esta mutación sin sentido (denominadas en lo sucesivo *ind-a1-EMS01*) se han depositado en la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, US) el 20 de noviembre de 2007, con el número de acceso PTA-8796

Tabla 2b Mutaciones de codones de PARADA potenciales en *IND-C1* (SEC ID NO: 3)

ES 2 543 425 T3

Posición de aminoácidos	Posición de nucleótido	Tipo salvaje → codón mutante	Tipo salvaje → aminoácido mutante
41	122	tgg → <u>tag</u>	TRP → STOP
	123	tgg → <u>tga</u>	TRP → STOP
	122+123	tgg → <u>taa</u>	TRP → STOP
50	148	<u>caa</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP (2)
73	271	<u>cag</u> → <u>tag</u>	GLN → STOP
	271+272	<u>cag</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP
104	310	<u>caa</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP
111	331	<u>cag</u> → <u>tag</u>	GLN → STOP
	331+333	<u>cag</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP
135	403	<u>cag</u> → <u>tag</u>	GLN → STOP (3)
	403+405	<u>cag</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP
141	421+422	<u>cgg</u> → <u>tag</u>	ARG → STOP
	421+423	<u>cgg</u> → <u>tga</u>	ARG → STOP
	421+422+423	<u>cgg</u> → <u>taa</u>	ARG → STOP
151	451+452	<u>cgg</u> → <u>tag</u>	ARG → STOP
	451+453	<u>cgg</u> → <u>tga</u>	ARG → STOP
	451+452+453	<u>cgg</u> → <u>taa</u>	ARG → STOP
181	541+542	<u>cgg</u> → <u>tag</u>	ARG → STOP
	541+543	<u>cgg</u> → <u>tga</u>	ARG → STOP
	541+542+543	<u>cgg</u> → <u>taa</u>	ARG → STOP
182	544	<u>cag</u> → <u>tag</u>	GLN → STOP
	544+546	<u>cag</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP
187	559	<u>cag</u> → <u>tag</u>	GLN → STOP
	559+561	<u>cag</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP
191	571	<u>cag</u> → <u>tag</u>	GLN → STOP
	571+573	<u>cag</u> → <u>taa</u>	GLN → STOP

(2) Las semillas que comprenden un alelo IND-C1 mutante que comprende esta mutación sin sentido (denominadas en lo sucesivo *ind-c1-EMS01*) se han depositado en la ATCC el 20 de noviembre de 2007, con el número de acceso PTA-8796

5 (3) Las semillas que comprenden un alelo IND-C1 mutante que comprende esta mutación sin sentido (denominadas en lo sucesivo *ind-c1-EMS03*) se han depositado en la ATCC el 20 de noviembre de 2007, con el número de acceso PTA-8795

Obviamente, las mutaciones no están limitadas a las mostradas en las tablas anteriores, y se entiende que pueden estar presentes mutaciones de PARADA análogas en alelos *ind* distintas de las presentadas en el listado de secuencias y citadas en las tablas anteriores.

10 Una mutación de sentido erróneo en un alelo *IND*, como se usa aquí, es cualquier mutación (supresión, inserción o sustitución) en un alelo *IND* mediante la cual se cambian uno o más codones en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente, dando como resultado la sustitución de uno

o más aminoácidos en la proteína IND de tipo salvaje por uno o más aminoácidos distintos en la proteína IND mutante. Es adecuado para la invención un alelo *IND* mutante que comprende una mutación de sentido erróneo en la que uno o más de los aminoácidos conservados indicados anteriormente o en la Tabla 1 es/están sustituidos. Como se indica anteriormente, algunos de los aminoácidos conservados son más críticos para la actividad biológica de la proteína IND que otros. De este modo, es más probable que las mutaciones de sentido erróneo que dan como resultado la sustitución de, por ejemplo, los aminoácidos en la posición 5, 9, y 13, o en las posiciones 10 y 12 de la secuencia del dominio de bHLH de consenso definida por Heim et al. (más arriba), den como resultado una actividad significativamente reducida o ninguna actividad, debido a una capacidad reducida para unirse al ADN diana, de la proteína IND. De forma similar, es más probable que las mutaciones de sentido erróneo que dan como resultado la sustitución de, por ejemplo, los aminoácidos en la posición 16, 20, 23, 27 en la hélice 1 o en las posiciones 36, 39, 43, 49, 53, y 56 en la hélice 2 de la secuencia del dominio de bHLH de consenso definida por Heim et al. (más arriba) den como resultado una actividad significativamente reducida o ninguna actividad, debido a una capacidad de dimerización reducida, de la proteína IND. Las semillas que comprenden un alelo IND-A1 mutante que comprende una mutación de sentido erróneo que provoca la sustitución del resto Arg en la posición 10 de la secuencia de dominio de bHLH de consenso definida por Heim et al. (más arriba) por un resto His (denominado en lo sucesivo *ind-a1-EMS05*) se han depositado en la ATCC el 20 de noviembre de 2007, con el número de acceso PTA-8795. Un alelo *IND* mutante que comprende una mutación de sentido erróneo también puede ser un alelo *IND* que comprende una mutación de sentido erróneo que corresponde a la mutación de sentido erróneo en los alelos *ind-1* o *ind-3* de *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2004, más arriba) (véase la Tabla 1).

Una mutación de desplazamiento del marco de lectura en un alelo *IND*, como se usa aquí, es una mutación (supresión, inserción duplicación y similar) en un alelo *IND* que da como resultado que la secuencia de ácido nucleico sea traducida en un marco diferente en dirección 3' de la mutación. Un alelo *IND* mutante que comprende una mutación de desplazamiento del marco de lectura puede ser un alelo *IND* que comprende una mutación de desplazamiento del marco de lectura que corresponde a la mutación de desplazamiento del marco de lectura en el alelo *ind-2* de *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2004, más arriba), en la que se suprime un solo nucleótido en el codón 26, que da como resultado un desplazamiento del marco de lectura y la producción de una proteína truncada de 35 aminoácidos (según Liljegren et al., 2004, más arriba). También es adecuado para la invención un alelo *IND* mutante que comprende una mutación de desplazamiento del marco de lectura que es un alelo *IND* que comprende una mutación de desplazamiento del marco de lectura que corresponde a la mutación de desplazamiento del marco de lectura en el alelo *ind-6* de *Arabidopsis* (Wu et al., 2006, más arriba), en la que se inserta un transposón Ds tras el nucleótido 183 provocando una duplicación de 8 nucleótidos en el sitio de inserción, o a los alelos *ind* de *Arabidopsis* revertientes correspondientes (véase Wu et al., 2006, más arriba, Fig. 1a).

Secuencias de aminoácidos

Se describen tanto secuencias de aminoácidos IND (funcionales) de tipo salvaje como secuencias de aminoácidos IND mutantes (que comprenden una o más mutaciones, preferiblemente mutaciones que dan como resultado una actividad biológica significativamente reducida o ninguna actividad biológica de la proteína IND) de *Brassicaceae*, particularmente de especies de *Brassica*, especialmente de *Brassica napus*, pero también de otras especies de cultivo de *Brassica*. , por ejemplo, las especies de *Brassica* que comprenden un genoma A y/o un genoma C pueden codificar diferentes aminoácidos IND-A o IND-C. Además, se pueden usar métodos de mutagénesis para generar mutaciones en alelos *IND* de tipo salvaje, generando de ese modo alelos mutantes que pueden codificar otras proteínas IND mutantes. Las secuencias de aminoácidos IND de tipo salvaje y/o mutantes se describen en una planta de *Brassica* (es decir, endógenamente). Sin embargo, también se describen aquí secuencias de aminoácidos IND aisladas (, por ejemplo, aisladas de la planta u obtenidas sintéticamente), así como sus variantes y fragmentos de cualquiera de estas.

Las secuencias de aminoácidos de proteínas IND-A1 e IND-C1 se han aislado de *Brassica napus* como se da a conocer en el listado de secuencias. Se dan las secuencias *IND* de tipo salvaje, mientras que las secuencias *IND* mutantes de estas secuencias, y de secuencias esencialmente similares a estas, se describen aquí más abajo, con referencia a las secuencias *IND* de tipo salvaje.

Como se describe anteriormente, las proteínas IND de *Brassica* descritas aquí tienen alrededor de 185-210 aminoácidos de longitud, y comprenden un número de dominios estructurales y funcionales.

“Secuencias de aminoácidos IND-A1” o “secuencias de aminoácidos variantes IND-A1”, según la invención, son secuencias de aminoácidos que tienen al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2. Estas secuencias de aminoácidos también se pueden citar como “esencialmente similares” o “esencialmente idénticas” a las secuencias *IND* proporcionadas en el listado de secuencias.

“Secuencias de aminoácidos IND-C1” o “secuencias de aminoácidos variantes IND-C1”, según la invención, son secuencias de aminoácidos que tienen al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 4 (IND-C1-larga) o con SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 al aminoácido en la posición 210 (IND-C1-corta). Estas secuencias de

aminoácidos también se pueden citar como “esencialmente similares” o “esencialmente idénticas” a las secuencias *IND* proporcionadas en el listado de secuencias.

De este modo, son adecuadas para la invención tanto secuencias de aminoácidos de proteínas *IND-A1* e *IND-C1* funcionales, de tipo salvaje, incluyendo variantes y fragmentos de las mismas (como se define adicionalmente más abajo), así como secuencias de aminoácidos mutantes de cualquiera de estas, mediante lo cual la mutación en la secuencia de aminoácidos da preferiblemente como resultado una reducción significativa en o una supresión completa de la actividad biológica de la proteína *IND* en comparación con la actividad biológica de la proteína *IND* de tipo salvaje correspondiente. Una reducción significativa en o la supresión completa de la actividad biológica de la proteína *IND* se refiere aquí a una reducción en o a la supresión de la actividad de unión a ADN, la capacidad de dimerización y/o la actividad reguladora transcripcional de la proteína *IND*, de manera que se incrementa la resistencia al desgranado de las vainas de una planta que expresa la proteína *IND* mutante en comparación con una planta que expresa la proteína *IND* de tipo salvaje correspondiente en comparación con la resistencia al desgranado de las vainas de una planta de tipo salvaje correspondiente.

Se describen aquí secuencias de aminoácidos tanto endógenas como aisladas. También se describen fragmentos de las secuencias de aminoácidos *IND* y secuencias de aminoácidos variantes *IND* definidas anteriormente. Un “fragmento” de una secuencia de aminoácidos *IND* o variante de la misma (como se define), puede ser de diversas longitudes, tales como al menos 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 150, 175, 180 aminoácidos contiguos de la secuencia *IND* (o de la secuencia variante).

Secuencias de aminoácidos de proteínas *IND* funcionales

Las secuencias de aminoácidos dadas en el listado de secuencias son proteínas *IND* funcionales, de tipo salvaje, procedentes de *Brassica napus*. De este modo, estas secuencias son endógenas a las plantas de *Brassica napus* de las que se aislaron. Se pueden identificar otras especies de cultivo, variedades, líneas de reproducción o accesos salvajes de *Brassica* en busca de otras proteínas *IND* funcionales, con las mismas secuencias de aminoácidos o sus variantes, como se describe anteriormente.

Además, se entiende que las secuencias de aminoácidos *IND* y sus variantes (o fragmentos de cualquiera de estas) se pueden identificar *in silico*, identificando bases de datos de aminoácidos en busca de secuencias esencialmente similares. También se describen fragmentos de moléculas de aminoácidos adecuados para la invención. Los fragmentos incluyen secuencias de aminoácidos del dominio de bHLH, o fragmentos más pequeños que comprenden parte del dominio de bHLH, tal como el dominio básico o el dominio HLH, etc.

Secuencias de aminoácidos de proteínas *IND* mutantes

Las secuencias de aminoácidos que comprenden una o más supresiones, inserciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos de tipo salvaje son adecuadas para la invención, como lo son los fragmentos de tales moléculas de aminoácidos mutantes. Tales secuencias de aminoácidos mutantes se pueden generar y/o identificar usando diversos métodos conocidos, como se describe anteriormente. Nuevamente, tales moléculas de aminoácidos son adecuadas tanto en forma endógena como en forma aislada.

La mutación o mutaciones en la secuencia de aminoácidos puede dar como resultado una actividad biológica significativamente reducida o completamente suprimida de la proteína *IND* con respecto a la proteína de tipo salvaje. Como se describe anteriormente, básicamente, cualquier mutación que dé como resultado una proteína que comprende al menos una inserción, supresión y/o sustitución de aminoácidos con respecto a la proteína de tipo salvaje puede conducir a actividad biológica significativamente reducida o a ninguna actividad biológica. Sin embargo, se entiende que es más probable que las mutaciones en ciertas partes de la proteína den como resultado una función reducida de la proteína *IND* mutante, conduciendo tales mutaciones a proteínas truncadas, mediante lo cual porciones significativas de los dominios funcionales, tales como el dominio de unión a ADN (“b”), el dominio de dimerización (“HLH”) y/o aminoácidos que son importantes en la regulación de la transcripción (véase la Tabla 1), faltan o están sustituidos.

De este modo, se describen proteínas *IND* mutantes que comprenden una o más mutaciones de supresión o de inserción, con lo que la supresión o supresiones o inserción o inserciones dan como resultado una proteína mutante que tiene actividad significativamente reducida o ninguna actividad *in vivo*. Tales proteínas *IND* mutantes son proteínas *IND* en las que al menos 1, al menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 100, 150, 175, 180 o más aminoácidos están suprimidos o insertados en comparación con la proteína *IND* de tipo salvaje, con lo que la supresión o supresiones o inserción o inserciones dan como resultado una proteína mutante que tiene actividad significativamente reducida o ninguna actividad *in vivo*.

Además, se describen proteínas *IND* mutantes que están truncadas, con lo que el truncamiento da como resultado una proteína mutante que tiene actividad significativamente reducida o ninguna actividad *in vivo*. Tales proteínas *IND* truncadas son proteínas *IND* que carecen de dominios funcionales en la parte C-terminal de la proteína *IND* de tipo salvaje correspondiente y que mantienen la parte N-terminal de la proteína *IND* de tipo salvaje correspondiente. De este modo, se describe una proteína *IND* truncada que comprende la parte N-terminal de la proteína *IND* de tipo salvaje correspondiente hasta, pero sin incluir, el resto de Leu conservado del dominio H2 (en la posición 56 en la

secuencia del dominio de bHLH de consenso como describen Heim et al., 2003, véase anteriormente). Cuanto más truncada está la proteína mutante en comparación con la proteína de tipo salvaje, más puede el truncamiento dar como resultado una actividad significativamente reducida o ninguna actividad de la proteína IND. De este modo, se describe (véase la Tabla anterior) una proteína IND truncada que comprende la parte N-terminal de la proteína IND de tipo salvaje correspondiente que carece de parte o de todo el dominio de la segunda H, y/o que carece de parte o de todo el dominio de L, y/o que carece de parte o de todo el dominio de la primera H, y/o que carece de parte o de todo el dominio básico (como se describe anteriormente), o incluso más aminoácidos.

Además, se describen proteínas IND mutantes que comprenden una o más mutaciones de sustitución, mediante las cuales la sustitución o sustituciones dan como resultado una proteína mutante que tiene actividad significativamente reducida o ninguna actividad *in vivo*. Tales proteínas IND mutantes son proteínas IND por cuyo medio se sustituyen restos de aminoácidos conservados que tienen una función específica, tal como una función en la unión a ADN, dimerización o regulación de la transcripción. De este modo, se describe una proteína IND mutante que comprende una sustitución de un resto de aminoácido conservado que tiene una función biológica, tales como los aminoácidos conservados del dominio básico, o del dominio H1, L o H2 como se indica en la Tabla 1 anterior.

Métodos

Los alelos *ind* mutantes se pueden generar (por ejemplo se pueden inducir mediante mutagénesis) y/o identificar usando un intervalo de métodos, que son convencionales en la técnica, por ejemplo, usando métodos a base de PCR para amplificar parte o todo el genómico o ADNc *ind*.

Tras la mutagénesis, las plantas se hacen crecer a partir de las semillas tratadas, o se regeneran a partir de las células tratadas usando técnicas conocidas. , por ejemplo, las semillas mutagenizadas se pueden sembrar según procedimientos de cultivo convencionales y, tras la autopolinización, se forma la semilla en las plantas. Como alternativa, se pueden extraer plántulas doblemente haploides a partir de células de microsporas o de polen tratadas para formar inmediatamente plantas homocigóticas, por ejemplo, como describen Coventry et al. (1988, Manual for Microspore Culture Technique for *Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). La semilla adicional que se forma como resultado de tal autopolinización en la presente o en una generación subsiguiente se puede cosechar e identificar en busca de la presencia de alelos *IND* mutantes, usando técnicas que son convencionales en la técnica, por ejemplo, técnicas a base de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (amplificación de los alelos *ind*) o técnicas a base de hibridación, , por ejemplo, análisis de transferencia Southern, identificación de genotecas BAC, y similares, y/o secuenciación directa de alelos *ind*. Para identificar la presencia de mutaciones de punto (denominadas polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs) en alelos *IND* mutantes, se pueden usar métodos de detección de SNP convencionales en la técnica, por ejemplo, técnicas basadas en oligoligación, técnicas basadas en extensión de una sola base, o técnicas basadas en diferencias en sitios de restricción, tales como TILLING.

Como se describe anteriormente, la mutagenización (espontánea así como también inducida) de un alelo *IND* de tipo salvaje específico da como resultado la presencia de uno o más nucleótidos suprimidos, insertados, o sustituidos (en lo sucesivo denominada "región de mutación") en el alelo *IND* mutante resultante. El alelo *IND* mutante se puede caracterizar así por la localización y la configuración del uno o más nucleótidos suprimidos, insertados, o sustituidos en el alelo *IND* de tipo salvaje. El sitio en el alelo *IND* de tipo salvaje, en el que se han insertado, suprimido, o sustituido el uno o más nucleótidos, respectivamente, se denomina también aquí como la "región o secuencia de mutación". Una "región o secuencia de flaqueo en 5' o en 3'", como se usa aquí, se refiere a una región de ADN o secuencia en el alelo *IND* mutante (o el tipo salvaje correspondiente) de al menos 20 pb, preferiblemente al menos 50 pb, al menos 750 pb, al menos 1500 pb, y hasta 5000 pb de ADN diferente del ADN que contiene el uno o más nucleótidos suprimidos, insertados, o sustituidos, preferiblemente ADN del alelo *IND* mutante (o el tipo salvaje correspondiente) que está situado inmediatamente en dirección 5' de o contiguo a (región o secuencia de flaqueo en 5'") o inmediatamente en dirección 3' de y contiguo a (región o secuencia de flaqueo en 3'") la región de mutación en el alelo *IND* mutante (o en el alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente). Una "región de unión", como se usa aquí, se refiere a una región de ADN en el alelo *IND* mutante (o el tipo salvaje correspondiente) en el que la región de mutación y la región de flaqueo en 5' o en 3' están enlazadas entre sí. Una "secuencia que abarca la región de unión entre la región de mutación y la región de flaqueo en 5' o en 3' comprende de este modo una secuencia de mutación así como la secuencia de flaqueo contigua con ella.

