

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 539**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10781843 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2501804**

54 Título: **Plantas de Brassica que comprenden alelos FAD3 mutantes**

30 Prioridad:

20.11.2009 US 263042 P
23.11.2009 EP 09075513

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2016

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)
J.E. Mommaertsiaan 14
1831 Diegem, BE

72 Inventor/es:

LAGA, BENJAMIN y
DENOLF, PETER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 575 539 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

Plantas de Brassica que comprenden alelos *FAD3* mutantes

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a plantas y partes de cultivo, en particular de la familia *Brassicaceae*, en particular especies de *Brassica*, con composición de ácidos grasos mejorada, más específicamente, con contenido reducido en ácido alfa-linolénico en la semilla. Esta invención también se refiere a una ácido graso desaturasa y a ácidos nucleicos que codifican proteínas desaturasa. Más particularmente, esta invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican proteínas delta-15 ácido graso desaturasa, y mutantes de las mismas, que afectan a la composición de ácidos grasos en el aceite de semillas de plantas. También se proporcionan métodos para identificar marcadores moleculares asociados con un contenido reducido de ácido alfa-linolénico en semillas en una población de plantas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los aceites vegetales son cada vez más importantes económicamente porque se utilizan ampliamente en las dietas humanas y animales y en muchas aplicaciones industriales. Sin embargo, las composiciones de ácidos grasos de estos aceites a menudo no son óptimas para muchos de estos usos. Debido a que se necesitan aceites especiales con especial composición de ácidos grasos tanto para fines nutricionales como industriales, existe un interés considerable en la modificación de la composición del aceite mediante el cultivo de plantas y/o mediante nuevas herramientas moleculares de la biotecnología vegetal.

20 Los atributos de comportamiento y salud específicos de aceites comestibles se determinan en gran medida por su composición de ácidos grasos. La mayoría de los aceites vegetales derivados de variedades vegetales comerciales se componen principalmente de los ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3). Los ácidos palmítico y esteárico son, respectivamente, ácidos grasos saturados de 16 a 18 carbonos de longitud. Los ácidos oleico, linoleico y linolénico son ácidos grasos insaturados de 18 carbonos de longitud que contienen uno, dos y tres dobles enlaces, respectivamente. Al ácido oleico se le alude como un ácido graso mono-insaturado, mientras que a los ácidos linoleico y linolénico se les alude como ácidos grasos poli-insaturados.

30 Especies de Brassica tales como Brassica napus (*B. napus*) y Brassica rapa (*B. rapa*) constituyen la tercera fuente más importante de aceite vegetal en el mundo. En Canadá, los científicos de plantas centraron sus esfuerzos en la creación de las denominadas variedades "doble bajas", que eran bajas en ácido erúico en el aceite de semilla y bajas en glucosinolatos en la harina sólida que queda después de la extracción del aceite (es decir, un contenido en ácido erúico inferior de 2,0 por ciento en peso, basado en el contenido total de ácidos grasos (denominado aquí en lo que sigue % en peso), y un contenido en glucosinolato inferior a 30 micromoles por gramo de la harina libre de aceite). Estas formas de mayor calidad de colza desarrolladas en Canadá se conocen como canola.

35 El aceite extraído de variedades naturales y anteriormente comercialmente útiles de canola contiene un contenido relativamente alto (8% -10%) de ácido alfa-linolénico (C18:3) (solicitud de patente de EE.UU. 20080034457). También se ha informado de valores más altos de, p. ej., 11% (http://www.canolacouncil.org/canola_oil_properties_and_uses.aspx). Este ácido graso trienoico es inestable y se oxida fácilmente durante la cocción lo cual, a su vez, crea malos sabores del aceite (Gaillard, 1980, Vol. 4, págs. 85-116 En: Stumpf, P.K., comp. The Biochemistry of Plants, Academic Press, Nueva York). También desarrolla malos olores y sabores rancios durante el almacenamiento (Hawrysh, 1990, Stability of canola oil, Capítulo 7, págs. 99-122 En: F. Shahidi, comp. Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition, and Processing Technology, Van Nostrand Reinhold, Nueva York). Tanto el sabor como la calidad nutricional del aceite se mejora reduciendo los niveles de C18:3 en favor de C18:2 (Diepenbrock y Wilson, Crop Sci 27:75-77, 1987).

45 Se sabe que la reducción del nivel de contenido en ácido alfa-linolénico mediante hidrogenación aumenta la estabilidad oxidativa del aceite. Desgraciadamente, la hidrogenación química conduce a la formación de ácidos grasos trans, que se han relacionado con niveles elevados de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL o colesterol "malo") en la sangre y, en consecuencia, a un mayor riesgo de enfermedad coronaria.

50 Otra estrategia para mejorar la calidad del aceite es por el cultivo de variedades bajas en linolénico, que es particularmente desafiante, puesto que el contenido en C18:3 es un rasgo de múltiples genes y es heredado de manera recesiva, con una heredabilidad relativamente baja (documento WO 04072259). Burns et al. (Heredity 90:39-48, 2003) identificaron cinco loci de rasgos cualitativos (QTL) asociados con el contenido en C18:3 en *B. napus*, de

los cuales tres con efecto positivo se encuentra en N6, N7 y N18, y dos con efecto negativo en N7 y N11. El análisis genético de una población derivada del cruce entre "Stellar" (que tiene un bajo contenido en C18:3 (3%)) y "Drakkar" (que tiene un nivel "convencional" de C18:3 (9-10%)) indicó que el rasgo C18:3 bajo fue controlado por dos loci principales con efectos aditivos, designados L1 y L2 (Jourden *et al.*, Euphytica 90:351-357, 1996). Se encontró que estos dos loci principales que controlan el contenido de C18:3 corresponden a dos genes *FAD3* (ácido graso desaturasa 3); uno situado en un genoma A (procedente de *Brassica rapa*) en N4 y el otro en el genoma C (procedentes de *Brassica oleracea*) en N14 (Jourden *et al.*, Theor Appl Genet 93:512-518, 1996; Barret *et al.*, GCIRC, 1999).

Variedades de canola con mutaciones en el gen *FAD3* se han descrito en la técnica. Por ejemplo, el documento WO06/034059 describe que se piensa que dos variedades de canola con reducido contenido en ácido linolénico, IMC01 e IMC02 (originalmente descritas en el documento US. 5750827 y la solicitud de patente de EE.UU. 20080034457, respectivamente) tienen mutaciones en los genes *FAD3*. El documento WO04/072259 describe un alelo *FAD3* (del genoma C) con una única sustitución de nucleótidos en un sitio de corte y empalme 5' de una línea de canola mutante DMS100 con un contenido en ácido linolénico de aproximadamente 3%. El documento WO01/25453 describe nuevas variantes *FAD3* con múltiples sustituciones de aminoácidos, una de las cuales está también presente en "Stellar", de la variedad "Apollo" de bajo contenido linolénico. En la solicitud de patente de EE.UU. 20040083503 se describe un mutante *FAD3* no funcional con una sustitución de aminoácidos en un dominio conservado. Sin embargo, el fenotipo de ácido linolénico de plantas de canola que comprenden alelos *FAD3* mutantes de este tipo puede ser muy variable en función de los antecedentes genéticos.

Por lo tanto, a pesar del hecho de que están disponibles en la técnica secuencias de diversos alelos *FAD3*, sigue existiendo la necesidad de métodos alternativos (especialmente métodos no transgénicos) para reducir de forma estable la cantidad de ácido alfa-linolénico en semillas, sin tener un efecto negativo en la el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las invenciones descritas en lo que sigue en las realizaciones diferentes, los ejemplos y las reivindicaciones proporcionan métodos y medios para desarrollar plantas de cultivo que producen aceite de semilla que sea de un contenido bajo en C18:3.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Los autores de la invención han encontrado que plantas de *Brassica napus* comprenden cinco genes *FAD3* diferentes y que los niveles de C18:3 en plantas de *Brassica*, particularmente en el aceite de semilla de dichas plantas de *Brassica*, se pueden controlar mediante el control del número y/o los tipos de genes/alelos *FAD3* que son "funcionalmente expresados" en las semillas, es decir, que dan como resultado proteína *FAD3* funcional (biológicamente activa). Mediante la combinación de determinados alelos mutantes de los cinco genes *FAD3* ("alelos *FAD3*"), resultando en una reducción del nivel de proteína *FAD3* funcional, el nivel de C18:3 en el aceite de semilla se puede reducir de manera significativa. Se cree que cuantos más alelos mutantes *FAD3* se combinen en una planta tanto mayor será la reducción en el contenido de C18:3 en el aceite de semilla, manteniéndose un crecimiento de la planta y un desarrollo de las semillas normal.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona en una realización una planta de *Brassica* (y una célula, tejido, órgano, semilla o progenie de la misma) que comprende al menos dos alelos *FAD3* mutantes totalmente inactivados en su genoma, en donde

- i. el primer alelo *FAD3* mutante es un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que
 - a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3; o
 - b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o
 - c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4;

en donde dicho primer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que

- a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de

- nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3;
o
- 5 b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o
- 10 c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4; y
- ii. el segundo alelo *FAD3* mutante es un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que
- 15 a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- 20 b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- 25 c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10;
- 30 en donde dicho segundo alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que
- 35 a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- 40 b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- 45 c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10; y
- en donde dichos al menos dos alelos *FAD3* mutantes totalmente inactivados comprenden una mutación seleccionada del grupo que consiste en:
- 50 i. una delección, mutación de desplazamiento de marco o de codón de parada que conduce a una delección completa de la proteína;
- 55 ii. una mutación de codón de parada, desplazamiento de marco o sitio de corte y empalme que conduce a un truncamiento C-terminal de la proteína *FAD3* que incluye el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;
- iii. una mutación de sentido erróneo, por inserción o delección en la secuencia que codifica el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;
- 60 iv. una mutación de sentido erróneo en el codón que codifica cualquiera de las histidinas conservadas en una posición correspondiente a la posición 92, 96, 128, 131, 132, 295, 298 ó 299 de SEQ ID NO: 2; y
- v. una mutación sin sentido que resulta del uso de un ATG alternativo como codón de inicio y la síntesis de una proteína truncada en el extremo N que carece de la secuencia señal putativa.

El aceite de semilla de dicha planta puede exhibir una reducción significativa en la cantidad de ácido alfa-linolénico (C18:3) total presente en el aceite de semilla de una planta, no comprendiendo dicho alelo *FAD3* mutantes, cuando se compara con el aceite de semillas de plantas similares, dicho alelo o alelos *FAD3* mutantes.

La invención también proporciona una planta que comprende, además, un tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, en donde dicho tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado es un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que

- i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3; o
- ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o
- iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4;

en donde dicho tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que

- i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3; o
- ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o
- iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4; y

en donde dichos los alelos *FAD3* mutantes son alelos mutantes de al menos tres genes *FAD3* diferentes.

También se proporciona en esta memoria una planta que comprende, además, un cuarto, o un cuarto y un quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, en donde dicho cuarto y dicho quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado es un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que

- i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10;

en donde dicho cuarto y dicho quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende cada uno una secuencia de nucleótidos que

- i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o

- iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10;

y en donde los alelos *FAD3* mutantes son alelos mutantes de al menos cuatro genes *FAD3* diferentes.

También se proporciona una planta de acuerdo con la invención, en donde dichos alelos *FAD3* totalmente inactivados se seleccionan del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, en donde la G en la posición 2405 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, en donde la G en la posición 2702 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en donde la G en la posición 3934 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, en donde la G en la posición 2847 está sustituida con A; y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, en donde la G en la posición 3909 está sustituida con A.

También se describen secuencias (aisladas) de ácidos nucleicos que codifican proteínas de tipo salvaje y/o *FAD3* mutantes, así como fragmentos de las mismas, y métodos de utilizar estas secuencias de ácidos nucleicos para modificar la composición del aceite de semillas de *Brassica*. También se describen en esta memoria las proteínas de tipo salvaje y/o *FAD3* mutantes propiamente dichas y su uso, así como plantas que comprenden estos alelos *FAD3* mutantes y proteínas *FAD3*.