Las herramientas desarrolladas para identificar un alelo *IND* mutante específico o la planta o el material vegetal que comprende un alelo *IND* mutante específico, o productos que comprenden material vegetal que comprende un alelo *IND* mutante específico, se basan en las características genómicas específicas del alelo *IND* mutante específico en comparación con las características genómicas del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente, tales como un mapa de restricción específico de la región genómica que comprende la región de mutación, marcadores moleculares o la secuencia de las regiones de flaqueo y/o de mutación.

Una vez que se ha secuenciado un alelo *IND* mutante específico, se pueden desarrollar cebadores y sondas que reconocen específicamente una secuencia con las regiones de flaqueo en 5', de flaqueo 3' y/o de mutación del alelo *IND* mutante en el ácido nucleico (ADN o ARN) de una muestra por medio de una técnica de biología molecular. , por ejemplo, se puede desarrollar un método de PCR para identificar el alelo *IND* mutante en muestras

biológicas (tales como muestras de plantas, material vegetal o productos que comprenden material vegetal). Tal PCR se basa en al menos dos “cebadores” específicos: uno que reconoce una secuencia en la región de flanco en 5’ o en 3’ del alelo *IND* mutante y el otro que reconoce una secuencia en la región de flanco en 3’ o en 5’ del alelo *IND* mutante, respectivamente; o uno que reconoce una secuencia en la región de flanco en 5’ o 3’ del alelo *IND* mutante y el otro que reconoce una secuencia en la región de mutación del alelo *IND* mutante; o uno que reconoce una secuencia en una región de flanco en 5’ o en 3’ del alelo *IND* mutante y el otro que reconoce una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flanco en 3’ o en 5’ y la región de mutación del alelo *IND* mutante específico (como se describe adicionalmente más abajo), respectivamente.

Los cebadores tienen preferiblemente una secuencia de entre 15 y 35 nucleótidos que, en condiciones de PCR optimizadas, “reconocen específicamente” una secuencia en la región de flanco en 5’ o en 3’, una secuencia en la región de mutación, o una secuencia que abarca la región de unión entre las regiones de flanco en 3’ o en 5’ y las regiones de mutación del alelo *IND* mutante específico, de manera que se amplifica un fragmento específico (“fragmento específico *IND* mutante” o amplicón discriminante) a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende el alelo *IND* mutante específico. Esto significa que solo el alelo *IND* mutante seleccionado como diana, y ninguna otra secuencia en el genoma vegetal, se amplifica en condiciones de PCR optimizadas.

Los cebadores de la PCR adecuados para la invención pueden ser los siguientes:

- oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 200 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de flanco en 5’ o en 3’ de un alelo *IND* mutante específico o su complemento (es decir, por ejemplo, la secuencia que flanquea en 5’ o en 3’ el uno o más nucleótidos suprimidos, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención, tal como la secuencia que flanquea en 5’ o en 3’ las mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento del marco de lectura descritas anteriormente, o la secuencia que flanquea en 5’ o en 3’ las mutaciones de codones de PARADA indicadas en las Tablas anteriores o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente o su complemento) (cebadores que reconocen secuencias de flanco en 5’); o
- oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta alrededor de 200 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos seleccionada de la secuencia de la región de mutación de un alelo *IND* mutante específico o su complemento (es decir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos insertados o sustituidos en los genes *IND* de la invención o su complemento) (cebadores que reconocen secuencias de mutación).

Por supuesto, los cebadores pueden ser más largos que los mencionados 17 nucleótidos consecutivos, y pueden tener, por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de longitud o incluso más largos. Los cebadores pueden consistir totalmente en una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias nucleotídicas mencionadas de secuencias de flanco y de mutación. Sin embargo, la secuencia nucleotídica de los cebadores en su extremo 5’ (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos situados en 3’) es menos crítica. De este modo, la secuencia en 5’ de los cebadores puede consistir en una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias de flanco o de mutación, según sea apropiado, pero pueden contener varios (por ejemplo 1, 2, 5, 10) desemparejamientos. La secuencia en 5’ de los cebadores puede consistir incluso totalmente de una secuencia nucleotídica no relacionada con las secuencias de flanco o de mutación, tal como por ejemplo una secuencia nucleotídica que representa sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Tales secuencias no relacionadas o secuencias de ADN de flanco con desemparejamientos preferiblemente no deberían ser más largas que 100, más preferiblemente no más largas que 50 o incluso 25 nucleótidos.

Además, los cebadores adecuados pueden comprender o consistir en una secuencia nucleotídica que abarca la región de unión entre las secuencias de flanco y de mutación (es decir, por ejemplo, la región de unión entre una secuencia que flanquea en 5’ o en 3’ uno o más nucleótidos suprimidos, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención y la secuencia del uno o más nucleótidos insertados o sustituidos o la secuencia que flanquea en 3’ o en 5’, respectivamente, el uno o más nucleótidos suprimidos, tal como la región de unión entre una secuencia que flanquea en 5’ o en 3’ mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento del marco de lectura, o la región de unión entre una secuencia que flanquea en 5’ o en 3’ una mutación de codón de PARADA potencial como se indica en las Tablas anteriores o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente y la secuencia de la mutación de codón de PARADA potencial o las mutaciones de sustitución, respectivamente), con la condición de que la secuencia nucleotídica no derive exclusivamente de la región de mutación o de las regiones de flanco.

También será inmediatamente evidente para el experto que los pares de cebadores de PCR apropiadamente seleccionados no deberían de comprender tampoco secuencias complementarias entre sí.

Para los fines de la invención, el “complemento de una secuencia nucleotídica representada en SEC ID No: X” es la secuencia nucleotídica que puede derivar de la secuencia nucleotídica representada sustituyendo los nucleótidos por su nucleótido complementario según las reglas de Chargaff rules ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) y leyendo la secuencia en la dirección 5’ a 3’, es decir, en dirección opuesta de la secuencia nucleotídica representada.

En los Ejemplos se describen ejemplos de cebadores adecuados para identificar alelos *IND* mutantes específicos.

Como se usa aquí, "la secuencia nucleotídica de SEC ID No. Z desde la posición X hasta la posición Y" indica la secuencia nucleotídica que incluye ambos extremos nucleotídicos.

5 Preferiblemente, el fragmento amplificado tiene una longitud de entre 50 y 1000 nucleótidos, tal como una longitud entre 50 y 500 nucleótidos, o una longitud entre 100 y 350 nucleótidos. Los cebadores específicos pueden tener una secuencia que es entre 80 y 100% idéntica a una secuencia en la región de flanqueo en 5' o en 3', a una secuencia en la región de mutación, o a una secuencia que abarca la región de unión entre las regiones de flanqueo en 3' o en 5' y de mutación del alelo *IND* mutante específico, con la condición de que los desemparejamientos todavía permitan la identificación específica del alelo *IND* mutante específico con estos cebadores en condiciones de PCR optimizadas. Sin embargo, el intervalo de desemparejamientos permisibles se puede determinar fácilmente de forma experimental, y es conocido por una persona experta en la técnica.

15 La detección y/o identificación de un "fragmento específico *IND* mutante" se puede producir de diversas maneras, por ejemplo, vía estimación del tamaño tras electroforesis en gel o capilar, o vía métodos de detección a base de fluorescencia. Los fragmentos específicos *IND* mutantes también se pueden secuenciar directamente. Otros métodos específicos de secuencias para la detección de fragmentos de ADN amplificados son también conocidos en la técnica.

Los protocolos de PCR estándar se describen en la técnica, tal como en "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2ª Edición, 1999) y otras referencias. Las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo la secuencia de los cebadores específicos, se especifica en un "protocolo de identificación de PCR" para cada alelo *IND* mutante específico. Sin embargo, se entiende que puede ser necesario ajustar un número de parámetros en el protocolo de identificación de PCR a las condiciones específicas de laboratorio, y se pueden modificar ligeramente para obtener resultados similares. , por ejemplo, el uso de un método diferente para la preparación de ADN puede requerir el ajuste de, por ejemplo, la cantidad de cebadores, polimerasa, concentración de MgCl₂ o las condiciones de recombinación usadas. De forma similar, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación de PCR. Sin embargo, estos ajustes serán manifiestos para una persona experta en la técnica, y se detallan además en manuales actuales de aplicación de PCR tal como el citado anteriormente.

En los Ejemplos se describen ejemplos de protocolos de identificación de PCR para identificar alelos *IND* mutantes específicos.

30 Como alternativa, los cebadores específicos se pueden usar para amplificar un fragmento específico *IND* mutante que se puede usar como una "sonda específica" para identificar un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas. La puesta en contacto de ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, en las condiciones que permiten la hibridación de la sonda con su fragmento correspondiente en el ácido nucleico, da como resultado la formación de un híbrido de ácido nucleico/sonda. La formación de este híbrido se puede detectar (, por ejemplo, marcando el ácido nucleico o la sonda), por lo cual la formación de este híbrido indica la presencia de un alelo *IND* mutante específico. Tales métodos de identificación basados en la hibridación con una sonda específica (ya sea sobre un soporte en fase sólida o en disolución) se han descrito en la técnica. La sonda específica es preferiblemente una secuencia que, en condiciones optimizadas, se hibrida específicamente a una región en la región de flanqueo en 5' o en 3' y/o en la región de mutación del alelo *IND* mutante específico (en lo sucesivo denominada como "región específica *IND* mutante"). Preferiblemente, la sonda específica comprende una secuencia de entre 10 y 1000 pb, 50 y 600 pb, entre 100 y 500 pb, entre 150 y 350 pb, que es al menos 80%, preferiblemente entre 80 y 85%, más preferiblemente entre 85 y 90%, especialmente de forma preferible entre 90 y 95%, lo más preferible entre 95% y 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia nucleotídica de una región específica. Preferiblemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de alrededor de 13 a alrededor de 100 nucleótidos contiguos idéntica (o complementaria) a una región específica del alelo *IND* mutante específico.

45 Las sondas específicas adecuadas para la invención pueden ser las siguientes:

- oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 13 nt hasta alrededor de 1000 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionada de la secuencia de flanqueo en 5' o en 3' de un alelo *IND* mutante específico o el complemento de la misma (es decir, por ejemplo, la secuencia que flanquea en 5' o en 3' el uno o más nucleótidos suprimidos, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención, tal como la secuencia que flanquea en 5' o en 3' las mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento del marco de lectura descritas anteriormente, o la secuencia que flanquea en 5' o en 3' las mutaciones de codón de PARADA potenciales indicadas en las Tablas anteriores, o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente), o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella (sondas que reconocen secuencias de flanqueo en 5'); o
- 55 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 13 nt hasta alrededor de 1000 nt, que comprenden una secuencia nucleotídica de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación de un alelo *IND* mutante específico o el complemento de la misma (es decir, por ejemplo, la secuencia de

nucleótidos insertados o sustituidos en los genes *IND* de la invención, o su complemento), o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con ella (sondas que reconocen secuencias de mutación).

Las sondas pueden consistir totalmente en una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias nucleotídicas mencionadas de secuencias de flanqueo y de mutación. Sin embargo, la secuencia nucleotídica de las sondas en sus extremos 5' o 3' es menos crítica. De este modo, las secuencias en 5' o en 3' de las sondas pueden consistir en una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias de flanqueo o de mutación, según sea apropiado, pero pueden consistir en una secuencia nucleotídica no relacionada con las secuencias de flanqueo o de mutación. Tales secuencias no relacionadas preferiblemente no deberían ser más largas que 50, más preferiblemente no más largas que 25, o incluso no más largas que 20 o 15 nucleótidos.

Además, las sondas adecuadas pueden comprender o consistir en una secuencia nucleotídica que abarca la región de unión entre secuencias de flanqueo y de mutación (es decir, por ejemplo, la región de unión entre una secuencia que flanquea en 5' o en 3' uno o más nucleótidos suprimidos, insertados o sustituidos en los alelos *IND* mutantes de la invención y la secuencia de uno o más nucleótidos insertados o sustituidos o la secuencia que flanquea en 3' o en 5', respectivamente, el uno o más nucleótidos suprimidos, tal como la región de unión entre una secuencia que flanquea en 5' o en 3' mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento del marco de lectura en los genes *IND* de la invención descrita anteriormente y la secuencia de las mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento del marco de lectura, o la región de unión entre una secuencia que flanquea en 5' o en 3' una mutación de codón de PARADA potencial como se indica en las Tablas anteriores o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente y la secuencia de la mutación de codón de PARADA potencial o de sustitución, respectivamente), con la condición de que la secuencia nucleotídica mencionada no derive exclusivamente de la región de mutación o de las regiones de flanqueo.

En los Ejemplos se describen ejemplos de sondas específicas adecuadas para identificar alelos *IND* mutantes específicos.

La detección y/o identificación de una "región específica *IND* mutante" que se hibrida a una sonda específica se puede producir de diversas maneras, por ejemplo, vía estimación del tamaño tras electroforesis en gel o vía métodos de detección basados en fluorescencia. Otros métodos específicos de secuencias para la detección de una "región específica *IND* mutante" que se hibrida a una sonda específica son también conocidos en la técnica.

Como alternativa, las plantas o partes vegetales que comprenden uno o más alelos *ind* mutantes se pueden generar e identificar usando otros métodos, tal como el método "Delete-a-gene™" que usa PCR para identificar mutantes de supresión generados mediante mutagénesis por neutrones rápidos (revisado por Li y Zhang, 2002, *Funct Integr Genomics* 2:254-258), mediante el método de TILLING (lesiones locales inducidas dirigidas en genomas) que identifica mutaciones de punto inducidas por EMS usando cromatografía de líquidos de altas prestaciones desnaturizante (DHPLC) para detectar cambios de pares de bases mediante análisis de heterodúplex (McCallum et al., 2000, *Nat Biotech* 18:455, y McCallum et al. 2000, *Plant Physiol.* 123, 439-442), etc. Como se mencionó, TILLING usa una identificación de alto rendimiento para mutaciones (, por ejemplo, usando la escisión *Cel 1* de heterodúplex de ADN mutantes-tipo salvaje, y la detección usando un sistema de gel de secuenciación). De este modo, se engloba aquí el uso de TILLING para identificar plantas o partes vegetales que comprenden uno o más alelos *ind* mutantes y métodos para generar e identificar tales plantas, órganos, tejidos y semillas de plantas. De este modo, el método como se describe aquí puede comprender las etapas de mutagenizar semillas de plantas (, por ejemplo, mutagénesis mediante EMS), reunir los individuos vegetales o ADN, amplificar mediante PCR una región de interés, formar los heterodúplex y realizar la detección de alto rendimiento, identificar la planta mutante, secuenciar el producto de la PCR mutante. Se entiende que igualmente se pueden usar otros métodos de mutagénesis y selección para generar tales plantas mutantes.

En lugar de inducir mutaciones en alelos *IND*, los alelos mutantes naturales (espontáneos) se pueden identificar mediante métodos conocidos en la técnica. , por ejemplo, se puede usar ECOTILLING (Henikoff et al. 2004, *Plant Physiology* 135(2):630-6) para identificar una pluralidad de plantas o partes vegetales en busca de la presencia de alelos *ind* mutantes naturales. Al igual que para las técnicas de mutagénesis anteriores, preferiblemente se identifican especies de *Brassica* que comprenden un genoma A y/o C, de manera que el alelo *ind* identificado se puede introducir subsiguientemente en otra especie de *Brassica*, tal como *Brassica napus*, mediante cruce (cruces inter- o intraespecíficos) y selección. En ECOTILLING, se identifican polimorfismos naturales en líneas de reproducción o especies relacionadas mediante la metodología de TILLING descrita anteriormente, en la que se usan individuos o conjuntos de plantas para la amplificación mediante PCR de la diana *ind*, la formación de los heterodúplex y el análisis de alto rendimiento. A esto le puede seguir la selección de plantas individuales que tienen una mutación requerida que se pueden usar subsiguientemente en un programa de reproducción para incorporar el alelo mutante deseado.

Los alelos mutantes identificados se pueden secuenciar entonces, y la secuencia se puede comparar con el alelo de tipo salvaje para identificar la mutación o mutaciones. Opcionalmente, la funcionalidad se puede evaluar como se indica anteriormente. Usando este enfoque, se puede identificar una pluralidad de alelos *ind* mutantes (y plantas de *Brassica* que comprenden uno o más de estos). Los alelos mutantes deseados se pueden combinar entonces con los alelos de tipo salvaje deseados mediante métodos de cruce y selección como se describe adicionalmente más

abajo. Finalmente, se genera una única planta que comprende el número deseado de alelos *ind* mutantes y el número deseado de alelos *IND* de tipo salvaje.

Los oligonucleótidos adecuados como cebadores de PCR o sondas específicas para detección de un alelo *IND* mutante específico también se pueden usar para desarrollar métodos para determinar el estado de cigosidad del alelo *IND* mutante específico.

Para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se puede desarrollar un ensayo a base de PCR para determinar la presencia de un alelo específico *IND* mutante y/o de tipo salvaje correspondiente.

Para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se pueden diseñar dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje de tal manera que se dirijan uno hacia el otro y tengan la región de mutación situada entre los cebadores. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente las secuencias de flanqueo en 5' y en 3', respectivamente. Este conjunto de cebadores permite la amplificación mediante PCR de diagnóstico simultánea del alelo *IND* mutante así como del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente.

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se pueden diseñar dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje de tal manera que se dirijan uno hacia otro y que uno de ellos reconozca específicamente la región de mutación. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente la secuencia de la región flanqueante en 5' o en 3' y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador que reconoce específicamente la secuencia de la región de mutación en el alelo *IND* mutante, permite la amplificación mediante PCR de diagnóstico simultánea del gen *IND* mutante así como del gen *IND* de tipo salvaje.

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se pueden diseñar dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *IND* de tipo salvaje de tal manera que se dirijan uno hacia otro y que uno de ellos reconozca específicamente la región de unión entre la región de flanqueo en 5' o en 3' y la región de mutación. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente la secuencia de flanqueo en 5' o en 3' y la región de unión entre la región de mutación y la región de flanqueo en 3' o en 5' del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente. Este conjunto de cebadores, junto con un tercer cebador que reconoce específicamente la región de unión entre la región de mutación y la región de flanqueo en 3' o en 5' del alelo *IND* mutante, respectivamente, permite la amplificación mediante PCR de diagnóstico simultánea del gen *IND* mutante así como del gen *IND* de tipo salvaje.

Como alternativa, el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico se puede determinar usando conjuntos de cebadores alternativos que reconocen específicamente alelos *IND* mutantes y de tipo salvaje.

Si la planta es homocigótica para el gen *IND* mutante o el gen *IND* de tipo salvaje correspondiente, los ensayos de PCR de diagnóstico descritos anteriormente darán lugar a un único producto de PCR típico, preferiblemente típico en longitud, para el alelo *IND* mutante o de tipo salvaje. Si la planta es heterocigótica para el alelo *IND* mutante, aparecerán dos productos de PCR específicos, que reflejan la amplificación tanto del alelo *IND* mutante como del de tipo salvaje.

La identificación de los productos de PCR específicos *IND* de tipo salvaje y mutante puede producirse, por ejemplo, mediante estimación del tamaño tras la electroforesis en gel o capilar (, por ejemplo, para alelos *IND* mutantes que comprenden un número de nucleótidos insertados o suprimidos que dan como resultado una diferencia de tamaños entre los fragmentos amplificados a partir del alelo *IND* de tipo salvaje y el alelo *IND* mutante, de manera que dichos fragmentos se pueden separar visiblemente en un gel); evaluando la presencia o ausencia de los dos fragmentos diferentes tras la electroforesis en gel o capilar, por lo que la amplificación mediante PCR de diagnóstico del alelo *IND* mutante se puede llevar a cabo, opcionalmente, de forma separada de la amplificación mediante PCR de diagnóstico del alelo *IND* de tipo salvaje; mediante secuenciación directa de los fragmentos amplificados; o mediante métodos de detección a base de fluorescencia.

En los Ejemplos se describen ejemplos de cebadores adecuados para determinar la cigosidad de alelos *IND* mutantes específicos.

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se puede desarrollar un ensayo a base de hibridación para determinar la presencia de un alelo específico *IND* mutante y/o de tipo salvaje correspondiente.

Para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se pueden diseñar dos sondas específicas que reconocen el alelo *IND* de tipo salvaje de tal manera que cada sonda reconoce específicamente una secuencia en el alelo de tipo salvaje *IND*, y que la región de mutación está situada entre las secuencias reconocidas por las sondas. Estas sondas pueden ser sondas que reconocen específicamente las secuencias de flanqueo en 5' y 3', respectivamente. El uso de una o, preferiblemente, ambas de estas sondas permite la hibridación de diagnóstico simultánea del alelo *IND* mutante así como del alelo *IND* de tipo salvaje correspondiente.

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se pueden diseñar dos sondas específicas que reconocen el alelo *IND* de tipo salvaje de tal manera que una de ellas reconoce específicamente una secuencia en el alelo de tipo salvaje *IND* en dirección 5' o en dirección 3' de la región de mutación, preferiblemente en dirección 5' de la región de mutación, y que una de ellas reconoce específicamente la región de mutación. Estas sondas pueden ser sondas que reconocen específicamente la secuencia de la región flanqueante en 5' o en 3', preferiblemente la región flanqueante en 5', y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje, respectivamente. El uso de una o, preferiblemente, ambas de estas sondas, opcionalmente junto con una tercera sonda que reconoce específicamente la secuencia de la región de mutación en el alelo *IND* mutante, permite la hibridación de diagnóstico del gen *IND* mutante y del de tipo salvaje.

Como alternativa, para determinar el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico, se puede diseñar una sonda específica que reconoce el alelo *IND* de tipo salvaje de tal manera que la sonda reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo en 5' o en 3', preferiblemente la región de flanqueo en 5', y la región de mutación del alelo *IND* de tipo salvaje. Esta sonda, opcionalmente junto con una segunda sonda que reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo en 5' o en 3', preferiblemente la región de flanqueo en 5', y la región de mutación del alelo *IND* mutante, permite la hibridación de diagnóstico del gen *IND* mutante y del de tipo salvaje.

Como alternativa, el estado de cigosidad de un alelo *IND* mutante específico se puede determinar usando conjuntos alternativos de sondas que reconocen específicamente alelos *IND* mutantes y de tipo salvaje.

Si la planta es homocigótica para el gen *IND* mutante o el gen *IND* de tipo salvaje correspondiente, los ensayos de hibridación de diagnóstico descritos anteriormente darán lugar a un único producto de hibridación específico, tal como uno o más fragmentos (restricción) de ADN hibridantes, típico, preferiblemente típico en longitud, para el alelo *IND* mutante o de tipo salvaje. Si la planta es heterocigótica para el alelo *IND* mutante, aparecerán dos productos de hibridación específicos, que reflejan tanto la hibridación del alelo *IND* mutante como la del alelo *IND* de tipo salvaje.

La identificación de los productos de hibridación específicos *IND* de tipo salvaje y mutante se puede producir por ejemplo mediante estimación del tamaño tras electroforesis en gel o capilar (por ejemplo para alelos *IND* mutantes que comprenden un número de nucleótidos insertados o suprimidos que dan como resultado una diferencia de tamaños entre los fragmentos (restricción) de ADN hibridantes procedentes del alelo *IND* de tipo salvaje y del mutante, de manera que dichos fragmentos se pueden separar de forma visible en un gel); evaluando la presencia o ausencia de los dos productos de hibridación específicos diferentes tras la electroforesis en gel o capilar, por lo que la hibridación de diagnóstico del alelo *IND* mutante se puede llevar a cabo, opcionalmente, de forma separada de la hibridación de diagnóstico del alelo *IND* de tipo salvaje; mediante secuenciación directa de los fragmentos (restricción) de ADN hibridantes; o mediante métodos de detección a base de fluorescencia.

En los Ejemplos se describen ejemplos de sondas adecuadas para determinar la cigosidad de alelos *IND* mutantes específicos.

Además, también se pueden desarrollar métodos de detección específicos para un alelo *IND* mutante específico que difieren de los métodos de amplificación a base de PCR o a base de hibridación usando la información de secuencia específica del alelo *IND* mutante específico proporcionada aquí. Tales métodos de detección alternativos incluyen métodos de detección mediante amplificación de señal lineal basados en la escisión invasiva de estructuras de ácidos nucleicos particulares, también conocidos como tecnología Invader™ (como se describe, por ejemplo, en la patente US 5.985.557 "Escisión invasiva de ácidos nucleicos", 6.001.567 "Detección de secuencias de ácidos u otros métodos de detección, tales como SNPlex. De forma breve, en la tecnología Invader™, la secuencia de mutación diana se puede hibridar por ejemplo con un primer oligonucleótido de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia nucleotídica de la secuencia de mutación o una secuencia que abarca la región de unión entre la región de flanqueo en 5' y la región de mutación, y con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia de flanqueo en 3' inmediatamente en dirección 3' y adyacente a la secuencia de mutación, en la que el primer y segundo oligonucleótido solapan en al menos un nucleótido. La estructura de dúplex o tríplex que se produce mediante esta hibridación permite la escisión selectiva de la sonda con una enzima (Cleavase®), dejando intacta la secuencia diana. La sonda marcada escindida se detecta subsiguientemente, potencialmente vía una etapa intermedia que da como resultado la amplificación de la señal adicional.

Un "kit", como se usa aquí, se refiere a un conjunto de reactivos con el fin de llevar a cabo el método de la invención, más particularmente, la identificación de un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas o la determinación del estado de cigosidad de material vegetal que comprende un alelo *IND* mutante específico. Más particularmente, un kit adecuado de la invención comprende al menos dos cebadores específicos, como se describe anteriormente, para la identificación de un alelo *IND* mutante específico, o al menos dos o tres cebadores específicos para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo descrito aquí en el protocolo de identificación de PCR. Como alternativa, el kit puede comprender al menos una sonda específica, que se hibrida específicamente con ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia en ellas de un alelo *IND* mutante específico, como se describe anteriormente, para la identificación de un alelo *IND* mutante específico, o al menos dos o tres sondas específicas para la determinación del estado de cigosidad. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier otro reactivo (tal como, pero sin limitarse a,

tampón hibridante, marcador) para la identificación de un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas, usando la sonda específica.

5 El kit de la invención se puede usar, y sus componentes se pueden ajustar específicamente, para los fines de control de calidad (, por ejemplo, pureza de lotes de semillas), detección de la presencia o ausencia de un alelo *IND* mutante específico en material vegetal o material que comprende o deriva de material vegetal, tales como, pero sin limitarse a, productos alimentarios o de piensos.

10 El término “cebador”, como se usa aquí, engloba cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebear la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente del molde, tal como PCR. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria. Las sondas se pueden usar como cebadores, pero se diseñan para unirse al ADN o ARN diana y no necesitan ser usadas en un proceso de amplificación.

15 La expresión “que reconocen”, como se usa aquí cuando se refiere a cebadores específicos, se refiere al hecho de que los cebadores específicos se hibridan específicamente a una secuencia de ácido nucleico en un alelo *IND* mutante específico en las condiciones expuestas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación de PCR), mediante lo cual la especificidad se determina por la presencia de controles positivos y negativos.

20 El término “que se hibridan”, como se usa aquí cuando se refiere a sondas específicas, se refiere al hecho de que la sonda se une a una región específica en la secuencia de ácido nucleico de un alelo *IND* mutante específico en condiciones de restricción estándar. “Condiciones” de restricción estándar, como se usa aquí, se refiere a las condiciones para la hibridación descritas aquí, o a las condiciones hibridantes convencionales como describen Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que, por ejemplo, pueden comprender las siguientes etapas: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico vegetal o ADN de genoteca BAC sobre un filtro, 2) prehibridar el filtro durante 1 a 2 horas a 65°C en 6 X SSC, 5 X reactivo de Denhardt, 0,5% de SDS y 20 µg/ml de ADN portador desnaturizado, 3) añadir la sonda de hibridación que se ha marcado, 4) incubar durante 16 a 24 horas, 5) lavar el filtro una vez durante 30 min. a 68°C en 6X SSC, 0,1% de SDS, 6) lavar el filtro tres veces (dos veces durante 30 min. en 30 ml y una vez durante 10 min. en 500 ml) a 68°C en 2 X SSC, 0,1% de SDS, y 7) exponer el filtro durante 4 a 48 horas a película de rayos X a -70°C.

30 Como se usa aquí, una “muestra biológica” es una muestra de una planta, material vegetal o producto que comprende material vegetal. El término “planta” pretende englobar tejidos vegetales, en cualquier etapa de madurez, así como cualesquiera células, tejidos, u órganos tomados o derivados de cualquier planta de este tipo, incluyendo, sin limitación, cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos celulares, cultivos tisulares, o protoplastos. “Material vegetal”, como se usa aquí, se refiere a material que se obtiene o deriva de una planta. Los productos que comprenden material vegetal se refieren a productos alimentarios, de piensos u otros productos que se producen usando material vegetal o pueden estar contaminados por material vegetal. Se entiende que, en el contexto de la presente invención, tales muestras biológicas se evalúan para determinar la presencia de ácidos nucleicos específicos para un alelo *IND* mutante específico, que implica la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. De este modo, los métodos citados aquí para identificar un alelo *IND* mutante específico en muestras biológicas se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el alelo *IND* mutante específico.

También se describe aquí la combinación de alelos *IND* específicos en una planta, a la transferencia de uno o más alelos *IND* mutantes específicos desde una planta a otra planta, a las plantas que comprenden uno o más alelos *IND* mutantes específicos, la progenie obtenida a partir de estas plantas, y a células vegetales, partes vegetales, y semillas vegetales derivadas de estas plantas.

45 De este modo, adecuado para la invención es un método para combinar dos o más alelos *IND* mutantes seleccionados en una planta, que comprende las etapas de

(a) generar y/o identificar dos o más plantas que comprenden cada una uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados, como se describe anteriormente,

50 (b) cruzar una primera planta que comprende uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados con una segunda planta que comprende uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados distintos, recoger semillas F1 del cruce, y, opcionalmente, identificar una planta F1 que comprende uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados de la primera planta con uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados de la segunda planta, como se describe anteriormente,

55 (c) opcionalmente, repetir la etapa (b) hasta que se obtiene una planta F1 que comprende todos los alelos *IND* mutantes seleccionados,

(d) opcionalmente,

- identificar una planta F1, que es homocigótica o heterocigótica para un alelo *IND* mutante seleccionado determinando el estado de cigosidad de los alelos *IND* mutantes, como se describe anteriormente, o
- generar plantas que son homocigóticas para uno o más de los alelos *IND* mutantes seleccionados llevando a cabo una de las siguientes etapas:
 - extraer plantas doblemente haploides de células de microsporas o polen tratadas de plantas F1 que comprenden el uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados, como se describe anteriormente,
 - autofertilizar las plantas F1 que comprenden el uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados durante una o más generaciones (y), recoger semillas F1 Sy de las autofertilizaciones, e identificar plantas F1 Sy, que son homocigóticas para el uno o más alelos *IND* mutantes, como se describe anteriormente.

También es adecuado para la invención un método para transferir uno o más alelos *IND* mutantes desde una planta a otra planta, que comprende las etapas de:

- (a) generar y/o identificar una primera planta que comprende uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados, como se describe anteriormente, o generar la primera planta combinando el uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados en una planta, como se describe anteriormente (en el que la primera planta es homocigótica o heterocigótica para el uno o más alelos *IND* mutantes)
- (b) cruzar la primera planta que comprende el uno o más alelos *IND* mutantes con una segunda planta que no comprende el uno o más alelos *IND* mutantes, recoger semillas F1 del cruce (en el que las semillas son heterocigóticas para un alelo *IND* mutante si la primera planta fue homocigótica para ese alelo *IND* mutante, y en el que la mitad de las semillas son heterocigóticas y la mitad de las semillas son acigóticas, es decir, no comprenden, un alelo *IND* mutante si la primera planta fue heterocigótica para ese alelo *IND* mutante), y, opcionalmente, identificar plantas F1 que comprenden uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados, como se describe anteriormente,
- (c) retrocruzar plantas F1 que comprenden uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados con la segunda planta que no comprende el uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados para una o más generaciones (x), recoger semillas BCx de los cruces, e identificar en cada generación plantas BCx que comprenden el uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados, como se describe anteriormente,
- (d) opcionalmente, generar plantas BCx que son homocigóticas para el uno o más alelos *IND* mutantes seleccionados al llevar a cabo una de las siguientes etapas:
 - extraer plantas doblemente haploides de células de microsporas o de polen tratadas de plantas BCx que comprenden el uno o más alelos *IND* mutantes deseados, como se describe anteriormente,
 - autofertilizar las plantas BCx que comprenden el uno o más alelos *IND* mutantes deseados durante una o más generaciones (y), recoger semillas BCx Sy de las autofertilizaciones, e identificar plantas BCx Sy, que son homocigóticas para el uno o más alelos *IND* mutantes deseados, como se describe anteriormente.

La primera y la segunda planta pueden ser plantas *Brassicaceae*, particularmente plantas de *Brassica*, especialmente plantas de *Brassica napus* o plantas de otra especie de cultivo de *Brassica*. La primera planta puede ser una planta *Brassicaceae*, particularmente una planta de *Brassica*, especialmente una planta de *Brassica napus* o una planta de otra especie de cultivo de *Brassica*, y la segunda planta puede ser una planta de una línea de reproducción *Brassicaceae*, particularmente de una línea de reproducción de *Brassica*, especialmente de una línea de reproducción de *Brassica napus*, o de una línea de reproducción de otra especie de cultivo de *Brassica*. "Línea de reproducción", como se usa aquí, es una línea de planta preferiblemente homocigótica distinguible de otras líneas de plantas mediante un genotipo y/o fenotipo preferidos que se usa para producir descendencia híbrida.

También se describe un método para obtener una planta, en particular una planta de cultivo de *Brassica*, tal como una planta de *Brassica napus*, cuya resistencia al desgranado de las vainas está incrementada pero que mantiene preferiblemente una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas, que comprende combinar y/o transferir alelos *IND* mutantes según la invención en o a una planta de *Brassica*, como se describe anteriormente.

La planta puede ser una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND*, en la que se incrementa la resistencia al desgranado de las vainas mientras se mantiene una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas combinando y/o transfiriendo tres alelos *IND* mutantes como se describe aquí en o a una planta de *Brassica*, como se describe anteriormente.

También se describe un método para obtener una semilla o planta de cultivo de *Brassica* híbrida que comprende al menos dos genes *IND*, en particular una semilla o planta de *Brassica napus* híbrida, cuya resistencia al desgranado de las vainas está incrementada pero que mantiene una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas, que comprende las etapas de:

- 5 (a) generar y/o identificar una primera planta que comprende un primer y un segundo alelo *IND* mutante seleccionado en estado homocigótico, y una segunda planta que comprende un tercer alelo *IND* mutante seleccionado en estado homocigótico, como se describe anteriormente,
- (b) cruzar la primera y la segunda planta y recoger semillas híbridas F1 del cruce.

10 El primer o el segundo alelo *IND* mutante seleccionado puede ser el mismo alelo *IND* mutante que el tercer alelo *IND* mutante seleccionado, de tal manera que las semillas híbridas F1 son homocigóticas para un alelo *IND* mutante y heterocigóticas para el otro. La primera planta se puede usar como una planta progenitora masculina, y la segunda planta se puede usar como una planta progenitora femenina. La primera planta puede ser completamente resistente al desgranado de las vainas. Tales plantas se pueden obtener sembrando vainas de semillas indehiscentes completas obtenidas autofertilizando las plantas y cosechando vainas de semillas completas en lugar de trillar las vainas de semillas para cosechar las semillas.