En un aspecto de la invención, un alelo mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que

- (a) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- (b) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- (c) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10,

en donde dicho alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que

- (a) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- (b) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- (c) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10,

y en donde dicho alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- i. una delección, mutación de desplazamiento de marco o de codón de parada que conduce a una delección completa de la proteína;
- ii. una mutación de codón de parada, desplazamiento de marco o sitio de corte y empalme que conduce a un truncamiento de la proteína *FAD3* que incluye el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;

- iii. una mutación de sentido erróneo, por inserción o deleción en la secuencia que codifica el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;
- iv. una mutación de sentido erróneo en el codón que codifica cualquiera de las histidinas conservadas en una posición correspondiente a la posición 92, 96, 128, 131, 132, 295, 298 ó 299 de SEQ ID NO: 2; y
- v. una mutación sin sentido que resulta del uso de un ATG alternativo como codón de inicio y la síntesis de una proteína truncada en el extremo N que carece de la secuencia señal putativa.

5
10
15

En otro aspecto de la invención se proporciona un alelo mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, que se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, en donde la G en la posición 2405 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, en donde la G en la posición 2702 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en donde la G en la posición 3934 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, en donde la G en la posición 2847 está sustituida con A; y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, en donde la G en la posición 3909 está sustituida con A.

20
25

La invención se refiere, además, a una planta, y células, tejidos, órganos, semillas y progenie de la misma, que comprende uno o más alelos *FAD3* mutantes totalmente inactivados de acuerdo con la invención. La planta de acuerdo con la invención puede comprender una cantidad reducida de proteínas *FAD3* funcionales en comparación con una planta, y células, partes, semillas y progenie de la misma, que comprende un alelo *FAD3* que codifica la proteína *FAD3* funcional correspondiente. Tales plantas y células, partes, semillas y progenie de las mismas pueden utilizarse para obtener plantas que producen semilla o grano con la composición de aceite de semilla alterada, en particular para obtener plantas de *Brassica* que producen semillas o granos con un contenido de C18:3 en el aceite de semilla que mantiene preferiblemente un desarrollo de las plantas agrónomicamente adecuado. Tal como se utiliza en esta memoria, "parte de la planta" incluye cualquier cosa derivada 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 semillas.

30

También se proporciona un método para producir un aceite de semillas, que comprende machacar semillas de las plantas de acuerdo con la invención, comprendiendo dichas semillas al menos dos alelos *FAD3* mutantes, totalmente inactivados de acuerdo con la invención.

35

Todavía en otro aspecto de la invención se proporciona una planta de *Brassica* de acuerdo con la invención, o una célula, tejido, órgano, semilla o progenie de la misma que comprende al menos dos alelos *FAD3* mutantes, totalmente inactivados de acuerdo con la invención, obtenible de una semilla seleccionada del grupo que consiste en:

- semilla de *Brassica* que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, en donde la G en la posición 2405 está sustituida con A, y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, en donde la G en la posición 2702 está sustituida con A, habiendo sido depositada dicha semilla en NCIMB Limited el 9 de octubre de 2009 bajo el número de acceso NCIMB 41655;
- semilla de *Brassica* que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en donde la G en la posición 3934 está sustituida con A, y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, en donde la G en la posición 3909 está sustituida con A, habiendo sido depositada dicha semilla en NCIMB Limited el 9 de octubre de 2009 bajo el número de acceso NCIMB 41656;
- y
- semilla de *Brassica* que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, en donde la G en la posición 2847 está sustituida con A, habiendo sido depositada dicha semilla en NCIMB Limited el 9 de octubre de 2009 bajo el número de acceso NCIMB 41657.

50

También se proporciona una semilla o grano con un contenido reducido de C18:3 en el aceite, que se puede obtener de una planta de acuerdo con la presente invención, y el uso de dicha semilla o grano, por ejemplo para la siembra y el crecimiento de la progenie de las plantas o para la producción de harina de semillas, torta de semillas, grasas o aceites de semillas.

5 Son adecuados para la invención métodos para generar y seleccionar plantas, y células, partes, semillas y progenie de las mismas que contienen uno o más alelos *FAD3* totalmente inactivados. En particular, son adecuados métodos para generar y seleccionar plantas de *Brassica* que comprenden al menos dos genes *FAD3*, en particular, plantas de *Brassica napus*, y células, partes, semillas y progenie de las mismas, que contienen al menos dos alelos *FAD3* mutantes totalmente inactivados en al menos dos loci diferentes en el genoma (es decir, al menos dos genes *FAD3* diferentes) y para distinguir entre la presencia de alelos *FAD3* mutantes y alelos *FAD3* de tipo salvaje en una planta o parte de planta. Por lo tanto, se describen métodos (tales como mutagénesis y/o selección asistida por marcadores) para generar y/o identificar alelos *FAD3* mutantes o plantas o partes de plantas que comprenden tales alelos y para combinar un número adecuado de alelos *FAD3* mutantes en una sola planta, en los que la planta tiene un contenido significativamente reducido de C18:3 en el aceite de semilla.

Es otro aspecto de la invención proporcionar un método para determinar el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante de acuerdo con la invención en una planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprende determinar la presencia de un mutante y/o una correspondiente región específica para *FAD3* de tipo salvaje en el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma.

15 También se proporcionan métodos para utilizar una combinación de alelos *FAD3* mutantes de la presente invención para reducir el contenido en C18:3 en el aceite de semillas de una planta de *Brassica*.

20 También se proporcionan métodos para el uso de la planta, y células, tejidos, órganos, semillas y progenie de la misma, de la invención, para producir aceite de semillas de colza o una torta de aceite de semillas de colza. Tal como se utiliza en esta memoria, "producto vegetal" incluye cualquier cosa derivada de una planta de la invención, incluyendo partes de las plantas tales como semillas, harina de semillas, torta de semillas, grasas o aceites de semillas.

DEFINICIONES GENERALES

25 La expresión "secuencia de ácido nucleico" (o molécula de ácido nucleico) se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma de cadena sencilla o doble, en particular un ADN que codifica una proteína o fragmento de proteína tal como se describe en esta memoria. Una "secuencia de ácido nucleico endógeno" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se encuentra dentro de una célula vegetal, p. ej., un alelo endógeno de un gen *FAD3* presente dentro del genoma nuclear de una célula de *Brassica*. Una "secuencia de ácido nucleico aislado" se utiliza para aludir a una secuencia de ácido nucleico que ya no está en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante.

30 El término "gen" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita) que se transcribe en una molécula de ARN (p. ej., un pre-ARNm, que comprende secuencias de intrones, que luego se corta y empalma para dar un ARNm maduro) en una célula, enlazada operativamente a regiones reguladoras (p. ej., un promotor). Un gen puede comprender, por lo tanto, varias secuencias enlazadas operativamente tales como un promotor, una secuencia conductora 5' que comprende, p. ej., secuencias implicadas en una iniciación de la traducción, a región codificante (de proteína) (ADNc o ADN genómico) y una secuencia 3' no traducida, que comprende, p. ej., sitios de terminación de la transcripción. "Gen endógeno" se utiliza para diferenciar de un "gen extraño", "transgén" o "gen quimérico", y se refiere a un gen de una planta de un determinado género, especie o variedad de planta, que no ha sido introducido en la planta mediante transformación (es decir, no es un "transgén"), sino que normalmente está presente en plantas de ese género, especie o variedad, o que se introduce en esa planta de plantas de otro género, especie o variedad de planta, en la que está normalmente presente, por técnicas de cultivo normales o por hibridación somática, p. ej., por fusión de protoplastos. De manera similar, un "alelo endógeno" de un gen no se introduce en una planta o tejido vegetal por transformación de plantas, sino que, por ejemplo, es generado por mutagénesis y/o selección de la planta o se obtiene mediante el rastreo de poblaciones naturales de plantas.

45 Los términos "proteína" o "polipéptido" se utilizan indistintamente 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 *FAD3* puede, por lo tanto, aludirse todavía como una "proteína". Una "proteína aislada" se utiliza para aludir a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante. Una "enzima" es una proteína que comprende la actividad enzimática tal como proteínas *FAD3* funcionales, que son capaces de desaturar ácido linoleico en ácido linoléico.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, "proteína *FAD3*", también conocida como "ácido graso desaturasa 3", "ácido graso omega-3 desaturasa" o "delta-15 desaturasa", se refiere a una proteína residente ER que introduce el tercer doble enlace en la biosíntesis de ácidos grasos C18:3. Ácidos grasos desaturasas son enzimas que contienen hierro que catalizan la introducción, dependiente de NAD-(P)H y O₂, de dobles enlaces en cadenas de acilo graso

interrumpidas con metileno. Análisis de hidropatía indican que estas enzimas contienen hasta tres dominios hidrófobos largos que serían lo suficientemente largos como para abarcar dos veces la bicapa de la membrana. Las enzimas contienen tres regiones que contienen His conservadas (cajas His), que tienen un posicionamiento coherente con respecto a estos posibles dominios en expansión de la membrana. Todos los residuos histidina individuales en estas regiones conservadas, que están supuestamente implicados en la unión de hierro, parecieron ser esenciales para la función de la proteína (Shanklin et al., *Biochemistry* 33:12787-94, 1994). En *FAD3-A1* (SEQ ID NO: 2) están presentes ocho histidinas de unión a dihierro putativas conservadas en las posiciones de aminoácidos 92, 96, 128, 131, 132, 295, 298 y 299 (GenBank: ACS26169.1).

La expresión "secuencia señal" o "péptido señal" se refiere a una corta cadena peptídica (3-60 aminoácidos de longitud) en el extremo N-terminal de una proteína que dirige la fijación inicial como objetivo de una proteína a orgánulos intracelulares tales como el retículo endoplásmico (ER). Proteínas ER residentes, tales como *FAD3*, puede comprender una secuencia señal N-terminal escindible para fijación como objetivo inicial, co-traduccion al ER, pero el primer dominio de la transmembrana también puede actuar como una secuencia señal no escindible que dirige la síntesis de proteínas co-traduccion y que actúa en calidad de una secuencia de parada de la transferencia para el anclaje de la proteína en la membrana. Se demostró que *FAD3* de *Brassica* se inserta en la membrana del ER de una manera co-traduccion (McCartney et al., 2004, *Plant Journal* 37, páginas 156-173).

"Motivo de retención de ER", tal como se utiliza en esta memoria, es un motivo tetrapéptido C-terminal - H/K/RDEL que es responsable de la retención estática del ER o la recuperación de otros compartimentos en la vía secretora. Cualquier cambio de aminoácido no conservado al motivo es conocido por resultar en la pérdida de recuperación de ER. *FAD3* comprende un motivo dilisina conservado (posiciones de aminoácidos -3 y -5 con respecto al extremo C) que funciona como una señal de retención en el ER. El truncamiento de los cinco aminoácidos C-terminales -KSKIN o una sustitución de las dos lisinas a alaninas resultó en una localización errónea de *FAD3* en el aparato de Golgi o en la membrana plasmática, respectivamente, así como un deterioro grave de la actividad enzimática *FAD3* (McCartney et al., 2004, *Plant Journal* 37, páginas 156-173). Correspondiente regiones de aminoácidos o residuos en otras secuencias *FAD3* se pueden encontrar por métodos conocidos en la técnica tal como determinando la alineación óptima, tal como se describe a continuación.