15

SECUENCIAS

Genes *IND*

- SEC ID NO: 1: ADN codificante del gen *IND-A1* que codifica una proteína IND-A1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- 20 SEC ID NO: 2: proteína IND-A1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 1.
- SEC ID NO: 3: ADN codificante del gen *IND-C1* que codifica una proteína IND-C1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- SEC ID NO: 4: proteína IND-C1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 3.
- 25 SEC ID NO: 5: ADN genómico del gen *IND-A1* que codifica una proteína IND-A1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- SEC ID NO: 6: proteína IND-A1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 5.
- SEC ID NO: 7: ADN genómico del gen *IND-C1* que codifica una proteína IND-C1 de tipo salvaje de *Brassica napus*.
- SEC ID NO: 8: proteína IND-C1 de tipo salvaje codificada por SEC ID NO: 7.
- 30 SEC ID NO: 9: ADN codificante del gen *IND1* de *Arabidopsis*.
- SEC ID NO: 10: proteína IND1 de *Arabidopsis* codificada por SEC ID NO: 9.
- SEC ID NO: 11: secuencia nucleotídica de un homólogo *IND* de *Brassica napus* (BN1-*IND* - SEC ID NO: 2 del documento WO04/113542)
- 35 SEC ID NO: 12: secuencia nucleotídica de un segundo homólogo *IND* de *Brassica napus* (BN2-*IND* - SEC ID NO: 3 del documento WO04/113542)

Cebadores y sondas

- SEC ID NO 13: Oligonucleótido directo para detección de IND-A1-EMS01
- SEC ID NO 14: Oligonucleótido directo para detección de IND-A1-WT
- SEC ID NO 15: Oligonucleótido inverso para detección de IND-A1-EMS01 y -WT
- 40 SEC ID NO 16: Oligonucleótido directo para detección de IND-A1-EMS05
- SEC ID NO 17: Oligonucleótido directo para detección de IND-A1-WT
- SEC ID NO 18: Oligonucleótido inverso para detección de IND-A1-EMS05 y -WT
- SEC ID NO 19: Oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-EMS01
- SEC ID NO 20: Oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-WT

- SEC ID NO 21: Oligonucleótido directo para detección de IND-C1-EMS01 y -WT
- SEC ID NO 22: Oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-EMS03
- SEC ID NO 23: Oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-WT
- SEC ID NO 24: Oligonucleótido directo para detección de IND-C1-EMS03 y -WT
- 5 SEC ID NO 25: Oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS01 y -WT
- SEC ID NO 26: Oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS01
- SEC ID NO 27: Oligonucleótido para detección de IND-A1-WT
- SEC ID NO 28: Oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS05 y -WT
- SEC ID NO 29: Oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS05
- 10 SEC ID NO 30: Oligonucleótido para detección de IND-A1-WT
- SEC ID NO 31: Oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS01 y -WT
- SEC ID NO 32: Oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS01
- SEC ID NO 33: Oligonucleótido para detección de IND-C1-WT
- SEC ID NO 34: Oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS03 y -WT
- 15 SEC ID NO 35: Oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS03
- SEC ID NO 36: Oligonucleótido para detección de IND-C1-WT
- SEC ID NO 37: Oligonucleótido directo para detección de IND-A1
- SEC ID NO 38: Oligonucleótido inverso para detección de IND-A1
- SEC ID NO 39: Oligonucleótido directo para detección de IND-C1
- 20 SEC ID NO 40: Oligonucleótido inverso para detección de IND-C1

Excepto que se señale de otro modo en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según técnicas de biología molecular estándar como se describe en Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA y en los Volúmenes I y II de Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Segunda Edición, Academic Press (UK). Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular con plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK. Los materiales y métodos estándar para reacciones en cadena de la polimerasa se pueden encontrar en Dieffenbach y Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y en McPherson et al. (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, Primera Edición, Springer Verlag, Alemania. Los procedimientos estándar para el análisis AFLP se describen en Vos et al. (1995, NAR 23:4407-4414) y en la solicitud de patente EP publicada EP 534858.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Aislamiento de las secuencias de ADN de los genes *IND*

35 Para determinar las secuencias de los genes *IND* de una línea de reproducción de colza de primavera élite, se identificó una genoteca de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de la línea según lo siguiente:

1.1. Aislamiento de clones de BAC que comprenden una secuencia *IND*

40 Para identificar colonias de *Escherichia coli* que contienen un clon de BAC que comprende una secuencia *IND* de la línea de reproducción de colza de primavera élite, se identificó mediante procedimientos de hibridación Southern estándar una genoteca de BAC de la línea (tamaño medio de los clones de más de 120 kb) dispuesta como clones duplicados individuales sobre filtros de nailon de alta densidad:

- Una mezcla de dos sondas con la secuencia de SEC ID NO: 2 del documento WO04/113542 ("Bn1-IND") y SEC ID NO: 3 del documento WO04/113542 ("BN2-IND") (SEC ID NO: 11 y 12, respectivamente) y marcada según procedimientos estándar se usó para la hibridación al ADN sobre la membrana de nailon.

- La prehibridación se llevó a cabo durante 2 horas a 65°C en 30 ml del siguiente tampón de hibridación: 6X SSC (20X SSC contiene 3,0 M de NaCl, 0,3 M de citrato de sodio, pH 7,0), 5X Denhardt (100X Denhardt contiene 2% de Ficoll, 2% de polivinilpirrolidona, 2% de seroalbúmina bovina), 0,5% de SDS y 20 µg/ml de ADN portador desnaturalizado (ADN de esperma de pescado monocatenario, con una longitud media de 120-3000 nucleótidos)
 - La hibridación se llevó a cabo en las siguientes condiciones:
 - La sonda marcada (20 ng de cada secuencia) se desnaturalizó calentando durante 5 minutos a 95°C y enfriando en hielo durante 5 minutos, y se añadió a 15 ml de tampón de hibridación (mismo tampón que para la prehibridación)
 - La hibridación se llevó a cabo toda la noche a 65°C.
 - Las transferencias se lavaron tres veces durante 30 minutos a 65°C en los tubos de hibridación (una vez con 30 ml de 6x SSC con 0,1% de SDS y dos veces con 30 ml de 2x SSC con 0,1% de SDS) y una vez durante 10 minutos a 65°C con 500 ml de 2x SSC con 0,1% de SDS en una caja.
 - Películas Kodak X-OMAT AR se expusieron a las transferencias radiactivas durante 4 horas a -70°C.
 - En base a las señales positivas, se recogieron 14 colonias de *E. coli* que contienen un clon de BAC que comprende una secuencia *IND* mediante identificación de la genoteca de BAC de la línea de reproducción de colza de primavera élite (nº total de positivos: 65) (aquí en lo sucesivo denominadas "colonias positivas").
- 1.2. Aislamiento de clones de BAC que comprenden una secuencia *IND* de longitud completa
- Para identificar colonias positivas que comprenden un clon de BAC con una secuencia de ADN genómico de longitud completa de uno de los genes *IND*, se llevó a cabo un análisis de transferencia Southern en ADN del clon de BAC aislado de las colonias positivas y en ADN genómico aislado de *Brassica napus*:
- Se aisló ADN del clon de BAC a través de lisis alcalina, como se describe en la técnica, a partir de las colonias positivas que se hicieron crecer en 25 ml de medio de Caldo Luria que contiene 25 µg/ml de cloranfenicol.
 - Se aisló ADN genómico de tejido foliar de *B. napus* según el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15).
 - La concentración de ADN de cada preparación se estimó comparando la intensidad de la banda de 1 µl de cada muestra con la intensidad de la banda de 1, 2, 4, 8 y 20 µl de una disolución que contiene 25 ng/µl de ADN lambda (Life Technologies®) en 1% de gel de agarosa (Roche®) con TBE (Invitrogen®) que contiene bromuro de etidio (ICN Biochemicals®).
 - Se digirieron 100-200 ng de ADN del clon de BAC y 1,7 µg de ADN genómico con la enzima de restricción EcoRI en un volumen de reacción final de 20 µl, aplicando condiciones propuestas por el fabricante (New England Biolabs). El tiempo de digestión y/o la cantidad de enzima de restricción se ajustaron para asegurar la digestión total de las muestras de ADN genómico sin degradación no específica.
 - Tras la digestión, se añadieron a las muestras de ADN digeridas 2 µl de colorante de carga que contiene ARNasa (12,5 ml de 1% de xileno cianol FF; 12,5 ml de 1% de indicador de azul de bromofenol soluble en agua; 25 ml de glicerol; 100 µl de 0,5 M de EDTA pH 8; 1 µl de ARNasa (10 mg/ml)), y las muestras se incubaron durante 30 min. a 37°C.
 - Las muestras se cargaron en un gel de agarosa con TAE al 1%.
 - Se digirió ADN del fago lambda (Fermentas®) con PstI, o se incluyó Escalera de ADN de 1 kpb (Life Technologies) como patrón de tamaño.
 - Tras la electroforesis, las muestras de ADN (ADN digerido del clon de BAC y genómico) se transfirieron a una membrana de nailon (Hybond-N+ Amersham Pharmacia Biotech®) mediante transferencia capilar alcalina seca.
 - Las membranas de nailon con ADN digerido del clon de BAC y genómico se identificaron mediante procedimientos de hibridación Southern estándar como se describe anteriormente para las identificaciones de genotecas de BAC, excepto que para el ADN genómico las películas Kodak XOMAT AR se expusieron a transferencias radiactivas durante 2 días a -70°C.
 - En base a una comparación entre los patrones de hibridación obtenidos tras la digestión de ADN del clon de BAC de las colonias positivas identificadas y de ADN genómico aislado de *Brassica napus* con enzima de restricción EcoRI e hibridación con las sondas, los clones de BAC se agruparon en 2 grupos y, para cada uno

de los 2 grupos, se seleccionó un clon de BAC que contiene una secuencia *IND* de longitud completa (denominada *IND-A1* e *IND-C1*).

- Las secuencias *IND* comprendidas en los clones de BAC de las colonias positivas seleccionadas se determinaron mediante técnicas de secuenciación estándar (Agowa).

5 Tabla 3: Patrón de hibridación del ADN digerido del clon de BAC y genómico hibridado a las sondas *Bn1-* y *Bn2-IND*

Muestra de ADN:	ADN genómico procedente de <i>B. napus</i>	ADN del clon de BAC procedente de <i>B. napus</i>	Corresponde a
restringido con:	Longitud estimada de los fragmentos de AND hibridantes:		
EcoRI	8 kb 2,2 kb	8 kb 2,2 kb	<i>IND-A1</i> <i>IND-C1</i>

Ejemplo 2 – Caracterización de secuencias de genes *IND* de *Brassica napus*

Tras la secuenciación de los fragmentos de ADN genómico (SEC ID NO: 5 y 7, respectivamente), las regiones codificantes de las secuencias *IND* se determinaron con FgeneSH (Softberry, Inc. Mount Kisco, NY, EE.UU.) y est2genome (Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16 (6): 276-277; Mott, 1997, Comput. Applic. 13:477-478) como se da en el listado de secuencias.

La comparación de las bandas hibridantes generadas en un análisis de transferencia Southern sobre ADN genómico aislado de *B. rapa* (AA), *B. oleracea* (CC) y *B. napus* (AACC) y sobre ADN del clon de BAC aislado de las colonias positivas identificadas en el Ejemplo 1 (restringido con EcoRI e hibridado a una sonda como se describe en el Ejemplo 1) indicó que la secuencia *IND-A1* se originó del genoma A y la secuencia *IND-C1* del genoma C.

Las regiones codificantes de proteínas de los genes *IND* de la línea de reproducción de colza de primavera élite se representan en SEC ID NO:1 (*IND-A1*), SEC ID NO:3 desde el nucleótido en la posición 46 hasta el nucleótido en la posición 633 (*IND-C1-corta*) y SEC ID NO:3 (*IND-C1-larga*), respectivamente. Las secuencias de las proteínas *IND-A1* e *IND-C1*, codificadas por estas secuencias de ácidos nucleicos, se representan en SEC ID NO:2 (*IND-A1*), SEC ID NO:4 desde el aminoácido en la posición 16 hasta el aminoácido en la posición 210 (*IND-C1-corta*) y SEC ID NO:4 (*IND-C1-larga*), respectivamente.

El porcentaje de identidad de secuencia (nucleotídica) entre las regiones codificantes completas de *IND-A1* e *IND-C1-larga* es 81%, y entre las regiones codificantes completas de *IND-A1* e *IND-C1-corta* es 87%, mientras que el porcentaje de identidad de secuencia (nucleotídica) entre las regiones que codifican los dominios de bHLH de *IND-A1* e *IND-C1-larga* y *-corta* (según se determina de acuerdo con Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770) es 98%. Estos porcentajes indican que los genes *IND* están más conservados en la región que codifica el dominio de bHLH que en la parte restante de la región codificante.

De forma similar, el porcentaje de identidad de secuencia (de aminoácidos) entre las proteínas *IND-A1* e *IND-C1-larga* completas es 75%, y entre las proteínas *IND-A1* e *IND-C1-corta* completas es 80%, mientras que el porcentaje de identidad de secuencia (de aminoácidos) entre los dominios de bHLH de *IND-A1* e *IND-C1-larga* y *-corta* (según se determina de acuerdo con Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770) es 98%. Estos porcentajes indican que las proteínas *IND* están más conservadas en el dominio de bHLH que en la parte restante de las proteínas *IND*.

Ejemplo 3 – Expresión de genes *IND* de *Brassica*

Para analizar la expresión de los diferentes genes *IND* en diferentes tejidos, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR específicos para cada gen *IND* sobre ARN total aislado de hojas, paredes de vainas, tejido de la zona de dehiscencia y semillas de *Brassica napus* usando los siguientes cebadores:

INDA1F1 5' AGGAGAGGAAGAGATGGATCC 3' (SEC ID No. 37)

INDA1R1 5' TGAGTGTGAGGCTGAAGAAGC 3' (SEC ID No. 38)

para el gen *IND-A1*, e

40 INDC1F1 5' CCTCATCATCTCCTTATGAAC 3' (SEC ID No. 39)

INDC1R 5' CGTATTGCATCTCCTTCATCT 3'. (SEC ID No. 40)

para el gen *IND-C1*.

Los resultados indicaron que ambos genes *IND*, es decir, *IND-A1* e *IND-C1*, no se expresaron en tejido de hoja ni en semillas, pero se expresaron en tejido de la zona de dehiscencia, y que el gen *IND-A1* se expresó en las paredes de vainas, mientras que el gen *IND-C1* no se expresó en paredes de vainas.

Ejemplo 4 – Generación y aislamiento de alelos *IND* mutantes (*ind*)

- 5 Las mutaciones en los genes *IND* identificados en el Ejemplo 1 se generaron e identificaron según lo siguiente:
- Se preempaparon durante dos horas 30.000 semillas procedentes de la línea de reproducción de colza de primavera élite (semillas M0) sobre papel de filtro húmedo en agua desionizada o destilada. La mitad de las semillas se expuso a 0,8% de EMS y la mitad a 1% de EMS (Sigma: M0880), y se incubó durante 4 horas.
 - 10 - Las semillas mutagenizadas (semillas M1) se enjuagaron 3 veces y se secaron en una campana extractora de humos toda la noche. 30.000 plantas M1 se hicieron crecer en suelo y se autofertilizaron para generar semillas M2. Las semillas M2 se cosecharon para cada planta M1 individual.
 - Se hicieron crecer dos veces 4800 plantas M2, derivadas de diferentes plantas M1, y se prepararon muestras de ADN de muestras de hojas de cada planta M2 individual según el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15).
 - 15 - Las muestras de ADN se examinaron en busca de la presencia de mutaciones de punto en los genes *IND* provocando la introducción de codones de PARADA en las regiones codificantes de proteínas de los genes *IND*, o la sustitución de aminoácidos en las proteínas *IND*, particularmente en el dominio de bHLH de las proteínas *IND*, mediante secuenciación directa mediante técnicas de secuenciación estándar (Agowa) y analizando las secuencias en busca de la presencia de las mutaciones de punto usando el software NovoSNP (VIB Antwerp).
 - 20 - De este modo se identificaron los siguientes alelos *IND* mutantes (*ind*):

Tabla 4a: Mutaciones de codón de PARADA y de sustitución en *IND-A1*

Posición de aminoácidos	Posición de nucleótido		Tipo salvaje → codón mutante	Tipo salvaje → aminoácido mutante	Planta M2 N°	Alelo N°
<i>SEC ID: 2/6</i>	<i>SEC ID: 1</i>	<i>SEC ID: 5</i>				
122	364	924	cag → tag	GLN → STOP (en b)	POSH101, POSH102, POSH103, POSH104	<i>ind-a1-EMS01</i> , <i>ind-a1-EMS02</i> , <i>ind-a1-EMS03</i> , <i>ind-a1-EMS04</i>
103	307	867	gat → aat	ASP → ASN	POSH105	<i>ind-a1-EMS05</i>
127	380	940	cgt → cat	ARG → HIS (en b)	POSH105	<i>ind-a1-EMS05</i>

Tabla 4b: Mutaciones de codón de PARADA en *IND-C1*

Posición de aminoácidos	Posición de nucleótido		Tipo salvaje → codón mutante	Tipo salvaje → aminoácido mutante	Planta M2 N°	Alelo N°
<i>SEC ID: 4/8</i>	<i>SEC ID: 3</i>	<i>SEC ID: 7</i>				
50	148	644	caa → taa	GLN → STOP	POSH106	<i>ind-c1-EMS01</i>
135	403	899	cag → tag	GLN → STOP (en b)	POSH108	<i>ind-c1-EMS03</i>

25 Las semillas de referencia de plantas que comprenden alelos *ind-a1-EMS01* e *ind-c1-EMS01* en estado homocigótico se han depositado en la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, US) el 20 de noviembre de 2007, con el número de acceso PTA-8796 (designación de la cepa 07MBBN001171), y las semillas de referencia de plantas que comprenden los alelos *ind-a1-EMS05* e *ind-c1-EMS03* en estado homocigótico se han depositado en la ATCC el 20 de noviembre de 2007, con el número de acceso PTA-8795 (designación de la cepa 07MBBN000530). En conclusión, los ejemplos anteriores muestran cómo se pueden generar y aislar alelos *IND* mutantes. También, el material vegetal que comprende tales alelos mutantes

se puede usar para combinar alelos mutantes seleccionados y/o alelos de tipo salvaje en una planta, como se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 5 – Identificación de una planta de *Brassica* que comprende un alelo *IND* de *Brassica* mutante

5 Plantas de *Brassica* que comprenden las mutaciones en los genes *IND* identificados en el Ejemplo 4 se identificaron según lo siguiente:

- Para cada gen *IND* mutante identificado en la muestra de ADN de una planta M2, se hicieron crecer al menos 50 plantas M2 derivadas de la misma planta M1 que la planta M2 que comprende la mutación *IND*, y se prepararon muestras de ADN a partir de muestras de hojas de cada planta M2 individual.
- 10 - Las muestras de ADN se examinaron en busca de la presencia de la mutación *IND* de punto identificada como se describe anteriormente en el Ejemplo 4.
- Plantas M2 heterocigóticas y homocigóticas (según se determina en base a los electroferogramas) que comprenden la misma mutación se autofertilizaron, y se cosecharon semillas M3.

Ejemplo 6 – Análisis de las propiedades de dehiscencia del fruto de plantas de *Brassica* que comprenden un gen *IND* de *Brassica* mutante

15 Para determinar la correlación entre la presencia de genes *IND* mutantes en plantas de *Brassica* y las propiedades de dehiscencia del fruto de las plantas de *Brassica*, se analizaron en el invernadero y en el campo las propiedades de dehiscencia del fruto de plantas de *Brassica* que comprenden un gen *IND* mutante según lo siguiente:

- Para examinar si y cómo los márgenes de valvas de fruto y las propiedades de dehiscencia de vainas de semillas se vieron afectados por mutaciones en *IND*, el fruto *ind* se comparó con el fruto de tipo salvaje usando los siguientes ensayos macroscópicos:

25 (a) Inspección de las vainas de semillas y plantas en general a simple vista para determinar diferencias en el fenotipo de las vainas y plantas provocadas por la presencia de ciertos alelos *IND* mutantes. Determinación del fenotipo de las vainas: cuando las vainas se hicieron crecer totalmente y estuvieron llenas, justo antes del amarillamiento, se evaluó el grado de agudeza de la zona que delinea la valva y el pico en la zona en la que ambas valvas ya no se tocan más (en el extremo distal de la vaina) de 5 vainas aleatorias (procedentes de diferentes plantas si existen múltiples plantas por línea), y se le atribuyó una puntuación de 1 a 5: 1 para una indentación clara y una zona afilada fina que separa la valva y el pico; 2 para cierta indentación y una zona clara, aunque más borrosa, que separa la valva del pico; 3 para valvas y pico que todavía son bien observables como dos tejidos diferentes pero con una transición muy suave entre ellos; 4 para valvas y pico que apenas son observables como tejidos diferentes; 5 para una transición completamente suave entre valvas y pico sin ninguna diferenciación clara entre ambos tipos de tejidos, es decir, cuanto menos indentación entre la valva y el pico en el extremo distal de las vainas mayor es la puntuación. Una puntuación de 1 (indentación notable entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de tipo salvaje de las vainas, más específicamente un fenotipo de las vainas sensible al desgranado de las vainas; una puntuación de 2 a 4 (transición más gradual entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de las vainas resistente al desgranado de las vainas, en el que el desgranado de las semillas está significativamente reducido o retrasado mientras se mantiene una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas, de manera que las vainas todavía se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas; y una puntuación de 5 (sin indentación entre la valva y el pico) corresponde a un fenotipo de las vainas resistente al desgranado de las vainas, en el que el desgranado de las semillas está reducido o retrasado hasta un grado que ya no permite una capacidad de trilla agronómicamente relevante de las vainas, de manera que las vainas no se pueden abrir a lo largo de la zona de dehiscencia aplicando fuerzas físicas limitadas.

45 (b) Ensayo de impacto manual (MIT) para determinar el incremento en la resistencia al desgranado de las vainas provocado por la presencia de ciertos alelos *IND* mutantes: el nivel de resistencia al desgranado de las vainas de líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* mutantes y líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* de tipo salvaje se comparó de una forma semicuantitativa determinando las fuerzas físicas necesarias para abrir vainas maduras cerradas aplicando manualmente torsión a las vainas. Se realizó una distinción entre vainas que se abren completamente a lo largo de la zona de dehiscencia a la torsión más ligera, vainas que se abren solamente en la base de la zona de dehiscencia y necesitan una torsión más fuerte para abrirse completamente, y vainas que solamente se pueden machacar y no se abren a lo largo de la zona de dehiscencia. A la resistencia de las vainas al desgranado de las vainas se le atribuyó una puntuación de 1 a 5 en base a esta fuerza física: 1 para vainas que se abren completamente a lo largo de la zona de dehiscencia a la torsión más pequeña, 2-4 para vainas que se abren solamente en la base de la zona de dehiscencia y necesitan una mayor torsión para abrirse completamente, y 5 para vainas que solo se pueden triturar y no se abren a lo largo de la zona de dehiscencia.

(c) Ensayo de impactos aleatorios (RIT) para determinar el incremento en la resistencia al desgranado de las vainas provocado por la presencia de ciertos alelos *IND* mutantes: el nivel de resistencia al desgranado de las vainas de líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* mutantes y líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* de tipo salvaje correspondientes se comparó de una forma cuantitativa determinando la semivida de muestras de vainas procedentes de ambas líneas según Bruce et al. (2002, más arriba). Más específicamente, dos muestras duplicadas de 20 vainas maduras intactas procedentes de cada línea se sometieron a un RIT. Se colocaron 20 vainas junto con seis bolas de acero de 12,5 mm de diámetro en un recipiente cilíndrico de 20 cm de diámetro con su eje vertical. El recipiente se sometió entonces a movimiento armónico simple de frecuencia 4,98 Hz y 51 mm de recorrido en el plano horizontal. Las vainas, que se comprobaron para determinar su validez antes del ensayo, se agitaron durante tiempos acumulativos de 10, 20, 40, y, si más del 50% de las vainas permanecieron intactas, 80 s. El tambor se abrió después de cada período y se contó el número de vainas cerradas. Las vainas se examinaron y se clasificaron como “cerradas” si la zona de dehiscencia de ambas valvas todavía estaba cerrada. De este modo, las vainas se clasificaron como “abiertas” si una o ambas de las valvas estaban despegadas, de manera que se había liberado la semilla. Si la mayoría de las vainas estaban rotas o dañadas sin abrirse en la zona de dehiscencia, la muestra se etiquetó como “incontable”. Para dar a cada punto el mismo peso, los datos se obtuvieron uniformemente espaciados en la variable independiente, el tiempo, añadiendo 1 y tomando el \log_{10} . El porcentaje de vainas abiertas p se transformó mediante la transformación de logit, es decir, $p = \log_e(p/100-p)$. Entonces se ajustó un modelo lineal al tiempo transformado y los datos de porcentaje, y se usó para estimar la semivida.

(d) Ensayos de campo para determinar la relación entre la resistencia al desgranado de las vainas, la capacidad de trilla y la productividad, y la presencia de ciertos alelos *IND* mutantes en plantas: el nivel de resistencia al desgranado de las vainas, de la capacidad de trilla y productividad de líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* mutantes y líneas de *Brassica* que comprenden los alelos *IND* de tipo salvaje correspondientes se comparó de forma semicuantitativa determinando y comparando el nivel de desgranado de semillas (SHAT), la capacidad de cosecha de la cosechadora (CHA1) y la capacidad de trilla (CHA2), y de forma cuantitativa determinando y comparando la producción de semillas por parcela tras pasar la cosechadora (YLDP) y la producción de semillas tras la trilla de la paja (YLDS) en el campo entre parcelas con plantas *ind* y parcelas con plantas de tipo salvaje. A las parcelas se les atribuyó una puntuación de 1-9 para indicar el nivel de desgranado de las semillas en la parcela antes de la cosecha: una puntuación de 1 para indicar que prácticamente todas las plantas en la parcela se desgranaron antes de la cosecha, hasta una puntuación de 9 para indicar que prácticamente ninguna planta en la parcela se desgranó antes de la cosecha. A las parcelas se les atribuyó una puntuación de 1-5 para indicar el nivel de capacidad de cosecha de la cosechadora en la parcela: una puntuación de 1, a 3 o a 5 para indicar que fue difícil, factible, o fácil, respectivamente, cosechar la parcela con una cosechadora. A las parcelas se les atribuyó una puntuación de 1-5 para indicar el nivel de capacidad de trilla de la parcela: una puntuación de 1, a 3 o a 5 para indicar que fue difícil, factible, o fácil, respectivamente, cosechar manualmente la semilla que queda en la paja tras cosechar con la cosechadora. La producción de semillas por parcela tras pasar la cosechadora (YLDP; expresado en gramos por parcela) se determinó cosechando las semillas por parcela con una cosechadora y pesando las semillas, y la producción de semillas tras trillar la paja (YLDS; expresado en % en peso de la paja) se determinó cosechando manualmente las semillas que quedan en la paja después de cosechar semillas con la cosechadora.

- Para examinar más de cerca si y cómo las células en el margen de la valva de vainas de semillas se ven afectadas por mutaciones en *IND*, se compararon secciones de fruto *ind* con secciones de fruto de tipo salvaje mediante evaluación microscópica de las vainas de semillas:
 - Explantes: Explantes de alrededor de 3 mm tomados de los extremos proximal y distal de vainas de etapa de desarrollo (alrededor de 35 días después de la antesis (DAA), una etapa de desarrollo que corresponde estrechamente al comienzo del amarillamiento del pericarpio visible) y tamaño similares se cosecharon de plantas que se hicieron crecer en una habitación de crecimiento de plantas (dos vainas por cada genotipo) y/o en el campo. Ambas zonas de dehiscencia se disecaron de las vainas.
 - Fijación: La fijación se realizó en 100 mM de tampón de fosfato de potasio pH 7 con 10% de formalina y 0,25% de glutaraldehído durante un total de 4 horas. La infiltración a vacío se realizó después de 1 y 2 horas durante 15 minutos. El fijador se renovó después de cada infiltración a vacío.
 - Deshidratación: La muestra se enjuagó 2 veces 30 minutos con 100 mM de tampón de fosfato de potasio pH 7. La deshidratación se realizó con etanol técnico diluido con 0,85% de NaCl en agua: 60 minutos (') en 50% de etanol, 90' en 70% de etanol, 90' en 80% etanol, 90' en 90% de etanol, 90' en 95% de etanol, 90' en 100% de etanol a temperatura ambiente.

- Empapamiento: El empapamiento se realizó con los kits de empapamiento Leica 7022-31731 Histo-resin o el Kulzer Histo-Technik 7100 (Heraeus), que son kits de resinas de tres componentes (una resina básica, un activador y un endurecedor). Los tres componentes se usaron en las proporciones como se aconseja por el fabricante según lo siguiente: la muestra se incubó durante 4 horas en 50% de etanol/50% de resina básica, toda la noche en 30% de etanol/70% de resina básica (opcional: a 4°C), durante 2 a 4 horas en 100% de resina básica, durante un día en 100% de resina básica después de renovar la resina básica y filtrar a vacío durante 20' (opcionalmente a 4°C), durante un día en resina básica + activador (1%) ("medio de infiltración") tras la infiltración a vacío en este medio durante 20 minutos. La muestra se lavó con resina básica + activador (1%) + endurecedor (1 ml en 15 ml) ("medio de empapamiento"). El empapamiento se realizó en moldes de empapamiento planos (moldes de empapamiento planos de AGAR G3531 con cavidades de alrededor de 300 µl: 14 mm de longitud x 6 mm de anchura x 4 mm de profundidad): se añadieron 100-125 µl de medio de empapamiento/cavidad, el medio de empapamiento se polimerizó a 55°C durante alrededor de una hora, el tejido se colocó en el medio de empapamiento polimerizado (1 explante/cavidad), las cavidades se rellenaron con medio de empapamiento, el medio de empapamiento se polimerizó durante 3 a 5 horas a 55°C, los moldes se enfriaron, los bloques de plástico se retiraron de los moldes y se almacenaron a temperatura ambiente en un recipiente cerrado herméticamente (, por ejemplo, tubo eppendorf).
- Corte en secciones: Los bloques de plástico se pegaron con pegamento con el lado plano sobre un bloque de perspex de 1 cm³ y se recortaron de forma cuadrada alrededor de la muestra. Se cortaron secciones de 4 µm (3 a 4 explantes por genotipo, alrededor de 25 secciones por explante) con un cuchillo de vidrio ralph (realizado en la posición -1 del cuchillo de Reichert-Jung usando varillas de vidrio de 6 mm de grosor bajo un ángulo de corte de alrededor de 6°) en el microtomo. Las secciones se unieron sobre portaobjetos de vidrio tratados con Vectabond (Vector laboratories).
- Demostración de lignina: Secciones no teñidas montadas en Eukitt se examinaron usando un microscopio equipado para fluorescencia (con ajuste de filtro 02 de Zeiss). La lignina fluoresce de color azulado claro.
- Evaluación de histología: Secciones sin teñir se visualizaron usando DIC-Normaski o autofluorescencia (con ajuste del filtro 18 de Zeiss – excitación BP390-420; emisión LP450).

6.1. Correlación entre la presencia de uno o dos alelos *IND* de *Brassica* mutantes en plantas de *Brassica* y las propiedades de dehiscencia del fruto de esas plantas de *Brassica*

Para determinar la correlación entre la presencia de un *ind* en estado heterocigótico (genotipo: *IND-A1/ind-a1*, *IND-C1/IND-C1*; o *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/ind-c1*) o en estado homocigótico (genotipo: *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/IND-C1* o *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1/ind-c1*) en una planta de *Brassica* y las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta de *Brassica*, se analizaron las propiedades de dehiscencia del fruto de plantas de *Brassica* identificadas en el Ejemplo 5 (en particular plantas M2 homocigóticas nº POSH101, POSH103, POSH104, POSH105 y POSH106, y plantas M2 heterocigóticas nº POSH105; véanse las Tablas 4a y b para los alelos *ind* correspondientes) que se hicieron crecer en el invernadero, como se describe anteriormente. No se observó diferencia significativa en el fenotipo y propiedades de dehiscencia del fruto entre plantas de tipo salvaje y estas plantas de un solo mutante heterocigóticas y homocigóticas.

Los ensayos de campo con plantas homocigóticas de un solo mutante *ind* (genotipo: *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/IND-C1* o *IND-A1/IND-A1*, *ind-c1/ind-c1*) y plantas de tipo salvaje (genotipo: *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/IND-C1*) procedentes de poblaciones de retrocruzamiento segregante 3 (BC3) mostraron sin embargo un incremento en la producción de semillas para plantas homocigóticas de un solo mutante *ind* (véase la Tabla a continuación).

Genotipo	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en g/parcela)	YieldWTSeg %	YLDS (en % en peso de paja)
<i>ind-a1-01/ind-a1-01</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	8,0	4,9	5,0	2636,0	106	0,8
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	7,8	4,9	5,0	2490,0	100	0,7
<i>ind-a1-05/ind-a1-05</i> ,	8,1	4,8	5,0	2450,9	103	0,3

Genotipo	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en g/parcela)	YieldWTSeg %	YLDS (en % en peso de paja)
<i>IND-C1//IND-C1</i>						
<i>IND-A1//IND-A1, IND-C1//IND-C1</i>	7,6	5,0	4,8	2387,6	100	0,4
<i>IND-A1//IND-A1, ind-c1-01//ind-c1-01</i>	8,3	4,9	5,0	2856,0	113	0,6
<i>IND-A1//IND-A1, IND-C1//IND-C1</i>	8,3	4,8	5,0	2517,3	100	0,3
<i>IND-A1//IND-A1, ind-c1-03//ind-c1-03</i>	8,6	4,7	4,9	2833,6	113	0,5
<i>IND-A1//IND-A1, IND-C1//IND-C1</i>	8,1	4,6	5,0	2510,7	100	0,4

6.2. Correlación entre la presencia de al menos tres alelos *IND* de *Brassica* mutantes en plantas de *Brassica* y las propiedades de dehiscencia del fruto de esas plantas de *Brassica*

5 Para determinar la correlación entre la presencia de al menos tres alelos *IND* mutantes en una planta de *Brassica* y las propiedades de dehiscencia del fruto de la planta de *Brassica*, se cruzaron entre sí plantas de *Brassica* identificadas en el Ejemplo 5, y/o su progenie, que comprenden los alelos *IND* mutantes, y se analizaron las propiedades de dehiscencia del fruto de las plantas progenie de *Brassica* como se describe anteriormente.

Material vegetal:

10 Progenie (es decir, plantas doblemente mutantes homocigóticas con genotipo *ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*; plantas homocigóticas de un solo mutante y heterocigóticas de un solo mutante – es decir, triple – con genotipo *ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1* e *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*; y plantas de tipo salvaje con genotipo *IND-A1//IND-A1, IND-C1//IND-C1*) de línea 51, línea 45, línea 176 y línea 48, que en sí mismas son heterocigóticas (genotipo: *IND-A1/ind-a1, IND-C1/ind-c1*) para alelos *IND-A1-EMS01* e *IND-C1-EMS01* (línea 51), alelos *IND-A1-EMS01* e *IND-C1-EMS03* (línea 45), alelos *IND-A1-EMS05* e *IND-C1-EMS01* (línea 176), y alelos *IND-A1-EMS05* e *IND-C1-EMS03* (línea 48), respectivamente.

Evaluación macroscópica:

a) Inspección de las vainas de semillas y de las plantas a simple vista.