La expresión "gen *FAD3*" se refiere en esta memoria a la secuencia de ácido nucleico que codifica una ácido graso desaturasa (es decir, una proteína *FAD3*). Una "proteína *FAD3*" funcional tiene actividad acilo graso desaturasa, más específicamente, es capaz de desaturar ácido linoleico (C18:2) en ácido linolénico (C18:3). La funcionalidad de las proteínas *FAD3* se puede testar utilizando un ensayo biológico. Para determinar la función y/o la funcionalidad de un gen/proteína *FAD3* específico, se puede utilizar, por ejemplo, un sistema de expresión de levadura tal como se describe por Vrinten et al. (2005, *Plant Physiol* 139:79-87) o por Reed et al. (2000, *Plant Physiol* 122:715-20) o un sistema de expresión bacteriana tal como se describe, p. ej., por Reddy et al. (*Plant Mol Biol* 22: 293-300, 1993). Alternativamente, el gen que codifica la proteína *FAD3* puede transformarse, p. ej., en *Brassica* (u otra planta) y los transformantes resultantes pueden rastrearse en cuanto a la sobre-expresión de fenotipos tal como se describe, p. ej., en la Solicitud de Patente de EE.UU. 20040083503.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alelo(s)" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular. En una célula diploide (o anfiploide) de un organismo, alelos de un gen dado se encuentran en un lugar específico o locus (plural loci) en un cromosoma. Un alelo está presente en cada uno de los cromosomas del par de cromosomas homólogos.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "cromosomas homólogos" significa cromosomas que contienen información para las mismas características biológicas y contienen los mismos genes en los mismos loci, pero posiblemente diferentes alelos de esos genes. Cromosomas homólogos son cromosomas que se aparean durante la meiosis. "Cromosomas no homólogos", que representan todas las características biológicas de un organismo, forman un juego, y el número de juegos en una célula se denomina ploidía. Los organismos diploides contienen dos juegos de cromosomas no homólogos, en donde cada uno de los cromosomas homólogos se hereda de un parental diferente. En especies anfiploides existen esencialmente dos juegos de genomas diploides, por lo que a los cromosomas de los dos genomas se les alude como "cromosomas homeólogos" (y de manera similar, a los loci o genes de los dos genomas se les alude como loci o genes homeólogos). Una especie vegetal diploide, o anfiploide, puede comprender un gran número de diferentes alelos en un locus particular.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "heterocigoto" significa una condición genética que existe cuando dos alelos diferentes residen en un locus específico, pero están colocados individualmente en los pares de cromosomas homólogos correspondientes en la célula. A la inversa, tal como se utiliza en esta memoria, el término "homocigoto" significa una condición genética que existe cuando dos alelos idénticos residen en un locus específico, pero están colocados individualmente en pares de cromosomas homólogos correspondiente en la célula.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "locus" (loci en plural) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma en donde se encuentra, por ejemplo, un gen o marcador genético. Por ejemplo, "FAD3-A1" se refiere a la posición en un cromosoma en el que se puede encontrar el gen FAD3-A1 (y dos alelos FAD3-A1), mientras que el "locus FAD3-C1" se refiere a la posición en un cromosoma en el que se puede encontrar el gen FAD3-C1 (y dos alelos FAD3-C1).

"Esencialmente similar", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a secuencias 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. A estas secuencias de ácidos nucleicos también se las puede aludir como siendo "sustancialmente idénticas" o "esencialmente idénticas" a las secuencias FAD3 proporcionados en el listado de secuencias. La "identidad de secuencia" de dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias alineadas óptimamente que tienen residuos idénticos (x 100), dividido por el número de posiciones comparadas. Un hueco, es decir, una posición en una alineación en donde un residuo está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con residuos no idénticos. El "alineamiento óptimo" de dos secuencias se encuentra alineando las dos secuencias a lo largo de toda la longitud de acuerdo con 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, p. ej., <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) utilizando ajustes por defecto (penalización por apertura del hueco = 10 (para nucleótidos) / 10 (para proteínas) y penalización por extensión del hueco = 0,5 (para nucleótidos) / 0,5 (para proteínas)). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto es EDNAFULL y para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es EBLOSUM62.

Se pueden utilizar "condiciones de hibridación rigurosas" para identificar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos dada. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y pH definidos. T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Típicamente, se elegirán las condiciones restrictivas en las que la concentración de sal es aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es al menos 60°C. La reducción de la concentración de sal y/o el aumento de la temperatura aumenta la rigurosidad. Condiciones rigurosas para hibridaciones de ARN-ADN (transferencias Northern utilizando una sonda de, p. ej., 100 nt) son, por ejemplo, las que incluyen al menos un lavado en 0,2X SSC a 63°C durante 20 min, o condiciones equivalentes.

"Condiciones de alta rigurosidad" se pueden proporcionar, por ejemplo, por hibridación a 65°C en una disolución acuosa que contiene 6x SSC (20x SSC contiene NaCl 3,0 M, citrato de Na 0,3 M, pH 7,0), 5x Denhardt (100X Denhardt contiene Ficoll al 2%, polivinilpirrolidona al 2%, albúmina de suero bovino al 2%), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5% y 20 µg/ml de ADN soporte desnaturalizado (ADN de cadena sencilla de esperma de pescado, con una longitud media de 120-3000 nucleótidos) como competidor no específico. Después de la hibridación, el lavado de alta rigurosidad se puede realizar en varias etapas, con un lavado final (aproximadamente 30 min) a la temperatura de hibridación en 0,2-0,1 x SSC, SDS al 0,1%.

"Condiciones de rigurosidad moderada" se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en la disolución descrita anteriormente, pero a aproximadamente 60-62°C. Lavado de rigurosidad moderada se puede realizar a la temperatura de hibridación en 1x SSC, SDS al 0,1%.

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

El término "ortólogo" de un gen o proteína se refiere en esta memoria al gen homólogo o proteína homóloga que se encuentra en otras especies, que tiene la misma función que el gen o proteína, pero (habitualmente) diverge en secuencia desde el instante en que divergió la especie que alberga los genes (es decir, los genes que evolucionaron a partir de un ancestro común por especiación). Ortólogos de los genes FAD3 de *Brassica napus* pueden, por lo tanto, ser identificados en otras especies vegetales (p. ej., *Brassica juncea*, etc.) basado tanto en las comparaciones de secuencias (p. ej., sobre la base de porcentajes de identidad de secuencia a lo largo de toda la secuencia o a lo largo de dominios específicos) y/o el análisis funcional.

El término "mutante" o "mutación" se refiere, p. ej., a una planta o un gen que es diferente de la denominada variante de "tipo salvaje" (también escrito "tipo-salvaje"), que se refiere a una forma típica de, p. ej., una planta o un gen, ya que se produce de forma más frecuente en la naturaleza. Una "planta de tipo salvaje" se refiere a una planta con el fenotipo más común de una planta de este tipo en la población natural. Un "alelo de tipo salvaje" se refiere a un alelo

de un gen necesario para producir el fenotipo de tipo salvaje. Una planta mutante o alelo puede producirse en la población natural o puede producirse por la intervención humana, p. ej., mediante mutagénesis, y un "alelo mutante", por lo tanto, se refiere a un alelo de un gen necesario para producir el fenotipo mutante. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "alelo *FAD3* mutante" (p. ej., *FAD3-A1*, *FAD3-C1*, *FAD3-A2*, *FAD3-A3* o *FAD3-C2* mutante) se refiere a un alelo *FAD3*, que dirige la expresión de una cantidad significativamente reducida de proteína *FAD3* funcional que el correspondiente alelo de tipo salvaje. Esto puede ocurrir ya sea por el alelo *FAD3* mutante que codifica una proteína *FAD3* no funcional que, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína *FAD3* que no tiene actividad biológica, una actividad biológica modificada de manera significativa y/o una actividad biológica significativamente reducida en comparación con la correspondiente proteína *FAD3* funcional de tipo salvaje, o por el alelo *FAD3* mutante que codifica una cantidad significativamente reducida de proteína *FAD3* funcional o ninguna proteína *FAD3* en absoluto. Un "alelo *FAD3* mutante" de este tipo comprende, por lo tanto, una o más mutaciones en su secuencia de ácido nucleico en comparación con el alelo de tipo salvaje, por lo que la o las mutaciones resultan preferiblemente en una cantidad (absoluta o relativa) significativamente reducida de proteína *FAD3* funcional en la célula *in vivo*.

15 Mutaciones en secuencias de ácido nucleico pueden incluir, por ejemplo:

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

(b) una "mutación sin sentido" o "mutación del codón de parada", que es un cambio en la secuencia de ácido nucleico que resulta en la introducción de un codón DE PARADA prematuro y, por lo tanto, la terminación de la traducción (que resulta en una proteína truncada); genes vegetales contienen los codones de terminación de la traducción "TGA" (UGA en el ARN), "TAA" (UAA en el ARN) y "TAG" (UAG en el ARN); así, cualquier sustitución, inserción, delección de nucleótidos que resulta en uno de estos codones que esté en el ARNm maduro que esté siendo traducido (en el marco de lectura) terminará la traducción.

(c) una "mutación por inserción" de uno o más aminoácidos, debida a uno o más codones que han sido añadidos en la secuencia codificante del ácido nucleico;

(d) una "mutación por delección" de uno o más aminoácidos, debida a haber sido eliminados uno o más codones en la secuencia codificante del ácido nucleico;

(e) una "mutación por desplazamiento de marco", que resulta en que la secuencia de ácido nucleico que se está traduciendo esté en un marco diferente aguas abajo de la mutación. Una mutación por desplazamiento de marco puede tener diversas causas tales como la inserción, delección o duplicación de uno o más nucleótidos, pero también mutaciones que afectan al corte y empalme de pre-ARNm (mutaciones del sitio por corte y empalme) pueden dar lugar a desplazamientos de marco;

(f) una "mutación del sitio por corte y empalme", que altera o suprime el corte y empalme correctos de la secuencia de pre-ARNm, dando como resultado una proteína de diferente secuencia de aminoácidos que el tipo salvaje. Por ejemplo, uno o más exones pueden omitirse durante el corte y empalme de ARN, lo que resulta en una proteína que carece de los aminoácidos codificados por los exones omitidos. Alternativamente, el marco de lectura puede ser alterado a través de un corte y empalme incorrecto, o uno o más intrones puede ser retenido, o se puede generar donantes o aceptores de corte y empalme alternativos, o el corte y empalme puede ser iniciado en una posición alternativa (p. ej., dentro de un intrón), o se pueden generar señales de poliadenilación alternativas. Un corte y empalme de pre-ARNm correcto es un proceso complejo, que puede verse afectado por diversas mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican *FAD3*. En eucariotas superiores, tales como plantas, el espliceosoma principal corta y empalma intrones que contienen GU en el sitio de corte y empalme 5' (sitio donante) y AG en el sitio donante 3' (sitio aceptor). Esta regla GU-AG (o regla GT-AG; véase Lewin, Genes VI, Oxford University Press 1998, págs. 885-920, ISBN 0198577788) es seguida por aproximadamente el 99% de los sitios de corte y empalme de genes eucariotas nucleares, mientras que los intrones que contienen otros dinucleótidos en el sitio de empalme 5' y 3', tal como GC-AG y AU-AC, representa sólo aproximadamente 1% y 0,1%, respectivamente.

Se desea que la o las mutaciones en la secuencia de ácido nucleico resulten preferiblemente en una proteína mutante que comprende una actividad enzimática significativamente reducida o ninguna *in vivo*, es decir, actividad C18:2 a C18:3 desaturasa. Básicamente, cualquier mutación que resulte en una proteína que comprende al menos una inserción, delección y/o sustitución de aminoácidos con respecto a la proteína de tipo salvaje puede dar lugar a una actividad enzimática significativamente reducida o a ninguna. Sin embargo, ha de entenderse que es más probable que las mutaciones en determinadas partes de la proteína resulten en una función reducida de la proteína *FAD3* mutante, tales como mutaciones que conducen a proteínas truncadas, con lo que faltan partes significativas de los dominios funcionales y/o estructurales.

55 Tal como se utiliza en esta memoria, un "alelo totalmente inactivado" es un alelo mutante que dirige una expresión de *FAD3* funcional significativamente reducida o ninguna, es decir, una significativamente reducida de proteína *FAD3* funcional o ninguna proteína *FAD3* funcional, en la célula *in vivo*. Alelos mutantes *FAD3* totalmente inactivados incluyen, por ejemplo, mutaciones por delección de la totalidad o de una parte sustancial de la región codificante, o mutaciones por desplazamiento de marco o de codón de parada que conducen a una eliminación sustancial o completa de la proteína. Por ejemplo, un alelo *FAD3* totalmente inactivado comprende una mutación

que interrumpe o elimina el motivo de retención de ER que está presente en los 5 los aminoácidos más C-terminales (-KSKIN). Esto resultará en una pérdida completa de la recuperación del ER y en una subsiguiente acumulación de la proteína en el aparato de Golgi o la membrana plasmática, haciéndola incapaz de realizar su función (McCartney et al., 2004, Plant Journal 37, páginas 156-173). Por lo tanto, por ejemplo, cualquier mutación de codón de parada, por desplazamiento de marco o de sitio de corte y empalme que conduce a un truncamiento C-terminal de la proteína que incluye el motivo de retención de ER resultará en un alelo *FAD3* totalmente inactivado, al igual que una mutación de sentido erróneo (p. ej., una sustitución de una o de las dos lisinas), inserción o delección en la secuencia de nucleótidos que codifica el motivo propiamente dicho, es decir, a partir del nt 1117 de SEQ ID NO: 11 (correspondiente a Lys373 de SEQ ID NO: 2) y aún más aguas abajo con relación al codón de inicio ATG en la secuencia codificante de *FAD3-A1* o residuos homólogos con el mismo.

Alternativamente, un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una mutación que elimina o altera uno cualquiera de los ocho residuos histidina conservados. Por ejemplo, un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una mutación, p. ej., mutación sin sentido o por desplazamiento de marco, entre los nucleótidos (nt) 274-276 y los nt 895-897 con respecto al codón de inicio ATG en la secuencia codificante de *FAD3-A1* (número de acceso a GenBank FJ985689.1) que codifica respectivamente la primera y última histidinas conservadas (His92 y His299 de la proteína *FAD3-A1*; número de acceso a GenBank ACS26169.1), o residuos homólogos con el mismo. En otro ejemplo, las mutaciones de sentido erróneo que conducen a la sustitución de cualquiera de estos ocho residuos histidina resultarán en una proteína *FAD3* no funcional. Todavía en otro ejemplo, un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una mutación o mutaciones de inserción, delección o de sitio de corte y empalme que eliminan o alteran cualquiera de los nucleótidos que codifican las ocho histidinas unión a di-hierro, o alteran el posicionamiento de una o más de las ocho histidinas de unión a di-hierro con respecto a las potenciales dominios que abarcan la membrana o bien entre sí.

Otro ejemplo de un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado es un alelo *FAD3* que codifica una proteína *FAD3* truncada en posición N-terminal. En el caso de una mutación aguas arriba de los nucleótidos que codifican la primera histidina di-hierro, un ATG alterativo, aguas abajo del codón de inicio original, puede ser utilizado para inicios de la traducción, con lo que todavía se puede formar una proteína truncada en posición N-terminal. Sin embargo, un truncamiento de este tipo interrumpirá o eliminará el potencial de la secuencia de señal N-terminal, que normalmente funciona para dirigir la proteína al ER, que conduce a una dislocación de *FAD3* al citosol, lo cual lo hace incapaz de realizar su función normal.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "cantidad significativamente reducida de proteína *FAD3* funcional" (p. ej., proteína *FAD3-A1*, *FAD3-A2*, *FAD3-A3*, *FAD3-C1* y/o *FAD3-C2* funcional) se refiere a una reducción en la cantidad de una proteína *FAD3* funcional producida por la célula que comprende un alelo *FAD3* mutante en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% (es decir, ninguna proteína funcional es producida por la célula) en comparación con la cantidad de la proteína *FAD3* funcional producida por la célula que no comprende el alelo mutante *FAD3*. Esta definición abarca la producción de una proteína *FAD3* "no funcional" (p. ej., proteína *FAD3* truncada) que no tiene actividad biológica (actividad desaturasa C18:2 a C18:3) *in vivo*, la reducción en la cantidad absoluta de la proteína *FAD3* funcional (p. ej. no se hace proteína *FAD3* funcional debido a la mutación en el gen *FAD3*) y/o la producción de una proteína *FAD3* con actividad biológica significativamente reducida en comparación con la actividad de una proteína *FAD3* de tipo salvaje funcional (tal como una proteína *FAD3* en la que uno o más residuos aminoácidos que son cruciales para la actividad biológica de la proteína *FAD3* codificada son sustituidos por otro residuo aminoácido o son eliminados).

La expresión "proteína *FAD3* mutante", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína *FAD3* codificada por una secuencia ácido nucleico *FAD3* mutante ("alelo *fad3*"), por lo que la mutación resulta en una actividad *FAD3* biológica significativamente reducida y/o ninguna actividad (actividad desaturasa C18:2 a C18:3) *in vivo*, en comparación con la actividad de la proteína *FAD3* codificada por una secuencia *FAD3* no mutante, de tipo salvaje ("alelo *FAD3*").

Tal como se utiliza en esta memoria, "un contenido significativamente reducido de C18:3" o "bajo ácido alfa-linolénico" se refiere a una reducción significativa en la cantidad de ácido alfa-linolénico (C18:3) total presente en el aceite de semilla de una planta que comprende uno o más alelos *FAD3* mutantes en comparación con el aceite de semilla de una planta correspondiente que no comprende dicho alelo o alelos *FAD3* mutantes. El contenido de C18:3 del aceite de semillas de dichas plantas que comprenden uno o más alelos *FAD3* mutantes se reduce hasta por debajo de 11% en peso, 10% en peso, 9% en peso, 8% en peso, 7,0% en peso, 6,0% en peso, 5,0% en peso, 4,0% en peso, 3,0% en peso, 2,5% en peso, 2,0% en peso, 1,5% en peso, 1,0% en peso, 0,5% en peso del contenido total de aceite de semillas.

Se entiende que contenido de C18:3 del aceite de semillas puede variar dependiendo de los antecedentes genéticos y de las condiciones de crecimiento (p. ej., temperatura). Sin pretender limitar la invención, se espera que los niveles

de C18:3 del aceite de semillas serán generalmente más altos cuando las plantas se cultivan en el campo que cuando se cultivan en el invernadero. Por lo tanto, con el fin de determinar si una planta de acuerdo con la invención, es decir, una planta que comprende uno o más alelos *FAD3* mutantes, tiene un contenido significativamente reducido de C18:3 del aceite de semillas, debería hacerse una comparación con una planta correspondiente (es decir, del mismo fondo genético) que no comprende dicho o dichos alelos *FAD3* mutantes cultivada en las mismas condiciones, en lugar de evaluar los niveles absolutos de C18:3 del aceite de semillas.

La composición de ácidos grasos de aceite de semilla, incluyendo el contenido en C18:3, se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante la extracción de los ácidos grasos de las semillas y el análisis de sus niveles relativos en el aceite de semilla por cromatografía de gas-líquido capilar tal como se describe, p. ej., en el documento WO09/007091.

"Mutagénesis", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al proceso en el que las células vegetales (p. ej., una pluralidad de semillas de *Brassica* u otras partes, tales como el polen, etc.) se someten a una técnica que induce mutaciones en el ADN de las células, tal como el contacto con un agente mutagénico, tal como una sustancia química (tal como etilmetilsulfonato (EMS), etilnitrosourea (ENU), etc.) o la radiación ionizante (neutrones (tal como en la mutagénesis de neutrones rápidos, etc.), rayos alfa, rayos gamma (tal como los suministrados por una fuente de cobalto 60), rayos X, radiación UV, etc.), o una combinación de dos o más de estos. Por lo tanto, la mutagénesis deseada de uno o más alelos *FAD3* se puede lograr mediante el uso de medios químicos tales como por contacto de uno o más tejidos vegetales con etilmetilsulfonato (EMS), etilnitrosourea, etc., mediante el uso de medios físicos tales como rayos X, etc., o por radiación gamma tal como la suministrada por una fuente de cobalto 60. Mientras que las mutaciones creadas por irradiación son a menudo grandes deleciones u otras lesiones toscas tales como translocaciones o reordenamientos complejos, las mutaciones creadas por mutágenos químicos son a menudo lesiones más discretas tales como mutaciones puntuales. Por ejemplo, bases de guanina con alquilatos de EMS, que resulta en un apareamiento erróneo de las bases: una guanina alquilada se emparejará con una base de timina, resultando principalmente transiciones G/C a A/T. Después de la mutagénesis, las plantas de *Brassica* se regeneran a partir de las células tratadas utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las semillas de *Brassica* resultantes pueden plantarse de acuerdo con procedimientos convencionales de cultivo y después de la autopolinización se forma semilla en las plantas. Alternativamente, pueden extraerse se plántulas haploides dobles para formar inmediatamente plantas homocigotas, por ejemplo tal como se describe por Coventry *et al.* (1988, Manual for Microspore Culture for *Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. Publicación OAC 0489. Univ. de Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). Semilla adicional que se forma como resultado de una auto-polinización de este tipo en la presente generación o en una posterior puede ser recolectada y rastreada en cuanto a la presencia de alelos *FAD3* mutantes. Se conocen varias técnicas para rastrear alelos mutantes específicos, p. ej., Deleteagene™ (Delet-a-gene; Li *et al.*, 2001, Plant J. 27: 235-242) utiliza ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para rastrear mutantes por deleción generados por mutagénesis de neutrones rápidos, TILLING (lesiones locales dirigidas inducidas en genomas; McCallum *et al.*, 2000, Nat Biotechnol. 18:455-457) identifica mutaciones puntuales inducidas por EMS, etc. Técnicas adicionales para el rastreo de la presencia de alelos *FAD3* mutantes específicos se describen en los Ejemplos que figuran más adelante.

Siempre que se haga referencia a una "planta" o "plantas", de acuerdo con la invención, se entiende que también quedan abarcadas en esta memoria las partes de plantas (células, tejidos u órganos, vainas de semillas, semillas, partes cortadas tales como raíces, hojas, flores, polen, etc.), la progenie de las plantas que conservan las características distintivas de los parentales (especialmente el contenido en C18:3 de aceite de semillas), tales como las semillas obtenidas por autofecundación o cruce, p. ej., las semillas híbridas (obtenidas mediante el cruce de dos líneas parentales endógamas), plantas híbridas y partes de las plantas derivadas de las mismas, a menos que se indique lo contrario.

"Planta de cultivo" se refiere a las especies vegetales cultivadas como un cultivo tales como *Brassica napus* (AACC, 2n = 38), *Brassica juncea* (AABB, 2n = 36), *Brassica carinata* (BBCC, 2n = 34), *Brassica rapa* (sin. *B. campestris*) (AA, 2n = 20), *Brassica oleracea* (CC, 2n = 18) o *Brassica nigra* (BB, 2n = 16). La definición no incluye las malas hierbas tales como *Arabidopsis thaliana*.

Un "variedad" se utiliza en esta memoria de conformidad con la Convención de la UPOV y se refiere a un conjunto de plantas dentro un solo taxón botánico del rango más bajo conocido, conjunto que puede definirse por la expresión de las características que resultan de un genotipo dado o de una combinación de genotipos, puede distinguirse de cualquier otro conjunto de plantas por la expresión de al menos uno de dichos caracteres y se considera como una unidad, habida cuenta de su aptitud a propagarse sin alteración (estable).