20 - Las vainas de plantas hermanas *IND* mutantes homocigóticas dobles (genotipo: *ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) derivadas de líneas 51, 45, 176 y 48 mostraron una morfología alterada de las vainas, ya en etapa inmadura, en comparación con vainas de plantas hermanas *IND* de tipo salvaje. Más específicamente, las vainas de las plantas hermanas *IND* mutantes homocigóticas dobles mostraron una falta de definición apropiada del margen de la valva, particularmente manifiesto tanto en el extremo proximal como en el distal del fruto, en comparación con las vainas de plantas hermanas *IND* de tipo salvaje, que mostraron márgenes claramente definidos. Además, la profunda indentación entre la valva y el pico en el extremo distal de las vainas en las plantas hermanas de tipo salvaje estaba en gran medida ausente en las plantas hermanas *ind* homocigóticas dobles, que mostraron una transición más gradual entre la valva y el tejido del pico. Las flores de las plantas hermanas *IND* mutantes homocigóticas dobles de la línea 51 presentaron algunas veces pétalos deformados en condiciones de invernadero. Además, las vainas de plantas derivadas de la línea 45 fueron en general más pequeñas que las vainas de plantas derivadas de las otras líneas. Puesto que esta diferencia de tamaños se produjo tanto en plantas hermanas de tipo salvaje como en plantas hermanas *ind* mutantes derivadas de la línea 45, está provocada probablemente por una mutación de fondo en esta línea.

35 - Las vainas de plantas que comprenden un alelo *ind* en estado homocigótico y un alelo *ind* en estado heterocigótico (genotipo: *ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1* o *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) mostraron un fenotipo intermedio. Más específicamente, los márgenes de la valva de las vainas de estas plantas hermanas *IND* mutantes estaban en general mejor definidos que en las plantas hermanas *IND* mutantes homocigóticas dobles, pero la profunda indentación entre la valva y el pico en el extremo distal de las vainas en las plantas hermanas de tipo salvaje todavía estaba en gran medida ausente en estas plantas mutantes.

- La Tabla 5a muestra las puntuaciones de vainas visuales atribuidas al fenotipo de las vainas de plantas que se hicieron crecer en el campo como se describe anteriormente:

Tabla 5a

Genotipo	Línea nº	Puntuación de vainas visuales (1-5)
<i>IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1</i>	51	1
	45	1
	176	1
	48	1
<i>ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1</i>	51	3
	45	3
	176	2
	48	3
<i>IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	3
	45	3
	176	2
	48	3
<i>ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	5
	45	5
	176	4
	48	5

5 b) Ensayo de impacto manual (MIT):

- Las vainas procedentes de plantas que comprenden dos alelos *IND* mutantes en estado homocigótico (genotipo: *ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) derivadas de las líneas 51, 45, 176 y 48 fueron completamente resistentes al desgranado de las vainas (las vainas no se abrieron a lo largo de la zona de dehiscencia incluso después de aplicar una fuerte torsión).
- 10 - La resistencia al desgranado de las vainas de vainas procedentes de plantas que comprenden un alelo *ind* en estado homocigótico y un alelo *ind* en estado heterocigótico (genotipo: *ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1* o *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) se incrementó en comparación con la resistencia al desgranado de las vainas de vainas procedentes de sus plantas hermanas de tipo salvaje, pero las vainas todavía se pudieron abrir a lo largo de la zona de dehiscencia tras aplicar fuerzas físicas limitadas.
- 15 - La Tabla 5b muestra las puntuaciones atribuidas a las vainas de plantas que se hicieron crecer en el campo en base a la fuerza física necesaria para abrir vainas maduras cerradas aplicando manualmente torsión en las vainas como se describe anteriormente:

Tabla 5b

Genotipo	Línea nº	Puntuación basada en la fuerza física necesaria para abrir vainas maduras cerradas (1-5)
<i>IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1</i>	51	1
	45	1
	176	1

Genotipo	Línea nº	Puntuación basada en la fuerza física necesaria para abrir vainas maduras cerradas (1-5)
	48	1
<i>ind-a1/ind-a1,IND-C1/ind-c1</i>	51	3
	45	3
	176	1
	48	2
<i>IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	3
	45	2
	176	1
	48	3
<i>ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	ND
	45	ND
	176	ND
	48	ND

ND: no determinada

c) Ensayo de impactos aleatorios:

- 5 - Como se muestra en la Tabla 5c, la semivida de muestras de vainas (“LD50”) fue significativamente mayor para vainas procedentes de mutantes dobles homocigóticos (genotipo *ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) derivados de la línea 51 que para vainas de mutantes dobles homocigóticos derivados de la línea 45, indicando que las plantas mutantes dobles homocigóticas que comprenden el alelo IND-C1-EMS01 (línea 51) fueron más resistentes al desgranado de las vainas que las plantas mutantes dobles homocigóticas que comprenden el alelo IND-C1-EMS03 (línea 45).
- 10 - La Tabla 5c muestra además que el valor LD50 fue en general mayor para vainas procedentes de plantas que comprenden un alelo *ind-c1* en estado homocigótico y un alelo *ind-a1* en estado heterocigótico (genotipo: *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) que para vainas procedentes de plantas que comprenden un alelo *ind-a1* en estado homocigótico y un alelo *ind-c1* en estado heterocigótico (genotipo: *ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1*), indicando que las mutaciones en el alelo IND-C1 podrían tener un efecto más potente sobre la resistencia al desgranado de las vainas que las mutaciones en el alelo IND-A1.

15

Tabla 5c

Genotipo	Línea nº	LD50-invernadero			LD50-campo1	LD50-campo2
			Inferior a 95%	Superior a 95%		
<i>IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1</i>	51	8,61	6,56	11,08	8,9	6,8
	45	8,07	6,08	10,45	7,8	5,7
	176	ND			5,3	5,3
	48	11,42	7,42	14,9	9	5,3
	48	8,86	*	*		
<i>ind-a1/ind-a1, IND-C1/IND-C1</i>	48	9,86	5,89	13,3	ND	ND
<i>IND-A1/IND-A1, ind-c1/ind-c1</i>	48	5,98	2,87	8,6	ND	ND

Genotipo	Línea nº	LD50-invernadero			LD50-campo1	LD50-campo2
			Inferior a 95%	Superior a 95%		
<i>ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1</i>	51	14,22	11,33	17,79	21,1	21,4
	51	22,78	18,68	27,8		
	45	14,97	11,95	18,74	22,9	24,6
	45	10,32	8,05	13,05		
	176	ND			7,3	8,6
	48	7,21	3,04	9,7	10,1	9,4
<i>IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	48,31	39,94	58,73	16,9	22,6
	51	46,46	38,44	56,41		
	45	26,89	22,03	32,95	20,6	14,6
	45	17,5	13,96	22,01		
	176	ND			10,9	8,0
	48	30,14	25,49	36,8	18,3	16,5
<i>ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	163,28	116,12	237,62	ND	ND
	45	73,57	53,85	103,54	ND	ND
	176	ND			ND	ND
	48	115,99	66,35	523,4	ND	ND

* No hay datos suficientes para estimar los límites superior e inferior para LD50

d) Ensayos de campo

La Tabla 5d muestra el nivel de desgranado de semillas (SHAT), capacidad de cosecha por la cosechadora (CHA1), capacidad de trilla (CHA2), productividad de semillas por parcela tras aplicar la cosechadora (YLDP) y productividad de semillas tras la trilla de la paja (YLDS), determinado como se describe anteriormente para parcelas de campo con plantas *ind* y plantas de tipo salvaje según se indicó. El valor YieldWTSeg% representa la YLDP como un porcentaje del segregante de tipo salvaje en una línea, es decir, en la línea 51, 45, 176 o 48, respectivamente.

5

Tabla 5d

Genotipo	Línea nº	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en g/parcela)	YieldWTS eg%	YLDS (en % en peso de la paja)
<i>IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1</i>	51	8,1	4,9	5,0	2154,7	100	0,6
	45	8,4	4,2	4,8	1868,7	100	0,8
	176	8,1	4,6	5,0	1710,2	100	0,3
	48	7,9	4,7	5,0	1844,2	100	0,5
<i>ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1</i>	51	8,9	2,9	3,8	2450,7	114	4,5
	45	8,8	2,3	3,3	2304,2	123	7,6
	176	8,7	3,9	4,9	2189,6	128	0,6

Genotipo	Línea nº	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (en g/parcela)	YieldWTS eg%	YLDS (en % en peso de la paja)
	48	8,8	4,1	4,9	2419,1	131	1,4
<i>IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	8,9	3,3	4,3	2739,6	127	1,9
	45	8,8	2,6	3,4	2441,6	131	3,4
	176	8,7	4,1	4,9	2071,6	121	0,7
	48	8,8	3,6	4,1	2379,8	129	2,4
<i>ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	9,1	1,2	2,0	515,3	24	27,4
	45	9,0	1,0	2,0	424,4	23	27,4
	176	9,0	1,1	2,6	702,4	41	21,0
	48	9,0	1,0	1,9	447,3	24	27,7

Evaluación microscópica

- 5 - Las vainas procedentes de plantas que comprenden dos alelos *ind* en estado homocigótico derivadas de la línea 45 (genotipo *ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) que se hicieron crecer en condiciones de invernadero mostraron una lignificación a lo largo de toda la zona de dehiscencia y una mala diferenciación de las células que pertenecen a la zona de dehiscencia de los tipos celulares vecinos, tales como las células del tejido vascular y la capa lignificada de células que se encuentra normalmente en la pared interior de las vainas (es decir, las células *enb*) (“fenotipo morfológico fuerte”). Se observó un fenotipo de vainas similar para estas plantas que se hicieron crecer en condiciones de campo. Por el contrario, las zonas de dehiscencia todavía estaban bien diferenciadas y casi nada lignificadas en vainas procedentes de plantas que comprenden dos alelos *ind* en estado homocigótico derivadas de la línea 51 (genotipo *ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) que se hicieron crecer en condiciones de invernadero, pero las zonas de dehiscencia sí mostraron lignificación extra allí donde las paredes de las vainas se juntan (“fenotipo morfológico más débil”). Las vainas procedentes de estas plantas que se hicieron crecer en condiciones de campo mostraron un patrón de lignificación similar al de las vainas procedentes de plantas con genotipo *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1* derivadas de la línea 45 descrita más abajo. Cuando se combinan con los datos obtenidos del RIT, estos datos podrían indicar que estas plantas combinan un “fenotipo morfológico más débil” con una mayor resistencia al desgranado de las vainas.
- 10
- 15
- 20 - Vainas procedentes de plantas que comprenden un alelo *ind* en estado homocigótico y un alelo *ind* en estado heterocigótico derivadas de las líneas 45 y 51 (genotipo: *ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1* o *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) que se hicieron crecer en condiciones de invernadero no mostraron un fenotipo obvio. En condiciones de campo, las vainas procedentes de plantas con genotipo *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1* derivadas de las líneas 45 presentaron un fenotipo morfológico más sutil que las vainas procedentes de otras plantas de sus hermanas mutantes dobles homocigóticas (véase anteriormente). Más específicamente, la lignificación no se produjo a lo largo de la zona de dehiscencia completa, pero las vainas de estas plantas solo presentaron unas pocas capas extras de células lignificadas donde la pared interna de las vainas se une con el tabique, ya sea simétricamente en ambos lados del tabique o solamente de forma unilateral. Se observó un fenotipo de vainas similar para vainas procedentes de plantas con genotipo *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1* derivadas de las líneas 51 que se hicieron crecer en condiciones de campo. Las vainas procedentes de plantas con genotipo *ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1* derivadas de las líneas 45 y 51 no mostraron un fenotipo obvio en condiciones de campo.
- 25
- 30

Ejemplo 7 – Detección y/o transferencia de genes *IND* mutantes en líneas de *Brassica* (élite)

- 35 Los genes *IND* mutantes se transfirieron a líneas de reproducción de *Brassica* (élite) mediante el siguiente método: una planta que contiene un gen *IND* mutante (planta donante) se cruza con una línea de *Brassica* (élite) (progenitor élite/progenitor recurrente) o una variedad que carece del gen *IND* mutante. Se usa el siguiente esquema de introgresión (el gen *IND* mutante se abrevia como *ind*, mientras que el del tipo salvaje se representa como *IND*):

ES 2 543 425 T3

Cruce inicial:	<i>ind / ind</i> (planta donante)	X <i>IND/IND</i> (progenitor élite)
Planta F1:	<i>IND/ind</i>	
Cruce BC1:	<i>IND/ind</i>	X <i>IND/IND</i> (progenitor recurrente)
Plantas BC1:	50% <i>IND/ind</i> y 50% <i>IND/IND</i>	

El 50% *IND/ind* se seleccionan usando marcadores moleculares (, por ejemplo, AFLP, PCR, Invader™, y similares; véase también más abajo) para el alelo *IND* mutante (*ind*).

Cruce BC2:	<i>IND/ind</i> (planta BC1)	X <i>IND/IND</i> (progenitor recurrente)
Plantas BC2:	50% <i>IND/ind</i> y 50% <i>IND/IND</i>	

5 El 50% *IND/ind* se seleccionan usando marcadores moleculares para el alelo *IND* mutante (*ind*).

El retrocruzamiento se repite hasta BC3 a BC6

Plantas BC3-6:	50% <i>IND/ind</i> y 50% <i>IND/IND</i>	
----------------	---	--

El 50% *IND/ind* se seleccionan usando marcadores moleculares para el alelo *IND* mutante (*ind*). Para reducir el número de retrocruzamientos (, por ejemplo, hasta BC3 en lugar de BC6), se pueden usar marcadores moleculares específicos para el antecedente genético del progenitor élite.

10

Cruce BC3-6 S1:	<i>IND/ind</i>	X <i>IND/ind</i>
Plantas BC3-6 S1:	25% <i>IND/IND</i> y 50% <i>IND/ind</i> y 25% <i>ind/ind</i>	

Las plantas que contienen *ind* se seleccionan usando marcadores moleculares para el alelo *IND* mutante (*ind*). Plantas individuales BC3-6 S1 que son homocigóticas para el alelo *IND* mutante (*ind/ind*) se seleccionan usando marcadores moleculares para los alelos *IND* mutante y de tipo salvaje. Estas plantas se usan entonces para la producción de semillas.

15

Para seleccionar plantas que comprenden una mutación de punto en un alelo *IND*, se puede usar la secuenciación directa mediante técnicas de secuenciación estándar conocidas en la técnica, tales como las descritas en el Ejemplo 4. Como alternativa, se pueden desarrollar ensayos de PCR para discriminar plantas que comprenden una mutación de punto específica en un alelo *IND* de plantas que no comprenden esa mutación de punto específica. De este modo, se desarrollaron los siguientes ensayos de PCR discriminantes para detectar la presencia o ausencia y el estado de cigosidad de los alelos mutantes identificados en el Ejemplo 4 (véase la Tabla 4):

20

- ADN molde:
 - ADN genómico aislado de material de hoja de plantas de *Brassica* mutantes homocigóticas o heterocigóticas (que comprenden un alelo *IND* mutante, denominado en lo sucesivo "IND-Xx-EMSXX").
 - Control de ADN de tipo salvaje: ADN genómico aislado de material de hoja de plantas de *Brassica* de tipo salvaje (que comprenden el equivalente de tipo salvaje del alelo *IND* mutante, denominado en lo sucesivo "IND-Xx-WT").
 - Control de ADN positivo: ADN genómico aislado de material de hoja de plantas de *Brassica* mutantes homocigóticas que se sabe que comprenden IND-Xx-EMSXX.

25

30

- Los cebadores y la longitud del fragmento amplificado del gen *IND* diana mutante y de tipo salvaje correspondiente se indican en la Tabla 6. Generalmente, cada conjunto de cebadores consiste en un cebador específico para el gen diana mutante y el de tipo salvaje (, por ejemplo, el cebador POSH101R2 es específico para IND-A1-EMS01 y IND-A1-WT), y un cebador específico para la diferencia nucleotídica (, por ejemplo, el cebador POSH101MF1 es específico para el IND-A1-EMS01 y el cebador POSH101WF1 es específico para IND-A1-WT). Habitualmente, el último nucleótido del último cebador coincide con la diferencia nucleotídica (nucleótido subrayado en la Tabla 6), pero se puede añadir un (o más) nucleótido (o nucleótidos) específicos diana adicionales para mejorar la recombinación entre el cebador y su secuencia diana (véase, por ejemplo,

35

ES 2 543 425 T3

el nucleótido en negrita en el cebador POSH 108MR1', que es específico para el alelo IND-C1-EMS03, en comparación con el cebador POSH 108WR1', que es específico para el alelo IND-C1-WT).

- 5 - Mezcla de PCR: 2,5 µl de tampón de PCR 10x (15 mM de MgCl₂), 0,25 µl de dNTP's (20 mM), 1 µl de cebador directo (10 µM), 1 µl de cebador inverso (10 µM), 0,25 µl de Taq-polimerasa (5 U/µl), 19,5 µl de Milli-Q H₂O, 0,5 µl de ADN (20-50 ng/µl) = volumen total de 25 µl;
- 10 - Perfil de termociclaje: 4 min. a 95°C; 30 x [1 min. a 95°C (desnaturalización) y 1 min. a la temperatura de hibridación especificada en la Tabla 6 y 2 min. a 72°C (alargamiento)]; 5 min. a 72°C; enfriar hasta 4°C. La temperatura de hibridación óptima se determinó mediante PCR de gradiente de temperatura, en la que la temperatura de hibridación se varió entre 57°C a 70°C en un termociclador MJ Research PTC-200 (Biozym). La temperatura de hibridación óptima para los cebadores específicos *IND* de tipo salvaje es aquella temperatura a la que se puede detectar (como se describe más abajo) un fragmento claro de PCR del tamaño esperado para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* de tipo salvaje y no para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* mutante. La temperatura de hibridación óptima para los cebadores específicos *IND* mutantes es aquella temperatura a la que se puede detectar (como se describe más abajo) un fragmento claro de PCR del tamaño esperado para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* mutante y no para la muestra de ADN procedente de la planta de *Brassica* de tipo salvaje.
- 15 - Tras la amplificación, se añadieron 5 µl de colorante de carga (colorante naranja) a 15 µl de las muestras de PCR, y las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1,5%.
- 20 - Los patrones de las bandas obtenidos tras la amplificación de ADN genómico de plantas de *Brassica* mutantes se evaluaron según lo siguiente:
 - Los datos de muestras de ADN aisladas de material de hoja de las plantas de *Brassica* mutantes en un experimento individual de PCR y una sola mezcla de PCR no se deberían de aceptar excepto que:
 - 25 - el control de ADN de tipo salvaje muestre el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT*, y no el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*
 - el control de ADN positivo muestre el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX*, y no el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT*
 - 30 - Las líneas que no muestran ningún producto de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX* indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el ADN molde genómico es un mutante homocigótico para *IND-Xx-EMSXX*.
 - 35 - Las líneas que muestran el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX* indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el ADN molde genómico es un mutante heterocigótico para *IND-Xx-EMSXX*.
 - 40 - Las líneas que muestran el fragmento de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-WT* y ningún producto de PCR del tamaño esperado para el ensayo de PCR específico de *IND-Xx-EMSXX* indican que la planta correspondiente a partir de la que se preparó el ADN molde genómico es una planta de tipo salvaje.