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "se produce de forma no natural" o "cultivada", cuando se utiliza con referencia a una planta, significa una planta con un genoma que ha sido modificado por el hombre. Una planta transgénica, por ejemplo, es una planta que se produce de forma no natural que contiene una molécula de ácido

nucleico exógeno, p. ej., un gen quimérico que comprende una región transcrita que cuando se transcribe proporciona una molécula de ARN biológicamente activa capaz de reducir la expresión de un gen endógeno tal como un gen *FAD3* tal como se describe en esta memoria y, por lo tanto, haya sido modificada genéticamente por el hombre. Además, una planta que contiene una mutación en un gen endógeno, por ejemplo, una mutación en un gen *FAD3* endógeno (p. ej., en un elemento regulador o en la secuencia codificante) como resultado de una exposición a un agente mutagénico también se considera una planta que se produce de forma no natural, ya que ha sido modificada 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 *FAD3* endógeno, que en la naturaleza no se produce en esa especie vegetal particular, como resultado de, por ejemplo, los procesos de reproducción dirigida tal como la reproducción asistida por marcadores y la selección o introgresión, con una planta de la misma o de otra especie tal como *Brassica juncea* o *rapa*, de esa planta también se considera una planta que se produce de forma no natural. Por el contrario, una planta que contiene sólo mutaciones espontáneas o que se producen de forma natural, es decir, una planta que no haya sido modificada genéticamente por el hombre, no es una "planta que se produce de forma no natural" tal como se define en esta memoria y, por lo tanto, no queda abarcado dentro de la invención. Un experto en la técnica entiende que, mientras que una planta que se produce de forma no natural tiene típicamente una secuencia de nucleótidos que está alterada en comparación con una planta que se produce de forma natural, una planta que se produce de forma no natural también puede ser modificada genéticamente por el hombre, sin alterar su secuencia de nucleótidos, por ejemplo, mediante la modificación de su patrón de metilación.

Tal como se utiliza en esta memoria, "un desarrollo vegetal agrónomicamente adecuado" se refiere a un desarrollo de la planta, en particular una planta de semillas de aceite de colza, que no afecta adversamente a su rendimiento bajo prácticas agrícolas normales, más específicamente su establecimiento en el campo, vigor, tiempo de floración, altura, maduración, resistencia al aplastamiento, rendimiento, resistencia a enfermedades, resistencia a la rotura de la vaina, etc. Por lo tanto, las líneas con un contenido significativamente reducido de C18:3 del aceite de semillas con un desarrollo de las plantas agrónomicamente adecuado tienen un contenido de C18:3 de aceite de semillas que ha disminuido en comparación con el contenido de C18:3 de aceite de semillas de una planta que se sabe que tiene un contenido medio de C18:3 de aceite de semillas al tiempo que mantiene un establecimiento similar en el campo, vigor, tiempo de floración, altura, maduración, resistencia al aplastamiento, rendimiento, resistencia a enfermedades, resistencia a la rotura de las vainas, etc.

La expresión "que comprende" debe interpretarse como que especifica la presencia de las partes, fases o componentes establecidos, pero no excluye la presencia de una o más partes, fases o componentes adicionales. Una planta que comprende un determinado rasgo puede comprender, por lo tanto, rasgos adicionales.

Se entiende que cuando se hace referencia a una palabra en singular (p. ej., planta o raíz), también se incluye en esta memoria el plural (p. ej., una pluralidad de plantas, una pluralidad de raíces). Por lo tanto, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", por lo tanto, significa habitualmente "al menos uno".

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describe que *Brassica napus* (genoma AACCC, $2n = 4x = 38$), que es una especie en alotetraploide (anfidiplóide) que contienen esencialmente dos genomas diploides (el genoma A y el genoma C) debido a su origen de ancestros diploides, comprende dos genes *FAD3* en su genoma localizados en los genomas A y C, en adelante denominados *FAD3-A1* y *FAD3-C1*, respectivamente. Se encontró por los autores de la invención que el genoma de *Brassica napus* contiene tres genes *FAD3* adicionales, que fueron designados *FAD3-A2*, *FAD3-A3* y *FAD3-C2*. Se encontró en cruces con una línea de cultivo masculina de élite y una línea de cultivo femenina de élite de *Brassica* que plantas de *Brassica napus*, que son homocigóticas para un alelo *FAD3-A1* o *FAD3-C1* mutante, muestran una disminución significativa en el contenido de C18:3 de aceite de semillas cuando se compara con plantas de *Brassica napus* que no comprenden alelos *FAD3* mutantes, mientras que las plantas homocigóticas para una mutación en cualquiera de los genes *FAD3* recientemente identificados no exhibían una reducción en C18:3. Se encontró además que, además de una homocigosis para los alelos *FAD3-A1* o *FAD3-C1* mutantes, la presencia de un segundo gen *FAD3* mutante en estado homocigótico, sorprendentemente también de la de los nuevos genes *FAD3*, en *Brassica napus* podría reducir adicionalmente el contenido de C18:3 de aceite de semillas. Además de ello, además de tanto la mutación *FAD3-A1* y *FAD3-C1* en estado homocigótico, la homocigosis para un tercer alelo *FAD3* mutante podría reducir el contenido de C18:3 en aceite de las semillas de plantas cultivadas en el invernadero incluso por debajo del 3% del contenido total del aceite de las semillas. Se observó, además, que cuantos más alelos *FAD3* mutantes adicionales se apilen en la parte superior de los alelos mutantes de los genes *FAD3A1* y *FAD3C1*, menor será contenido de C18:3 de aceite, tanto en plantas de *Brassica* cultivadas en invernadero como en plantas cultivadas en el campo.

Por lo tanto, en una primera realización, la invención proporciona una planta de *Brassica* que comprende al menos dos alelos *FAD3* mutantes totalmente inactivados de dos genes *FAD3* diferentes, en donde

- i. el primer alelo *FAD3* mutante se selecciona del grupo que consiste en *FAD3-A1* o *FAD3-C1*; y
- ii. el segundo alelo *FAD3* mutante se selecciona del grupo que consiste en *FAD3-A2*, *FAD3-A3* o *FAD3-C2*.

5

En una realización, se proporcionan en esta memoria plantas dobles mutantes que son heterocigóticas u homocigóticas para el primer alelo *FAD3* mutante y heterocigóticas u homocigóticas para el segundo alelo *FAD3* mutante, en donde el genotipo de la planta se puede describir como (el alelo *FAD3* mutante se abrevia como *fad3*, mientras que el alelo de tipo salvaje se representa como *FAD3*):

- 10 - *FAD3-A1 / fad3-a1*, *FAD3-A2 / fad3-a2*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *FAD3-A3 / fad3-a3*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *FAD3-C2 / fad3-c2*
- *FAD3-C1 / fad3-c1*, *FAD3-A2 / fad3-a2*
- *FAD3-C1 / fad3-c1*, *FAD3-A3 / fad3-a3*
- 15 - *FAD3-C1 / fad3-c1*, *FAD3-C2 / fad3-c2*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *FAD3-A2 / fad3-a2*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *FAD3-A3 / fad3-a3*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *FAD3-C2 / fad3-c2*
- *fad3-c1 / fad3-c1*, *FAD3-A2 / fad3-a2*
- 20 - *fad3-c1 / fad3-c1*, *FAD3-A3 / fad3-a2*
- *fad3-c1 / fad3-c1*, *FAD3-C2 / fad3-c2*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *fad3-a2 / fad3-a2*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *fad3-a3 / fad3-a3*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *fad3-c2 / fad3-c2*
- 25 - *FAD3-C1 / fad3-c1*, *fad3-a2 / fad3-a2*
- *FAD3-C1 / fad3-c1*, *fad3-a3 / fad3-a3*
- *FAD3-C1 / fad3-c1*, *fad3-c1 / fad3-c2*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *fad3-a2 / fad3-a2*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *fad3-a3 / fad3-a3*
- 30 - *fad3-a1 / fad3-a1*, *fad3-c2 / fad3-c2*
- *fad3-c1 / fad3-c1*, *fad3-a2 / fad3-a2*
- *fad3-c1 / fad3-c1*, *fad3-a3 / fad3-a2*
- *fad3-c1 / fad3-c1*, *fad3-c1 / fad3-c2*

35 en donde la planta es homocigótica para los alelos de tipo salvaje de los genes *FAD3* restantes (p. ej., *FAD3-A1/fad3-a1*, *FAD3-A2/fad3-a2* corresponde al genotipo *FAD3-A1/fad3-a1*, *FAD3-A2/fad3-a2*, *FAD3-A3/FAD3-A3*, *FAD3-C1/FAD3-C1*, *FAD3-C2/FAD3-C2*)

La invención también proporciona una planta que comprende, además, un tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, en donde dicho tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado se selecciona del grupo que consiste en *FAD3-A1* o *FAD3-C1*, con lo que los alelos *FAD3* mutantes son alelos mutantes de por lo menos tres genes *FAD3* diferentes.

40

Resultará claro para la persona experta que cuando *FAD3-A1* se elige como el primer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, el tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado será *FAD3-C1*, y viceversa.

Por lo tanto, en otra realización, se proporcionan en esta memoria plantas triple mutantes que son heterocigóticas u homocigóticas para el primer alelo *FAD3* mutante, heterocigóticas u homocigóticas para el segundo alelo *FAD3* mutante y heterocigóticas u homocigóticas para el tercer alelo *FAD3* mutante, en donde el genotipo de la planta se puede describir como (el alelo *FAD3* mutante se abrevia como *fad3*, mientras que el alelo de tipo salvaje se representa como *FAD3*):

45

- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *FAD3-A2 / fad3-a2*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *FAD3-A3 / fad3-a3*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- 50 - *FAD3-A1 / fad3-a1*, *FAD3-C2 / fad3-c2*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *FAD3-A2 / fad3-a2*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *FAD3-A3 / fad3-a3*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1*, *FAD3-C2 / fad3-c2*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *fad3-a2 / fad3-a2*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- 55 - *FAD3-A1 / fad3-a1*, *fad3-a3 / fad3-a3*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *fad3-c2 / fad3-c2*, *FAD3-C1 / fad3-c1*
- *FAD3-A1 / fad3-a1*, *FAD3-A2 / fad3-a2*, *fad3-c1 / fad3-c1*

- *FAD3-A1 / fad3-a1, FAD3-A3 / fad3-a3, fad3-c1 / fad3-c1*
- *FAD3-A1 / fad3-a1, FAD3-C2 / fad3-c2, fad3-c1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, FAD3-A2 / fad3-a2, fad3-c1 / fad3-c1*
- 5 - *fad3-a1 / fad3-a1, FAD3-A3 / fad3-a3, fad3-c1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, FAD3-C2 / fad3-c2, fad3-c1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, fad3-a2 / fad3-a2, FAD3-C1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, fad3-a3 / fad3-a3, FAD3-C1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, fad3-c2 / fad3-c2, FAD3-C1 / fad3-c1*
- 10 - *FAD3-A1 / fad3-a1, fad3-a2 / fad3-a2, fad3-c1 / fad3-c1*
- *FAD3-A1 / fad3-a1, fad3-a3 / fad3-a3, fad3-c1 / fad3-c1*
- *FAD3-A1 / fad3-a1, fad3-c2 / fad3-c2, fad3-c1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, fad3-a2 / fad3-a2, fad3-c1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, fad3-a3 / fad3-a3, fad3-c1 / fad3-c1*
- *fad3-a1 / fad3-a1, fad3-c2 / fad3-c2, fad3-c1 / fad3-c1*
- 15 en donde la planta es homocigótica para los alelos de tipo salvaje de los genes *FAD3* restantes (p. ej., *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1* corresponde al genotipo *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-A3/FAD3-A3, FAD3C2/FAD3-C2*).

Se cree que cuantos más alelos *FAD3* mutantes se combinen en una planta, mayor será la reducción en el contenido de C18:3 del aceite de semillas. Por lo tanto, la invención también proporciona una planta que comprende, además, un cuarto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, en donde dicho cuarto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado se selecciona del grupo que consiste en *FAD3-A2, FAD3-A3* o *FAD3-C2*, en donde los alelos *FAD3* mutantes son alelos mutantes de al menos cuatro genes *FAD3* diferentes.

Resultará claro para la persona experta que cuando *FAD3-A2* se elige como el segundo alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, el cuarto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado será *FAD3-A3* o *FAD3-C2*. De manera similar, cuando *FAD3-A3* se elige como el segundo alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, el cuarto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado será *FAD3-A3* o *FAD3-C2* y cuando *FAD3-C2* se elige como el segundo alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, el cuarto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado será *FAD3-A2* o *FAD3-A3*.