Tabla 6:

Alelo nº	Cebadores	T ^a de hibridación (°C)	Tamaño del fragmento de PCR (pb)
IND-A1-EMS01	5' AAGGGTAAGCGACGACCCT I 3' (POSH101MF1 - SEC ID NO: 13) 5' GAGTGTGAGGCTGAAGAAGC 3' (POSH101R2 - SEC ID NO: 15)	67	191
IND-A1-WT	5' AAGGGTAAGCGACGACCCT C 3' (POSH101WF1 - SEC ID NO: 14) 5' GAGTGTGAGGCTGAAGAAGC 3' (POSH101R2 - SEC ID NO: 15)	71,1	191

ES 2 543 425 T3

Alelo nº	Cebadores	T ^a de hibridación (°C)	Tamaño del fragmento de PCR (pb)
IND-A1-EMS05	5' CCTCAGACGGTGGTGGCTCA <u>A</u> 3' (POSH105MF1 - SEC ID NO: 16) 5' AGGGTCAGACATAGGAGCTC 3' (POSH 101R1 - SEC ID NO: 18)	70	201
IND-A1-WT	5' CCTCAGACGGTGGTGGCTCG <u>G</u> 3' (POSH105WF1 - SEC ID NO: 17) 5' AGGGTCAGACATAGGAGCTC 3' (POSH 101R1 - SEC ID NO: 18)	72	201
IND-C1-EMS01	5' GTGGTTAAAAGAGTTTTCTTA <u>A</u> 3' (POSH106MR1 - SEC ID NO: 19) 5' ATTAGCATGTAAAACACTAG 3' (POSH106F1 - SEC ID NO: 21)	60,6	436
IND-C1-WT	5' GTGGTTAAAAGAGTTTTCTTG <u>G</u> 3' (POSH106WR1 - SEC ID NO: 20) 5' ATTAGCATGTAAAACACTAG 3' (POSH106F1 - SEC ID NO: 21)	62,8	436
IND-C1-EMS03	5' ACGAGCCACCACCGTCTAG <u>A</u> 3' (POSH 108MR1' - SEC ID NO: 22) 5' GTTCAAAGCAGATGCAGCAG 3' (POSH106F2 - SEC ID NO: 24)	70	369
IND-C1-WT	5' ACGAGCCACCACCGTCTG <u>G</u> 3' (POSH 108WR1' - SEC ID NO: 23) 5' GTTCAAAGCAGATGCAGCAG 3' (POSH106F2 - SEC ID NO: 24)	68,9	369

5 Como alternativa, se puede usar la tecnología Invader™ (Third Wave Agbio) para discriminar plantas que comprenden una mutación de punto específica en un alelo *IND* de plantas que no comprenden esa mutación de punto específica. De este modo, se desarrollaron las siguientes sondas Invader™ discriminantes para detectar la presencia o ausencia y el estado de cigosidad de los alelos mutantes identificados en el Ejemplo 4 (véase la Tabla 7):

- En la Tabla 7 se indican sondas específicas para el gen *IND* diana mutante o de tipo salvaje correspondiente (indicado como “5' flap1-x” y “5' flap2-x”, respectivamente) y sondas “invasoras” que se pueden usar en combinación con ellas. Generalmente, cada conjunto de sondas consiste en una sonda específica para el gen diana mutante o el de tipo salvaje del cual el primer nucleótido tras la secuencia de aleta en 5' coincide con la diferencia nucleotídica (nucleótido subrayado en la Tabla 7) (la denominada “sonda primaria”; , por ejemplo, la sonda con SEC ID NO: 26 es específica para IND-A1-EMS01 y la sonda con SEC ID NO: 27 es específica para IND-A1-WT), y una sonda específica para los nucleótidos en dirección 5' de la diferencia nucleotídica (el denominado “oligo invader®”; , por ejemplo, la sonda con SEC ID NO: 25 es específica para los nucleótidos en dirección 5' de la diferencia nucleotídica entre IND-A1-EMS01 e IND-A1-WT). El último nucleótido del último cebador puede coincidir con la diferencia nucleotídica en el mutante (como se indica mediante los nucleótidos en negrita en la Tabla 6), pero igualmente se pueden usar otros nucleótidos para este último nucleótido en tanto que la sonda primaria y el oligo invader® sean todavía capaces de formar un solapamiento de una sola base cuando se hibridan al ADN diana para generar la estructura invasiva específica reconocida por las enzimas Cleavase® (Third Wave Agbio).
- El procedimiento de ensayo Invader™ y la interpretación de los datos se llevan a cabo como se prescribe por el fabricante (Third Wave Agbio). De forma breve, las secuencias nucleotídicas indicadas como “flap1” y “flap2” en la Tabla 7 representan las secuencias de las “aletas” en 5' que se escinden de las sondas primarias en la fase primaria del ensayo Invader™ y que son complementarias a las secuencias en el casete 1 y 2 FRET™, respectivamente, y no complementarias a las secuencias mutantes o de tipo salvaje diana. Si las sondas primarias se escinden en la fase primaria y la sonda flap1 y/o la sonda flap2 se hibrida al casete 1 y 2

ES 2 543 425 T3

de FRET™, respectivamente, en la fase secundaria, se genera una señal indicativa de la presencia del gen *IND* diana mutante o de tipo salvaje correspondiente en la muestra, respectivamente.

Tabla 7

Alelo nº	Sondas	
IND-A1-EMS01	5' GCCGACGAGCCACCACCGTCTT 3'	(SEC ID NO: 25)
	5' flap1- <u>A</u> AGGGTCGTCGCTT 3'	(SEC ID NO: 26)
IND-A1-WT	5' GCCGACGAGCCACCACCGTCTT 3'	(SEC ID NO: 25)
	5' flap2- <u>G</u> AGGGTCGTCGCT 3'	(SEC ID NO: 27)
IND-A 1-EMS05	5' CGGATCTTCTCGCTTATCCTTTCTCTACGCCGAA 3'	(SEC ID NO: 28)
	5' flap1- <u>T</u> GAGCCACCACCG 3'	(SEC ID NO: 29)
IND-A1-WT	5' CGGATCTTCTCGCTTATCCTTTCTCTACGCCGAA 3'	(SEC ID NO: 28)
	5' flap2- <u>C</u> GAGCCACCACCG 3'	(SEC ID NO: 30)
IND-C1-EMS01	5' AGGTGGATCTACCATGAAATGAGGATTGTGGTT AAAAGAGTTTTCTTT 3'	(SEC ID NO: 31)
	5' flap1- <u>A</u> TGTAATGAGATCAATAGGTTTG 3'.	(SEC ID NO: 32)
IND-C1-WT	5' AGGTGGATCTACCATGAAATGAGGATTGTGGTT AAAAGAGTTTTCTTT 3'	(SEC ID NO: 31)
	5' flap2- <u>G</u> TGTAATGAGATCAATAGGTTTG 3'	(SEC ID NO: 33)
IND-C1-EMS03	5' CCGTAACGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCA 3'	(SEC ID NO: 34)
	5' flap1- <u>T</u> AGACGGTGGTGGC 3'	(SEC ID NO: 35)
IND-C1-WT	5' CCGTAACGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCA 3'	(SEC ID NO: 34)
	5' flap2- <u>C</u> AGACGGTGGTGGC 3'	(SEC ID NO: 36)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer BioScience N.V.

<120> Planta de Brassica que comprende un alelo INDEHISCENT mutante

<130> BCS 07-2014

5 <160> 40

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 558

<212> ADN

10 <213> Secuencia codificante IND-A1 de tipo salvaje de Brassica napus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(555)

<400> 1

atg tct ggc tca aaa gca gat gca gcc ata gcc cca ata gtc atg atg	48
Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met	
1 5 10 15	
gag cat cat cat ctc ctt atg aat tgg aac aaa cct att gat ctc att	96
Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile	
20 25 30	
aca gaa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc ata gta gat cca	144
Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro	
35 40 45	
cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg aca atc ttc tcc	192
Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser	
50 55 60	
gat cac gga gga gga gag gaa gca gaa gaa gaa gaa gaa gaa gaa gga	240
Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly	
65 70 75 80	
gag gaa gag atg gat ccg atg aag aag atg caa tac gcg att gct gcc	288
Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala	
85 90 95	
atg cag ccc gta gac ctc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac cgc	336
Met Gln Pro Val Arg Val Ser Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg	
100 105 110	
cg t aac gta agg gta agc gac gac cct cag acg gtg gtg gct cgt cgg	384
Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg	
115 120 125	
cg t aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg gtg	432
Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val	
130 135 140	
cca gcc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctc gac gaa gcc atc	480
Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile	
145 150 155 160	
cg c tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg cta gct tct tca gcc	528
Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala	
165 170 175	
tca cac tca gct tgg agc tcc tat gtc tga	558
Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val	

180

185

15

ES 2 543 425 T3

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Secuencia codificante IND-A1 de tipo salvaje de Brassica napus

5 <400> 2

Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met
1 5 10 15

Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile
20 25 30

Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro
35 40 45

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser
50 55 60

Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly
65 70 75 80

Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala
85 90 95

Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg
100 105 110

Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg
115 120 125

Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val
130 135 140

Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile
145 150 155 160

Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala
165 170 175

ser His ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val
180 185

<210> 3

<211> 633

<212> ADN

10 <213> Secuencia codificante IND-C1 de tipo salvaje de Brassica napus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(630)

<400> 3

ES 2 543 425 T3

atg tat aaa aga aag gtc tat gcg tct cta gtc caa aaa ctc tat atg 48
 Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met
 1 5 10 15

tct ggt tca aaa gca gat gca gca gcc ata gcc cca ata gtc atg atg 96
 Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met
 20 25 30

gag cct cat cat ctc ctt atg aac tgg aac aaa cct att gat ctc att 144
 Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile
 35 40 45

aca caa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc atg gta gat cca 192
 Thr Gln Glu Asn Ser Phe Ser His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro
 50 55 60

cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg aca gtc ttc tcc 240
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Thr Val Phe Ser
 65 70 75 80

gat ccc gga gga gga gag gaa gca gaa gac gaa gaa gga gag gaa gag 288
 Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu
 85 90 95

ata gat gag atg aag gag atg caa tac gcg att gct gcc atg cag ccc 336
 Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala Met Gln Pro
 100 105 110

gta gac atc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac cgc cgt aac gta 384
 Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val
 115 120 125

agg gta agc gag gac ccc cag acg gtg gtg gct cgt cgg cgt aga gaa 432
 Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu
 130 135 140

agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg gtg cca ggc ggt 480
 Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly
 145 150 155 160

gca aag atg gac act gcc tcc atg ctt gac gaa gcc atc cgc tac acc 528
 Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr
 165 170 175

aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg ctt ctt cag cct cac act cag ctt 576
 Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu
 180 185 190

ggg gct cct atg tct gac cct tct cgc ctt tgt tat tac cac aac tcg 624
 Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser
 195 200 205

gat acc taa 633
 Asp Thr
 210

<210> 4

<211> 210

<212> PRT

5 <213> Secuencia codificante IND-C1 de tipo salvaje de Brassica napus

<400> 4

Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met

ES 2 543 425 T3

20 25 30
 Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile
 35 40 45
 Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro
 50 55 60
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Val Phe Ser
 65 70 75 80
 Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu
 85 90 95
 Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala Met Gln Pro
 100 105 110
 Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val
 115 120 125
 Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu
 130 135 140
 Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly
 145 150 155 160
 Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr
 165 170 175
 Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu
 180 185 190
 Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser
 195 200 205

Asp Thr
210

<210> 5

<211> 1622

<212> ADN

5 <213> Secuencia genómica IND-A1 de tipo salvaje de Brassica napus

<220>

<221> CDS

<222> (561)..(1118)

<400> 5

ttgacaatc tacatacata accaacaatac agtagaatac cttgaaaatc taaaacccaa 60
 aatatgatgt aaaactcaag cttggtccag agcataaaaa aattaaagcc atcgctttgg 120
 tatcacatat ttaaacgtca gttttttttt tttttttggg gggggggggg ggggtaatat 180
 10 aaaaatataa ttaacaataa aaaattatga aacaattagc atgtaaaaca ctaatctttt 240

ES 2 543 425 T3

<211> 185

<212> PRT

<213> Secuencia genómica IND-A1 de tipo salvaje de Brassica napus

<400> 6

Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met
 1 5 10 15
 Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile
 20 25 30
 Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro
 35 40 45
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser
 50 55 60
 Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly
 65 70 75 80
 Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala
 85 90 95
 Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg
 100 105 110
 Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg
 115 120 125
 Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile
 145 150 155 160
 Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala
 165 170 175
 Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val
 180 185

5

<210> 7

<211> 1593

<212> ADN

<213> Secuencia genómica IND-C1 de tipo salvaje de Brassica napus

10

<220>

<221> CDS

<222> (497)..(1126)

<400> 7

ES 2 543 425 T3

tgccatacat aaccacggat catagtcgac acctcaacgt gaagcaaatt tgacaatcta	60
catacataac caacaaaaag tagaataccg tgaaaaccta aaccctaaat atgatgtaa	120
actcaagctt ggtccagagc ataaaaaaat taaagccatc gctttggat cacatattta	180
aacgtcagtt ttttttggg gaagtaatat aaaaatataa ttaacaagaa aatttatgaa	240
ataattagca tgtaaacac tagtcttttg gttgtgacaa aacgttttca caaatgttct	300
ataaataaat tcaagcacat tttatctgca aaatatatac tttcactcat aaaataagag	360
cgttttaaac attcatatac gcactacatt gacatgacaa aagaaatccg caaatacaaa	420
catatttagt tcggatatac ctaggaaata agactatatt atatatataa agaaattaga	480
aaaaaagaaa attggt atg tat aaa aga aag gtc tat gcg tct cta gtc caa	532
Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln	
1 5 10	
aaa ctc tat atg tct ggt tca aaa gca gat gca gca gcc ata gcc cca	580
Lys Leu Tyr Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro	
15 20 25	
ata gtc atg atg gag cct cat cat ctc ctt atg aac tgg aac aaa cct	628
Ile Val Met Met Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro	
30 35 40	
att gat ctc att aca caa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc	676
Ile Asp Leu Ile Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe	
45 50 55 60	
atg gta gat cca cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg	724
Met Val Asp Pro Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro	
65 70 75	
aca gtc ttc tcc gat ccc gga gga gga gag gaa gca gaa gac gaa gaa	772
Thr Val Phe Ser Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu	
80 85 90	
gga gag gaa gag ata gat gag atg aag gag atg caa tac gcg att gct	820
Gly Glu Glu Glu Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala	
95 100 105	
gcc atg cag ccc gta gac atc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac	868
Ala Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn	
110 115 120	
cgc cgt aac gta agg gta agc gag gac ccc cag acg gtg gtg gct cgt	916
Arg Arg Asn Val Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg	
125 130 135 140	
cgg cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg	964
Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met	
145 150 155	
gtg cca ggc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctt gac gaa gcc	1012
Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala	
160 165 170	
atc cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg ctt ctt cag cct	1060
Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro	
175 180 185	

ES 2 543 425 T3

cac act cag ctt ggg gct cct atg tct gac cct tct cgc ctt tgt tat 1108
 His Thr Gln Leu Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr
 190 195 200

tac cac aac tcg gat acc taattataat tctatcacgc gtttcatggt 1156
 Tyr His Asn Ser Asp Thr
 205 210

gatatatata gataaatggt tgaataagga tttcgatcga agattgtatg gctattgatt 1216

acattatata ttgtacaata aatgatgtgt gtatttctat taatgtatat atgatatata 1276

tctgtttgca gtatgcattt atattctatt ctttataggg aggcaacatg ccggattagg 1336

gctttgatcg tatgcaagtt ttccgaccaa aaatatgaaa tacttgtttg gatataacat 1396

atgaatcgga taagtgttac tagttatata actggaaaaa attgtttgggt ataagaattc 1456

ccgggagaac caagcctttc tctaaccct aagatcatag ctactgaaat aatgaaaaa 1516

aacaaaaaaa aaacaatgaa gaatcagttg ggcattagtc caaaaaaaa aaagaatcag 1576

ttggattgct tataaaa 1593

<210> 8

<211> 210

<212> PRT

5 <213> Secuencia genómica IND-C1 de tipo salvaje de Brassica napus

<400> 8

Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met
 20 25 30

Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile
 35 40 45

Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro
 50 55 60

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Val Phe Ser
 65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu
 85 90 95

Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala Met Gln Pro
 100 105 110

Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val
 115 120 125

Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu
 130 135 140

ES 2 543 425 T3

Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly
145 150 155 160

Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr
165 170 175

Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu
180 185 190

Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser
195 200 205

Asp Thr
210

<210> 9

<211> 597

<212> ADN

5 <213> IND1 de *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<400> 9

atg gaa aat ggt atg tat aaa aag aaa gga gtg tgc gac tct tgt gtc 48
Met Glu Asn Gly Met Tyr Lys Lys Lys Gly Val Cys Asp Ser Cys Val
1 5 10 15

tcg tcc aaa agc aga tcc aac cac agc ccc aaa aga agc atg atg gag 96
Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asn His Ser Pro Lys Arg Ser Met Met Glu
20 25 30

cct cag cct cac cat ctc ctc atg gat tgg aac aaa gct aat gat ctt 144
Pro Gln Pro His His Leu Leu Met Asp Trp Asn Lys Ala Asn Asp Leu
35 40 45

ctc aca caa gaa cac gca gct ttt ctc aat gat cct cac cat ctc atg 192
Leu Thr 50 Gln Glu His Ala 55 Phe Leu Asn Asp Pro His His Leu Met
60

tta gat cca cct ccc gaa acc cta att cac ttg gac gaa gac gaa gag 240
Leu Asp Pro Pro Pro Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Glu Asp Glu Glu
65 70 75 80

tac gat gaa gac atg gat gcg atg aag gag atg cag tac atg atc gcc 288
Tyr Asp Glu Asp Met Asp Ala Met Lys Glu Met Gln Tyr Met Ile Ala
85 90 95

gtc atg cag ccc gta gac atc gac cct gcc acg gtc cct aag ccg aac 336
Val Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn
100 105 110

cgc cgt aac gta agg ata agc gac gat cct cag acg gtg gtt gct cgt 384
Arg Arg Asn Val Arg Ile Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg
115 120 125

cgg cgt cgg gaa agg atc agc gag aag atc cga att ctc aag agg atc 432
Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Ile
130 135 140