Por lo tanto, en otra realización, se proporcionan en esta memoria plantas cuádruple mutantes que son heterocigóticas u homocigóticas para el primer alelo *FAD3* mutante, heterocigóticas u homocigóticas para el segundo alelo *FAD3* mutante, heterocigóticas u homocigóticas para el tercer alelo *FAD3* mutante, y heterocigóticas u homocigóticas para el cuarto alelo *FAD3* mutante, en donde el genotipo de la planta se puede describir como (el alelo *FAD3* mutante se abrevia como *fad3*, mientras que el alelo de tipo salvaje se representa como *FAD3*):

- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 35 - *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- 40 - *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3*
- *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 45 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3*
- *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3*
- *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 50 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*
- 55 - *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- 60 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*

- *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3*
 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
 - 5 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*
 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*
 - 10 - *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*
 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - 15 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3*
 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-a3/fad3-a3*
 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
 - 20 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- en donde la planta es homocigótica para los alelos de tipo salvaje de los genes *FAD3* restantes (p. ej., *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-A3/fad3-a3* corresponde al genotipo *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-A3/FAD3-A3, FAD3 C2 / FAD3-C2*).

La invención proporciona, además, una planta que comprende, además, un quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, en donde dicho quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado se selecciona del grupo que consiste en *FAD3-A2, FAD3-A3* o *FAD3-C2*, con lo que los alelos *FAD3* mutantes son alelos mutantes de por lo menos cinco genes *FAD3* diferentes.

Por lo tanto, en otra realización, se proporcionan en esta memoria plantas quintuple mutantes que son heterocigóticas u homocigóticas para el primer alelo *FAD3* mutante, heterocigóticas u homocigóticas para el segundo alelo *FAD3* mutante, heterocigóticas u homocigóticas para el tercer alelo *FAD3* mutante, heterocigóticas u homocigóticas para el cuarto alelo *FAD3* mutante y heterocigóticas u homocigóticas para el quinto alelo *FAD3* mutante, en donde el genotipo de la planta se puede describir como (el alelo *FAD3* mutante se abrevia como *fad3*, mientras que el alelo de tipo salvaje se representa como *FAD3*):

- *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-A3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 35 - *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-A3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 40 - *fad3a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-A3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 45 - *FAD3-A1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, FAD3-A3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 50 - *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, FAD3-C2/fad3-c2*
- 55 - *fad3-a1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, FAD3-A3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- 60 - *FAD3-A1/fad3-a1, FAD3-A2/fad3-a2, fad3-a3/fad3-a3, fad3-c1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*
- *fad3-a1/fad3-a1, fad3-a2/fad3-a2, fad3-a3/fad3-a3, FAD3-C1/fad3-c1, fad3-c2/fad3-c2*

- *fad3-a1/fad3-a1*, *fad3-a2/fad3-a2*, *FAD3-A3/fad3-a3*, *fad3-c1/fad3-c1*, *fad3-c2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1*, *FAD3-A2/fad3-a2*, *fad3-a3/fad3-a3*, *fad3-c1/fad3-c1*, *fad3-c2/fad3-c2*
 - *FAD3-A1/fad3-a1*, *fad3-a2/fad3-a2*, *fad3-a3/fad3-a3*, *fad3-c1/fad3-c1*, *fad3-c2/fad3-c2*
 - *fad3-a1/fad3-a1*, *fad3-a2/fad3-a2*, *fad3-a3/fad3-a3*, *fad3-c1/fad3-c1*, *fad3-c2/fad3-c2*

- 5 En otra realización, las plantas de la invención comprenden alelos *FAD3* mutantes que comprenden una mutación sin sentido (codón de parada).

En aún otra realización, las plantas de la invención comprenden alelos *FAD3* mutantes que se seleccionan del grupo que consiste en *LOLI105*, *LOLI103*, *LOLI108*, *LOLI111* o *LOLI115*.

- 10 Tal como se utiliza en esta memoria, *LOLI105* o *LOLI105* es un alelo mutante de una secuencia genómica *FAD3-A1*, secuencia codificante o secuencia de aminoácidos de, respectivamente, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 2, que comprende una mutación en SEQ ID NO: 1 en la posición de nucleótido 2405, en SEQ ID NO: 11 en la posición de nucleótido 732 o en la SEQ ID NO: 2 en la posición de aminoácido 244, dando como resultado un cambio de codón en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11 de TGG a TGA o un cambio de aminoácido en SEQ ID NO: 2 de Trp a parada.

- 15 Tal como se utiliza en esta memoria, *LOLI103* o *LOLI103* es un alelo mutante de una secuencia genómica *FAD3-C1*, secuencia codificante o secuencia de aminoácidos de, respectivamente, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 4, que comprende una mutación en SEQ ID NO: 3 en la posición de nucleótido 2702, en SEQ ID NO: 12 en la posición de nucleótido 543 o en la SEQ ID NO: 4 en la posición de aminoácido 181, dando como resultado un cambio de codón en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 12 de TGG a TGA o un cambio de aminoácido en SEQ ID NO: 4 de Trp a parada.

- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, *LOLI108* o *LOLI108* es un alelo mutante de una secuencia genómica *FAD3-A2*, secuencia codificante o secuencia de aminoácidos de, respectivamente, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 6, que comprende una mutación en SEQ ID NO: 5 en la posición de nucleótido 3934, en SEQ ID NO: 13 en la posición de nucleótido 749 o en la SEQ ID NO: 6 en la posición de aminoácido 250, dando como resultado un cambio de codón en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 13 de TGG a TAG o un cambio de aminoácido en SEQ ID NO: 6 de Trp a parada.

- 25 Tal como se utiliza en esta memoria, *LOLI111* o *LOLI111* es un alelo mutante de una secuencia genómica *FAD3-A3*, secuencia codificante o secuencia de aminoácidos de, respectivamente, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 8, que comprende una mutación en SEQ ID NO: 7 en la posición de nucleótido 2847, en SEQ ID NO: 14 en la posición de nucleótido 552 o en la SEQ ID NO: 8 en la posición de aminoácido 184, dando como resultado un cambio de codón en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 14 de TGG a TGA o un cambio de aminoácido en SEQ ID NO: 8 de Trp a parada.

- 30 Tal como se utiliza en esta memoria, *LOLI115* o *LOLI115* es un alelo mutante de una secuencia genómica *FAD3-C2*, secuencia codificante o secuencia de aminoácidos de, respectivamente, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 10, que comprende una mutación en SEQ ID NO: 9 en la posición de nucleótido 3909, en SEQ ID NO: 15 en la posición de nucleótido 551 o en la SEQ ID NO: 10 en la posición de aminoácido 184, dando como resultado un cambio de codón en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 15 de TGG a TAG o un cambio de aminoácido en SEQ ID NO: 10 de Trp a parada.

- 40 La planta de la invención puede producir una cantidad significativamente reducida de proteína *FAD3* funcional en comparación con la cantidad de proteína *FAD3* funcional producida por una planta correspondiente que no comprende los alelos *FAD3* mutantes de la invención. La semilla de la planta puede tener un contenido de C18:3 significativamente reducido de aceite de semillas en comparación con plantas que no comprenden los alelos mutantes *FAD3*.

- 45 Además se describen en esta memoria secuencias de ácido nucleico genes/alelos *FAD3* de tipo salvaje y mutantes de especies de *Brassica*, así como proteínas de tipo salvaje y *FAD3* mutantes. También se describen métodos de generar y combinar alelos *FAD3* mutantes y de tipo salvaje en las plantas de *Brassica*, así como plantas de *Brassica* y partes de plantas que comprenden combinaciones específicas de alelos *FAD3* de tipo salvaje y mutantes en su genoma, por lo que disminuye el contenido C18:3 del aceite de semillas. El uso de estas plantas para la transferencia de alelos *FAD3* mutantes a otras plantas es también adecuado para la invención, como lo son los productos vegetales de cualquiera de las plantas descritas. Además, se describen kits y métodos para la selección asistida por marcadores (MAS) para combinar o detectar genes y/o alelos *FAD3*.

- 50 Secuencias de ácidos nucleicos

Se describen tanto secuencias de ácidos nucleicos *FAD3* de tipo salvaje que codifican proteínas *FAD3* funcionales como secuencias de ácidos nucleicos *FAD3* mutantes (que comprenden una o más mutaciones, preferiblemente mutaciones que resultan en ninguna o en una actividad biológica significativamente reducida de la proteína *FAD3* codificada o en ninguna proteína *FAD3* que está siendo producida) de genes *FAD3* de *Brassicaceae*, en particular de especies de *Brassica*, especialmente de *Brassica napus*, pero también de otras especies de cultivo de *Brassica*. Por ejemplo, especies de *Brassica* que comprenden un genoma A y/o C pueden comprender diferentes alelos de genes *FAD3*, que pueden ser identificados y combinados en una sola planta de acuerdo con la invención. Además, se pueden utilizar métodos de mutagénesis para generar mutaciones en los alelos *FAD3* de tipo salvaje, generando con ello alelos *FAD3* mutantes para uso de acuerdo con la invención. Debido a que alelos *FAD3* específicos se combinan preferiblemente en una planta por cruce y selección, las secuencias de ácidos nucleicos *FAD3* pueden estar presentes dentro de una planta (es decir, de forma endógena), p. ej., una planta de *Brassica*, preferiblemente una planta de *Brassica* que puede ser cruzada con *Brassica napus* o que puede ser utilizada para hacer "sintética" a una planta de *Brassica napus*. La hibridación entre diferentes especies de *Brassica* se describe en la técnica, p. ej., como se indica en Snowdon (2007, Chromosome research 15: 85-95). La hibridación interespecífica puede utilizarse, por ejemplo, para transferir genes, p. ej., del genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma C en *B. carinata* (BBCC), o incluso de, p. ej., el genoma C en *B. napus* (AACC) al genoma B en *B. juncea* (AABB) (por el evento esporádico de una recombinación ilegítima entre sus genomas C y B). Líneas de *Brassica napus* "resintetizadas" o "sintéticas" se pueden producir cruzando los ancestros originales, *B. oleracea* (CC) y *B. rapa* (AA). Barreras de incompatibilidad interespecíficas, y también intergenéricas, pueden ser superadas con éxito en los cruces entre especies de cultivo de *Brassica* y sus parientes, p. ej., mediante técnicas de rescate de embriones o de fusión de protoplastos (véase, p. ej., Snowdon, arriba).

Sin embargo, secuencias *FAD3* aisladas y secuencias de ácidos nucleicos *FAD3* (p. ej., aisladas de la planta por clonación o hechas sintéticamente mediante síntesis de ADN), así como variantes de las mismas y fragmentos de cualquiera de éstas también se describen en esta memoria, ya que éstas se pueden utilizar para determinar qué secuencia está presente de forma endógena en una planta o parte de planta, si la secuencia codifica una proteína funcional, una no funcional o ninguna proteína (p. ej., por expresión en una célula huésped recombinante tal como se describe en esta memoria) y para la selección y transferencia de alelos específicos de una planta a otra, con el fin de generar una planta que tenga la combinación deseada de alelos funcionales y mutantes.

Secuencias de ácidos nucleicos de alelos *FAD3* han sido aisladas de *Brassica napus* tal como se representa en el Listado de secuencias. Se representan secuencias *FAD3* de tipo salvaje, mientras que las secuencias *FAD3* mutantes de estas secuencias y de secuencias esencialmente similares a éstas, se describen en esta memoria más adelante y en los Ejemplos, con referencia a secuencias *FAD3* de tipo salvaje. El ADN que codifica proteína *FAD3* genómica y el correspondiente pre-ARNm, comprende 8 exones (exones numerados 1-8 a partir del extremo 5') interrumpidos por 7 intrones (intrones numerados 1-7 a partir del extremo 5'). En el ADNc y el correspondiente ARNm procesado (es decir, el ARN cortado y empalmado), los intrones se separan y se unen los exones tal como se representa en el Listado de secuencias. Secuencias de exones están más conservadas evolutivamente y, por lo tanto, son menos variables que las secuencias de intrones.

"Secuencias de ácido nucleico *FAD3-A1*" o "secuencias de ácidos nucleicos *FAD3-A1* variantes" de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 2 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 SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 11. A estas secuencias de ácidos nucleicos también se las puede aludir como siendo "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *FAD3* proporcionadas en el Listado de secuencias.

"Secuencias de ácido nucleico *FAD3-C1*" o "secuencias de ácidos nucleicos *FAD3-C1* variantes" de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 4 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 SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 12. A estas secuencias de ácidos nucleicos también se las puede aludir como siendo "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *FAD3* proporcionadas en el Listado de secuencias.

"Secuencias de ácido nucleico *FAD3-A2*" o "secuencias de ácidos nucleicos *FAD3-A2* variantes" de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 6 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 SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 13. A estas

secuencias de ácidos nucleicos también se las puede aludir como siendo "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *FAD3* proporcionadas en el Listado de secuencias.

5 "Secuencias de ácido nucleico *FAD3-A3*" o "secuencias de ácidos nucleicos *FAD3-A3* variantes" de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 8 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 SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 14. A estas secuencias de ácidos nucleicos también se las puede aludir como siendo "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *FAD3* proporcionadas en el Listado de secuencias.

10 "Secuencias de ácido nucleico *FAD3-C2*" o "secuencias de ácidos nucleicos *FAD3-C2* variantes" de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 10 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 SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 15. A estas secuencias de ácidos nucleicos también se las puede aludir como siendo "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias *FAD3* proporcionadas en el Listado de secuencias.

Por lo tanto, se describen secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *FAD3* funcionales de tipo salvaje, incluyendo variantes y fragmentos de las mismas (como se define más adelante), así como secuencias de ácidos nucleicos mutantes de cualquiera de éstas, con lo que la mutación en la secuencia de ácido nucleico preferiblemente resulta en uno o más aminoácidos que se insertan, suprimen o sustituyen en comparación con la proteína *FAD3* de tipo salvaje. Como ya se ha mencionado, preferiblemente la o las mutaciones en la secuencia de ácido nucleico resulta en uno o más cambios de aminoácidos (es decir, en relación con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje se insertan, suprimen y/o sustituyen uno o más aminoácidos), con lo cual la actividad biológica de la proteína *FAD3* se reduce significativamente o se suprime por completo o con lo que se expresa una cantidad significativamente reducida de proteína *FAD3* funcional o ninguna proteína *FAD3* funcional. A una reducción significativa en o una supresión completa de la actividad biológica de la proteína *FAD3* se la alude en esta memoria a una delección o interrupción de residuos o dominios de aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes, tales como el motivo de retención de ER C-terminal, una delección, sustitución o reposicionamiento de cualquiera de las ocho histidinas conservadas, y/o una delección o interrupción de la secuencia señal, de modo que el contenido de C18:3 del aceite de semillas de una planta que expresa el alelo *FAD3* mutante disminuye en comparación con una planta que expresa el correspondiente alelo *FAD3* de tipo salvaje.

Se describen en esta memoria secuencias de ácidos nucleicos tanto endógenas como aisladas. También se describen fragmentos de las secuencias *FAD3* y secuencias de ácidos nucleicos *FAD3* variantes arriba definidas, para uso como cebadores o sondas y como componentes de kits (véase más adelante). Un "fragmento" de *FAD3* o una secuencia de ácido nucleico *FAD3* o variante de la misma (tal como se define) puede ser de diversas longitudes, tales como al menos 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 1100 nucleótidos contiguos de la secuencia codificante de *FAD3* (o de la secuencia variante) o tal como al menos 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 2900 nucleótidos contiguos de la secuencia del genoma *FAD3* (o de la secuencia variante).

Secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas FAD3 funcionales

40 Las secuencias de ácidos nucleicos representadas en el Listado de secuencias codifican proteínas *FAD3* funcionales, de tipo salvaje, de *Brassica napus*. Por lo tanto, estas secuencias son endógenas a las plantas de *Brassica napus* de las que se aislaron. Otras especies de cultivo, variedades, líneas de fecundación o accesos salvajes de *Brassica*, se pueden rastrear en cuanto a otros alelos *FAD3*, que codifican las mismas proteínas *FAD3* o variantes de las mismas. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (p. ej., análisis de transferencia Southern, utilizando, por ejemplo, condiciones de hibridación rigurosas) o técnicas basadas en la PCR para identificar alelos *FAD3* endógenos a otras plantas de *Brassica* tales como diversas variedades, líneas o accesos de *Brassica napus*, pero también se pueden rastrear plantas, órganos y tejidos de *Brassica juncea* (especialmente alelos *FAD3* en el genoma A), *Brassica carinata* (especialmente alelos *FAD3* en el genoma C) y *Brassica rapa* (genoma A) y *Brassica oleracea* (genoma C) en cuanto a otros alelos *FAD3* de tipo salvaje. Además, también se pueden rastrear plantas, órganos y tejidos de *Brassica nigra* (genoma B), *Brassica carinata* (genomas B y C) y *Brassica juncea* (genomas A y B) en cuanto a alelos *FAD3* en el genoma B. Para rastrear a tales plantas, órganos de plantas o tejidos en cuanto a la presencia de alelos *FAD3*, se pueden utilizar las secuencias de ácido nucleico *FAD3* proporcionadas en el Listado de secuencias, o variantes o fragmentos de cualquiera de éstas. Por ejemplo, se pueden utilizar secuencias enteras o fragmentos como sondas o cebadores. Por ejemplo, se pueden utilizar cebadores específicos o degenerados para amplificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas *FAD3* del ADN genómico o el ADNc de la planta, órgano o tejido de la planta. Estas secuencias de ácido nucleico

FAD3 pueden ser aislados y secuenciados utilizando técnicas estándares de biología molecular. El análisis bioinformático puede entonces utilizarse para caracterizar el o los alelos, por ejemplo con el fin de determinar qué alelo *FAD3* corresponde a la secuencia, y qué proteína *FAD3* o variante de la proteína es codificada por la secuencia.

5 El que una secuencia de ácido nucleico codifique una proteína *FAD3* funcional puede analizarse mediante técnicas de ADN recombinante tal como se conocen en la técnica, p. ej., mediante un ensayo de complementación genética utilizando, p. ej., una planta de *Arabidopsis*, que es homocigótica para un *FAD3* totalmente inactivado, o por métodos tal como se describen antes.

10 Además, se entiende que las secuencias de ácidos nucleicos *FAD3* y variantes de las mismas (o fragmentos de cualquiera de éstas) pueden ser identificados *in silico*, mediante el rastreo de bases de datos de ácidos nucleicos para secuencias esencialmente similares. Del mismo modo, una secuencia de ácido nucleico puede sintetizarse químicamente. También se describen fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, que se describen más adelante.

Secuencias de ácidos nucleicos codifican proteínas FAD3 mutantes

15 Se describen en esta memoria secuencias de ácidos nucleicos que comprende una o más deleciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos en relación con las secuencias de ácidos nucleicos de tipo salvaje, al igual que fragmentos de tales moléculas de ácidos nucleicos mutantes. Tales secuencias de ácidos nucleicos mutantes (a las que se alude como secuencias *fad3*) se pueden generar y/o identificar utilizando diversos métodos conocidos tal como se describe más adelante. De nuevo, moléculas de ácido nucleico de este tipo pueden estar presentes tanto
20 en forma endógena como en forma aislada. La o las mutaciones pueden resultar en uno o más cambios (deleciones, inserciones y/o sustituciones) en la secuencia de aminoácidos de la proteína *FAD3* codificada (es decir, no es un "mutación silenciosa"). La o las mutaciones en la secuencia de ácido nucleico pueden resultar en una actividad biológica significativamente reducida o completamente suprimida de la proteína *FAD3* codificada en relación con la proteína de tipo salvaje.

25 Las moléculas de ácidos nucleicos pueden, por lo tanto, comprender una o más mutaciones tales como: una mutación de sentido erróneo, mutación sin sentido o mutación del codón de "PARADA", una mutación por inserción o deleción, una mutación de desplazamiento del marco y/o una mutación del sitio de corte y empalme, tal como se describe ya en detalle anteriormente.

30 Como ya se mencionó, se desea que la o las mutaciones en la secuencia de ácido nucleico resulten preferiblemente en una cantidad significativamente reducida de o ninguna proteína *FAD3* funcional en la célula *in vivo*. Básicamente, cualquier mutación que resulte en una proteína que comprende al menos una inserción, deleción y/o sustitución de aminoácido con respecto a la proteína de tipo salvaje puede conducir a una actividad biológica significativamente reducida o a ninguna. Sin embargo, ha de entenderse que es más probable que mutaciones en determinadas partes de la proteína resulten en una función reducida de la proteína *FAD3* mutante, tales como mutaciones que conducen
35 a proteínas truncadas, con lo que se suprimen o sustituyen partes significativas de los residuos o dominios de aminoácidos funcionales, tales como la señal de retención en el ER, los ocho residuos histidina conservados o la secuencia señal.

40 Por lo tanto, secuencias de ácidos nucleicos pueden comprender uno o más de cualquiera de los tipos de mutaciones arriba descritas. También, secuencias *fad3* pueden comprender una o más mutaciones del codón de parada (sin sentido). Cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos mutantes anteriores se describen *per se* (en forma aislada), así como plantas y partes de plantas que comprenden tales secuencias de forma endógena. En la Tabla 2 de esta memoria se describen los alelos *fad3* más preferidos.

45 Una mutación sin sentido en un alelo *FAD3*, tal como se usa en esta memoria, es una mutación en un alelo *FAD3*, con lo que uno o más codones de parada de la traducción se introducen en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del correspondiente alelo *FAD3* de tipo salvaje. Codones de parada de la traducción son TGA (UGA en el ARNm), TAA (UAA) y TAG (UAG). Por lo tanto, cualquier mutación (deleción, inserción o sustitución) que conduzca a la generación de un codón de parada en marco en la secuencia codificante resultará en la terminación de la traducción y en el truncamiento de la cadena de aminoácidos. Un alelo *FAD3* mutante que comprende una mutación sin sentido es un alelo *FAD3* en el que un codón de parada en marco se introduce en la
50 secuencia de codón *FAD3* mediante una sola sustitución de nucleótidos, tales como *LOLI103*, *LOLI105*, *LOLI108*, *LOLI111* y *LOLI115*. También, un alelo *FAD3* mutante que comprende una mutación sin sentido es un alelo *FAD3* en el que un codón de parada en marco se introduce en la secuencia codificante de *FAD3* mediante sustituciones dobles de nucleótidos. También, un alelo *FAD3* mutante que comprende una mutación sin sentido es un alelo *FAD3*

en el que un codón de parada en marco se introduce en la secuencia codificante de *FAD3* mediante sustituciones triples de nucleótidos. La proteína truncada carece de los aminoácidos codificados por el ADN codificante aguas abajo (3') de la mutación (es decir, la parte C-terminal de la proteína *FAD3*) y conserva los aminoácidos codificados por el ADN codificante aguas arriba (5') de la mutación (es decir, la parte N-terminal de la proteína *FAD3*). Un alelo *FAD3* mutante que puede comprender una mutación sin sentido es un alelo *FAD3* en el que la mutación sin sentido está presente en cualquier parte aguas arriba de o que incluye los nucleótidos que codifican el motivo de retención de ER (nt 1117-1131 de SEQ ID NO: 11), de modo que faltan al menos lisina 375 y/o lisina 373, o residuos homólogos a las mismas.