10 gtg cct ggt ggt gcg aag atg gac aca gct tcc atg ctc gac gaa gcc 480
Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala

ES 2 543 425 T3

<212> ADN

<213> Secuencia nucleotídica de un homólogo INDEHISCENT de Brassica napus

(Bn1-IND - SEC ID NO: 2 del documento WO04/113542)

<400> 11

```
gaattcgccc ttcgcatgta taaaaagaag ggtctatgcg tctctagtcc aaaaactcta      60
tatgtctggt tcaaaagcag atgcagcagc catagcccca atagtcatga tggagcctca      120
tcatctcctt atgaactgga acaaacctat tgatctcatt acacaagaaa actcttttaa      180
ccacaatcct catttcatgg tagatccacc ttccgaaacc ctaagccact tccagccccc      240
gccgacagtc ttctccgac cccggaggagg agaggaagca gaagacgaag aaggagagga      300
agagatagat gagatgaagg agatgcaata cgcgattgct gccatgcagc ccgtagacat      360
cgatccagcc accgttccta agccgaaccg ccgtaacgta agggtaagcg aggaccccca      420
gacggtggtg gctcgtcggc gtagagaaag gataagcgag aagatccgga tattgaagag      480
gatggtgcca ggcggtgcaa agatggacac tgcctccatg cttgacgaag ccatccgcta      540
caccaagttc ttgaaacggc aggtgaggct tcttcagcct cacactcagc ttggggctcc      600
5  tatgtctgac ccttctcgcc tttgttatta ccacaactct caa                        643
```

<210> 12

<211> 660

<212> ADN

<213> Secuencia nucleotídica de un segundo homólogo INDEHISCENT de Brassica napus

10 (Bn2-IND - SEC ID NO: 3 del documento WO04/113542)

<400> 12

```
gaattcgccc ttggcatgta caagaagaaa ggtctatgcg tctctagtcc aaaaactcta      60
tatatgtctg gctcaaaagc agatgcagcc atagcccca tagtcatgat ggagcatcat      120
catctcctta tgaattggaa caaacctatt gatctcatta cagaagaaaa ctcttttaac      180
cacaatcctc atttcatagt agatccacct tccgaaacct taagccactt ccagcccccg      240
ccgacaatct tctccggtca cggaggagga gaggaagcag cagaagaaga agaagaagaa      300
ggagaggaag agatggatcc gatgaagaag atgcaatacg cgattgctgc catgcagccc      360
gtagacctcg atccagccac cgttcctaag ccgaaccgcc gtaacgtaag ggtaagcgac      420
gaccctcaga cggtggtggc tcgtcggcgt agagaaagga taagcgagaa gatccggata      480
ttgaggagga tggtgccagg cggtgcaaag atggacactg cctccatgct cgacgaagcc      540
atccgctaca ccaagttctt gaaacggcag gtgaggctag cttcttcagc ctcaactca      600
gcttggagct cctatgtctg acccttcttg cctttgttat tatcataact cgcagccctg      660
```

<210> 13

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido directo para detección de IND-A1-EMS01

<400> 13
aaggtaagc gacgaccctt 20
<210> 14
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido directo para detección de IND-A1-WT
<400> 14
10 aaggtaagc gacgaccctc 20
<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido inverso para detección de IND-A1-EMS01 y -WT
<400> 15
gagtgtgagg ctgaagaagc 20
<210> 16
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido directo para detección de IND-A1-EMS05
25 <400> 16
cctcagacgg tggggctca 20
<210> 17
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido directo para detección de IND-A1-WT
<400> 17
cctcagacgg tggggctcg 20
35 <210> 18
<211> 20
<212> ADN

ES 2 543 425 T3

<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido inverso para detección de IND-A1-EMS05 y -WT
<400> 18
5 agggtcagac ataggagctc 20
<210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-EMS01
<400> 19
gtggtaaana gagtttctt a 21
<210> 20
15 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-WT
20 <400> 20
gtggtaaana gagtttctt g 21
<210> 21
<211> 20
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido directo para detección de IND-C1-EMS01 y -WT
<400> 21
attagcatgt aaaacactag 20
30 <210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
35 <223> oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-EMS03
<400> 22
acgagccacc accgtctag 19

- <210> 23
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> oligonucleótido inverso para detección de IND-C1-WT
<400> 23
acgagccacc accgtctg 18
<210> 24
- 10 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido directo para detección de IND-C1-EMS03 y -WT
- 15 <400> 24
gttcaaaagc agatgcagca g 21
<210> 25
<211> 22
<212> ADN
- 20 <213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS01 y -WT
<400> 25
gccgacgagc caccaccgtc tt 22
- 25 <210> 26
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- 30 <223> oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS01
<400> 26
aagggtcgtc gctt 14
<210> 27
<211> 13
- 35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>

- <223> oligonucleótido para detección de IND-A1-WT
<400> 27
gagggtcgtc gct 13
<210> 28
- 5 <211> 34
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- <223> oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS05 y -WT
10 <400> 28
cggatcttct cgcttatcct ttctctacgc cgaa 34
<210> 29
<211> 13
<212> ADN
- 15 <213> Artificial
<220>
- <223> oligonucleótido para detección de IND-A1-EMS05
<400> 29
tgagccacca ccg 13
- 20 <210> 30
<211> 13
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- 25 <223> oligonucleótido para detección de IND-A1-WT
<400> 30
cgagccacca ccg 13
<210> 31
<211> 48
- 30 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
- <223> oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS01 y -WT
<400> 31
- 35 aggtggatct accatgaaat gaggattgtg gttaaagag tttcttt 48
<210> 32
<211> 23

- <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS01
- 5 <400> 32
atgtaatgag atcaataggt ttg 23
<210> 33
<211> 23
<212> ADN
- 10 <213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para detección de IND-C1-WT
<400> 33
gtgtaatgag atcaataggt ttg 23
- 15 <210> 34
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- 20 <223> oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS03 y -WT
<400> 34
ccgtaacgta aggtaagcg aggaccca 29
<210> 35
<211> 14
- 25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para detección de IND-C1-EMS03
<400> 35
- 30 tagacggtgg tggc 14
<210> 36
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial
- 35 <220>
<223> oligonucleótido para detección de IND-C1-WT
<400> 36

cagacggtgg tggc 14

<210> 37

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido directo para detección de IND-A1

<400> 37

aggagaggaa gagatgatc c 21

10 <210> 38

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido inverso para detección de IND-A1

<400> 38

tgagtgtag gctgaagaag c 21

<210> 39

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido directo para detección de IND-C1

<400> 39

25 cctcatcatc tcctatgaa c 21

<210> 40

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido inverso para detección de IND-C1

<400> 40

cgtattgcat ctcctcatc t 21

REIVINDICACIONES

1. Una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *IND* en dos loci, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, caracterizada por que comprende al menos dos alelos *IND* mutantes en un locus en su genoma, en la que dichos alelos *IND* mutantes son alelos mutantes de un gen que codifica una proteína *IND* funcional, en la que el gen *IND* funcional comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 a. una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 hasta el nucleótido en la posición 633, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, o SEC ID NO: 7; y
- 10 b. una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 hasta el aminoácido en la posición 210 o SEC ID NO: 4,
- en la que dichos alelos *IND* mutantes comprenden una región de ADN mutada que consiste en uno o más nucleótidos insertados, suprimidos o sustituidos en comparación con una región de ADN de tipo salvaje correspondiente en el gen *IND* funcional, y en la que dichos alelos *IND* mutantes no codifican una proteína *IND* funcional.
- 15 2. La planta de la reivindicación 1, en la que dichos alelos *IND* mutantes son alelos *IND* en los que el codón de aminoácidos que corresponde a la posición 122 en SEC ID NO: 2, a la posición 50 en SEC ID NO: 4 o a la posición 135 en SEC ID NO: 4 está sustituido por un codón de PARADA, o en la que los codones ASP y ARG que corresponden a la posición 103 y 127 en SEC ID NO: 2, respectivamente, están sustituidos por codones ASN y HIS.
- 20 3. La planta de la reivindicación 1, caracterizada por que comprende al menos tres alelos *IND* mutantes en su genoma, en la que dichos alelos *IND* mutantes son alelos mutantes de un gen que codifica una proteína *IND* funcional, en la que el gen *IND* funcional comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 a. una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 desde el nucleótido en la posición 46 hasta el nucleótido en la posición 633, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 5, o SEC ID NO: 7; y
- 30 b. una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4 desde el aminoácido en la posición 16 hasta el aminoácido en la posición 210 o SEC ID NO: 4,
- en la que dichos alelos *IND* mutantes comprenden una región de ADN mutada que consiste en uno o más nucleótidos insertados, suprimidos o sustituidos en comparación con una región de ADN de tipo salvaje correspondiente en el gen *IND* funcional, y en la que dichos alelos *IND* mutantes no codifican una proteína *IND* funcional.
- 35 4. La planta según la reivindicación 3, en la que dichos alelos *IND* mutantes son alelos *IND* en los que el codón de aminoácidos que corresponde a la posición 122 en SEC ID NO: 2, a la posición 50 en SEC ID NO: 4 o a la posición 135 en SEC ID NO: 4 está sustituido por un codón de PARADA, o en los que los codones ASP y ARG que corresponden a la posición 103 y 127 en SEC ID NO: 2, respectivamente, están sustituidos por codones ASN y HIS.
- 40 5. La planta según la reivindicación 3 o 4, en la que el desgranado de semillas de la planta está significativamente reducido o retrasado en comparación con el desgranado de semillas de una planta correspondiente que no comprende alelos *IND* mutantes.
6. La planta según la reivindicación 5, que mantiene una capacidad de trilla agrónomicamente relevante de las vainas.
- 45 7. La planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la productividad de semillas de la planta está incrementada, preferiblemente significativamente incrementada en comparación con la productividad de semillas de una planta correspondiente que no comprende alelos *IND* mutantes.
8. Una vaina de semillas obtenible de una planta según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la semilla de la vaina de semillas comprende al menos dos alelos *IND* mutantes como se describe en la reivindicación 1 o 2.
- 50 9. Un método para detectar la presencia de al menos dos alelos *IND* mutantes en una planta de *Brassica*, comprendiendo dicho método identificar al menos dos alelos *IND* mutantes como se describe en la reivindicación 1 o 2 en una muestra biológica, en el que un alelo *IND* mutante se identifica determinando la presencia de la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante en un ácido nucleico presente en la muestra biológica.

10. El método según la reivindicación 9, que comprende además someter la muestra biológica a una reacción en cadena de la polimerasa o un ensayo de hibridación usando un conjunto de dos cebadores o sondas, seleccionándose dicho conjunto del grupo que consiste en:

- 5 - un conjunto de cebadores o sondas, en el que uno de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente una región de ADN que flanquea en 5' la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante, y el otro de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente una región de ADN que flanquea en 3' la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante,
- 10 - un conjunto de cebadores o sondas, en el que uno de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente una región de ADN que flanquea en 5' o en 3' la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante, y el otro de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante,
- 15 - un conjunto de cebadores o sondas, en el que uno de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente una región de ADN que flanquea en 5' o en 3' la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante, y el otro de dichos cebadores o sondas reconoce específicamente la región de unión entre la región de flanqueo en 3' o en 5' y la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante, respectivamente, y
- una sonda que reconoce específicamente la región de unión entre una región de ADN que flanquea en 5' o en 3' la región de ADN mutada y la región de ADN mutada del alelo *IND* mutante.

11. El método según la reivindicación 10, en el que

- 20 - dicha región de ADN de flanqueo en 5' o en 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 923 o 925 al 1622 o de su complemento, respectivamente; dicha región de ADN mutada tiene la secuencia nucleotídica de nucleótido 924 de SEC ID NO: 5 o de su complemento; y dicha región de unión comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 924 o 924 al 1622 o de su complemento, respectivamente, o
- 25 - dicha región de ADN de flanqueo en 5' o en 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 866 u 868 al 1622 o de su complemento, respectivamente, o de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 939 o 941 al 1622 o de su complemento, respectivamente; dicha región de ADN mutada tiene la secuencia nucleotídica de nucleótido 867 de SEC ID NO: 5 o de su complemento, o de nucleótido 940 de SEC ID NO: 5 o de su complemento; y dicha región de unión comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 867 u 867 al 1622 o de su complemento, o de SEC ID NO: 5 desde el nucleótido 1 al 940 o 940 al 1622 o de su complemento, respectivamente, o
- 30 - dicha región de ADN de flanqueo en 5' o en 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 643 o 645 al 1593 o de su complemento, respectivamente; dicha región de ADN mutada tiene la secuencia nucleotídica de nucleótido 644 de SEC ID NO: 7 o de su complemento; y dicha región de unión comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 644 o 644 al 1593 o de su complemento, respectivamente, o
- 35 - dicha región de ADN de flanqueo en 5' o en 3' comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 898 o 900 al 1593 o de su complemento, respectivamente; dicha región de ADN mutada tiene la secuencia nucleotídica de nucleótido 899 de SEC ID NO: 7 o de su complemento; y dicha región de unión comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 7 desde el nucleótido 1 al 899 u 899 al 1593 o de su complemento, respectivamente.
- 40

12. El método según la reivindicación 10 u 11, en el que dicho conjunto de cebadores o sondas se selecciona del grupo que consiste en:

- 45 - un conjunto de cebadores que comprende un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 13 y/o un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 15,
- un conjunto de cebadores que comprende un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 16 y/o un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 18,
- un conjunto de cebadores que comprende un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 19 y/o un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 21,
- 50 - un conjunto de cebadores que comprende un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 22 y/o un cebador que comprende la secuencia de SEC ID NO: 24,
- un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 25 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 26,

ES 2 543 425 T3

- un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 28 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 29,
- un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 31 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 32, y
- 5 - un conjunto de sondas que comprende una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 34 y/o una sonda que comprende la secuencia de SEC ID NO: 35.

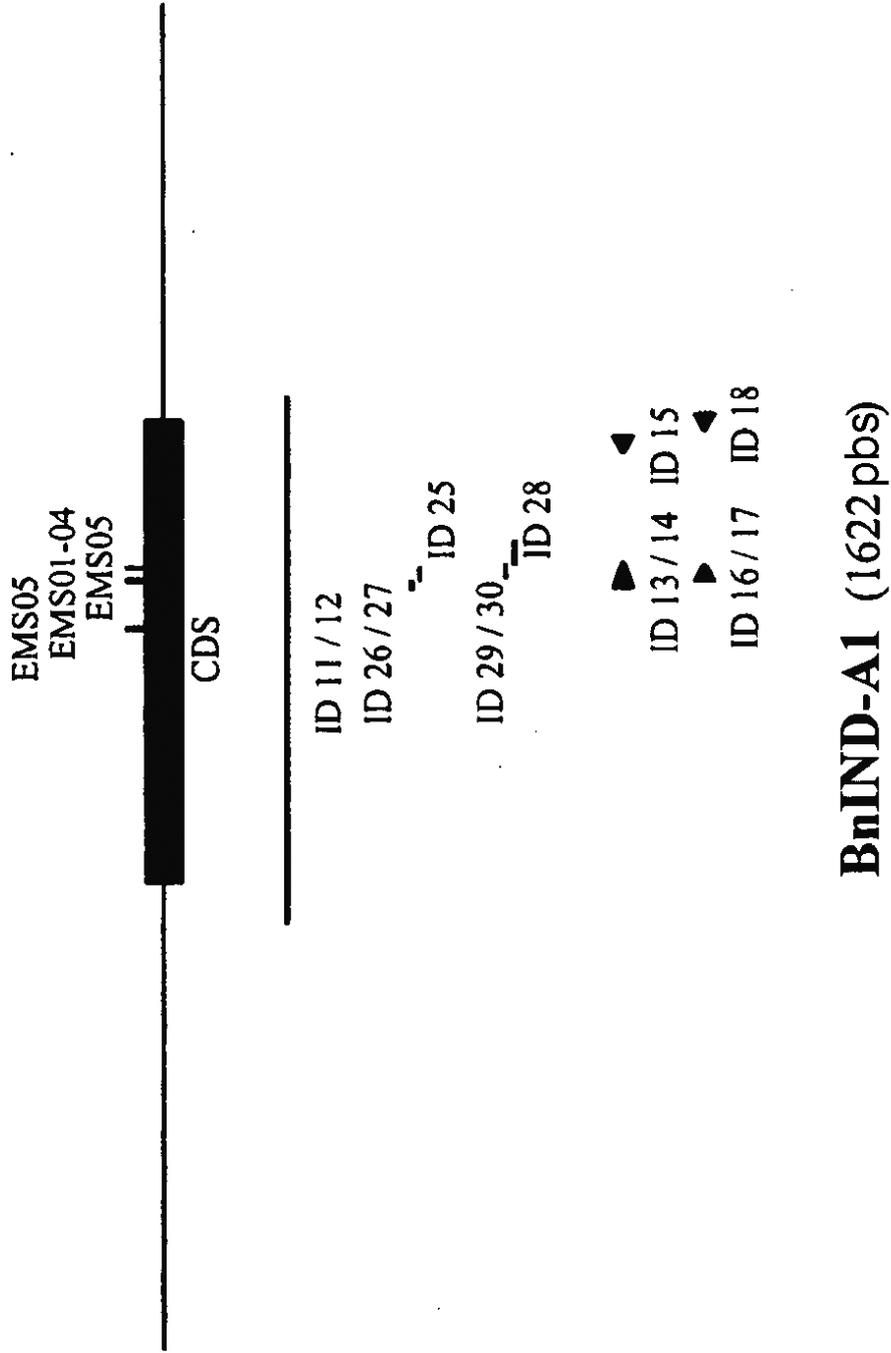


Figura 1



Figura 2

BnIND-C1 (1593 pbs)