Cuanto más truncada esté la proteína *FAD3* mutante en comparación con la proteína *FAD3* de tipo salvaje, más probable será que el truncamiento pueda resultar en una funcionalidad significativamente reducida o ninguna de la proteína *FAD3 in vivo*. Por lo tanto, se describe un alelo *FAD3* mutante que comprende una mutación sin sentido aguas arriba de o que incluye los nt 895-897, nt 892-894 o nt 883-885 de SEQ ID NO: 11, es decir, resultando en una proteína truncada de menos de aproximadamente 299, 298 ó 295 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (que carecen de las octava, séptima y sexta histidinas conservadas de la tercera caja his). También adecuado para la invención es un alelo *FAD3* mutante que comprende una mutación sin sentido aguas arriba de o incluyendo los nt 394-396, nt 391-393 o nt 382-384 de SEQ ID NO: 11, es decir, resultando en una proteína truncada de menos de aproximadamente 131, 130 ó 128 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (que carecen de la quinta, cuarta y/o tercera histidina de la segunda caja his), o un alelo *FAD3* mutante que comprende una mutación sin sentido aguas arriba de o incluyendo los nt 286-288 o nt 274-276 de SEQ ID NO: 11, es decir, lo que resulta en una proteína truncada de menos de aproximadamente 96 ó 92 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (que carece de la segunda y/o primera sexta histidina conservadas de la primera caja his). Como ya se ha mencionado, las regiones o residuos correspondientes en otras secuencias *FAD3* de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos *FAD3* se pueden identificar determinando el alineamiento óptimo.

También se describe un alelo *FAD3* mutante comprende una mutación sin sentido que resulta en el uso de una ATG alternativo como codón de iniciación y la síntesis de una proteína truncada en el extremo N que carece de la putativa secuencia señal.

Una mutación de sentido erróneo en un alelo *FAD3*, tal como se utiliza en esta memoria, es cualquier mutación (deleción, inserción o sustitución) en un alelo *FAD3* mediante la cual uno o más codones son cambiados en el ADN codificante y la secuencia de ARNm correspondiente del correspondiente alelo *FAD3* de tipo salvaje, resultando en la sustitución de uno o más aminoácidos en la proteína *FAD3* de tipo salvaje para uno o más de otros aminoácidos en la proteína *FAD3* mutante. Un alelo *FAD3* mutante que puede comprender una mutación de sentido erróneo es un alelo *FAD3*, en el que están sustituidos uno o más de los aminoácidos del motivo de retención de ER, es decir, los residuos 373-377, especialmente lisina 373 y/o 375 de *FAD3*-A1, o residuos homólogos de los mismos. Tales mutaciones conducirán a una pérdida de la localización del ER. También mutaciones de sentido erróneo que resultan en la sustitución de uno o más de los ocho residuos histidina de unión di-hierro conservadas resultarán en una pérdida completa de la función de la proteína. Además, es probable que las mutaciones de sentido erróneo que resultan en la sustitución de aminoácidos en la secuencia señal N-terminal resulten en una enzima no funcional debido a la pérdida de su localización del ER.

Una mutación de desplazamiento de marco en un alelo *FAD3*, tal como se utiliza en esta memoria, es una mutación (deleción, inserción, duplicación, y similares) en un alelo *FAD3* que resulta en la secuencia de ácido nucleico que se está traduciendo en un marco diferente aguas abajo de la mutación que conduce a una cantidad significativamente reducida de o sin enzima *FAD3* funcional *in vivo*.

Una mutación en el sitio de corte y empalme en un alelo *FAD3* es una mutación que resulta en corte y empalme aberrante del pre-ARNm que resulta en una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida o ninguna. En esta memoria se describe cualquier mutación (inserción, deleción y/o sustitución de uno o más nucleótidos) que altera el corte y empalme del pre-ARNm y, con ello, conduce a una cantidad significativamente reducida de o sin enzima *FAD3* funcional *in vivo*. Un alelo *FAD3* mutante puede comprender una mutación en el sitio de corte y empalme es un alelo *FAD3* en el que el corte y empalme alterado es provocado por la introducción en la región de ADN transcrita de *FAD3* de una o más sustituciones de nucleótidos de los dinucleótidos consenso del sitio de corte y empalme 5' o del sitio de corte y empalme 3' tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, GU puede, por ejemplo, ser mutado a AU en el sitio de corte y empalme de donantes y/o AG puede ser mutado a AA en la secuencia del sitio de corte y empalme del aceptor.

Secuencias de aminoácidos

Se describen tanto secuencias de aminoácidos FAD3 de tipo salvaje (funcionales) como secuencias de aminoácidos FAD3 mutantes (que comprende una o más mutaciones, preferiblemente mutaciones que resultan en una cantidad significativamente reducida de enzima FAD3 funcional o sin enzima FAD3 funcional *in vivo*) 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 comprende un genoma A y/o un genoma C pueden codificar diferentes aminoácidos FAD3. Además, se pueden utilizar métodos de mutagénesis para generar mutaciones en alelos FAD3 de tipo salvaje, generando de esta manera alelos mutantes que pueden codificar proteínas FAD3 mutantes adicionales. Las secuencias de aminoácidos FAD3 mutantes de tipo salvaje pueden estar presentes dentro de una planta de *Brassica* (es decir, de forma endógena). Sin embargo, también se describen en esta memoria secuencias de aminoácidos FAD3 aisladas (p. ej., aisladas a partir de la planta o hechas sintéticamente), así como variantes de las mismas y fragmentos de cualquiera de éstas.

Secuencias de aminoácidos de proteínas FAD3 se han deducido a partir de las secuencias FAD3 de ADN genómico que han sido aisladas de *Brassica napus tal* como se representa en el Listado de secuencias. Se representan las secuencias FAD3 de tipo salvaje, mientras que las secuencias FAD3 mutantes de estas secuencias y de secuencias esencialmente similares a éstas, se describen en esta memoria a continuación, con referencia a las secuencias FAD3 de tipo salvaje. Las proteínas FAD3 de *Brassica* descritas en esta memoria son de 377 a 388 aminoácidos de longitud y comprenden un cierto número de dominios estructurales y funcionales y residuos aminoácidos, tal como se describe anteriormente.

"Secuencias de aminoácidos FAD3-A1" o "secuencias de aminoácidos FAD3-A1 variantes", de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 2. A estas secuencias de aminoácidos también se las puede aludir como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias FAD3 proporcionadas en el Listado de secuencias.

"Secuencias de aminoácidos FAD3-C1" o "secuencias de aminoácidos FAD3-C1 variantes", de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 4. A estas secuencias de aminoácidos también se las puede aludir como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias FAD3 proporcionadas en el Listado de secuencias.

"Secuencias de aminoácidos FAD3-A2" o "secuencias de aminoácidos FAD3-A2 variantes", de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 6. A estas secuencias de aminoácidos también se las puede aludir como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias FAD3 proporcionadas en el Listado de secuencias.

"Secuencias de aminoácidos FAD3-A3" o "secuencias de aminoácidos FAD3-A3 variantes", de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 8. A estas secuencias de aminoácidos también se las puede aludir como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias FAD3 proporcionadas en el Listado de secuencias.

"Secuencias de aminoácidos FAD3-C2" o "secuencias de aminoácidos FAD3-C2 variantes", de acuerdo con 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 SEQ ID NO: 10. A estas secuencias de aminoácidos también se las puede aludir como "esencialmente similares" o "esencialmente idénticas" a las secuencias FAD3 proporcionadas en el Listado de secuencias.

Por lo tanto, se describen en esta memoria tanto secuencias de aminoácidos de proteínas FAD3 de tipo salvaje, funcionales, incluyendo variantes y fragmentos de las mismas (tal como se define más adelante) como secuencias de aminoácidos mutantes de cualquiera de éstas, con lo que la mutación en la secuencia de aminoácidos preferiblemente resulta en una reducción significativa en o una supresión completa de la actividad biológica de la proteína FAD3 en comparación con la actividad biológica de la proteína FAD3 de tipo salvaje correspondiente. Una reducción significativa en o la supresión completa de la actividad biológica de la proteína FAD3 se refiere en esta memoria a una reducción significativa en la conversión de C18:2 en C18:3, de manera que el aceite de semillas de una planta que expresa la proteína FAD3 mutante tiene un contenido reducido en C18:3 en comparación con una planta que expresa la proteína FAD3 de tipo salvaje correspondiente.

Se describen en esta memoria tanto las secuencias de aminoácidos endógenas como las aisladas. También se describen fragmentos de las secuencias de aminoácidos FAD3 y secuencias de aminoácidos FAD3 variantes definidas anteriormente. Un "fragmento" de una secuencia de aminoácidos FAD3 o variante de la misma (tal como se define) puede ser de diversas longitudes tales como al menos 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ó 370 aminoácidos contiguos a la secuencia de FAD3 (o de la secuencia variante).

Secuencias de aminoácidos de proteínas FAD3 funcionales

Las secuencias de aminoácidos representadas en el Listado de secuencias son proteínas FAD3 funcionales de tipo salvaje de *Brassica napus*. Por lo tanto, estas secuencias son endógenas a las de plantas de *Brassica napus* de las que se aislaron. Otras especies de cultivo, variedades, líneas de reproducción o accesos salvajes de *Brassica* pueden ser rastreadas en cuanto a otras proteínas FAD3 funcionales con las mismas secuencias de aminoácidos o variantes de los mismos tal como se describe anteriormente.

Además, se entiende que las secuencias de aminoácidos FAD3 y variantes de las mismas (o fragmentos de cualquiera de éstas) se puede identificar *in silico*, mediante el rastreo de bases de datos de aminoácidos en cuanto a secuencias esencialmente similares. También se describen fragmentos de moléculas de aminoácidos de acuerdo con la invención.

Secuencias de aminoácidos de proteínas FAD3 mutantes

Se describen en esta memoria secuencias de aminoácidos que comprenden una o más deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos con relación a las secuencias de aminoácidos de tipo salvaje, al igual que fragmentos de tales moléculas de aminoácidos mutantes. Tales secuencias de aminoácidos mutantes se pueden generar y/o identificar utilizando diversos métodos conocidos, tal como se describe anteriormente. De nuevo, tales moléculas de aminoácidos se describen tanto en forma endógena como en forma aislada.

La o las mutaciones en la secuencia de aminoácidos pueden resultar en una actividad biológica significativamente reducida o completamente suprimida de la proteína FAD3 con relación a la proteína de tipo salvaje. Tal como se describe anteriormente, básicamente, cualquier mutación que resulta en una proteína que comprende al menos una inserción, deleción y/o sustitución de aminoácido con respecto a la proteína de tipo salvaje puede conducir a una actividad biológica significativamente reducida o ninguna. Sin embargo, ha de entenderse que es más probable que mutaciones en determinadas partes de la proteína resulten en una función reducida de la proteína FAD3 mutante, tales como mutaciones que conducen a proteínas truncadas, con lo que se eliminan o sustituyen partes significativas de los residuos o dominios de aminoácidos funcionales y/o estructurales, tales como la señal de retención del ER, los ocho residuos histidina conservados o la secuencia señal, tal como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, se describen proteínas FAD3 mutantes que comprenden una o más mutaciones de deleción o inserción, con lo que la o las eliminaciones, inserciones o sustituciones resultan en una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida o ninguna *in vivo*. Tales proteínas FAD3 mutantes son proteínas FAD3 en las que se suprimen, insertan o sustituyen al menos 1, al menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 370 o más aminoácidos, en comparación con la proteína FAD3 de tipo salvaje, con lo cual la o las deleciones o inserciones resultan en una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida o ninguna *in vivo*.

Se describen proteínas FAD3 mutantes que están truncadas, con lo cual el truncamiento resulta en una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida o ninguna *in vivo*. La proteína truncada carece de los aminoácidos codificados por el ADN codificante aguas abajo (3') de la mutación (es decir, la parte C-terminal de la proteína FAD3) y conserva los aminoácidos codificados por el ADN codificante aguas arriba (5') de la mutación (es decir, la parte N-terminal de la proteína FAD3). También se describe una proteína FAD3 truncada que comprende la parte N-terminal de la proteína FAD3 de tipo salvaje correspondiente hasta, pero no incluyendo (completamente) el motivo de retención de ER, es decir, correspondiente a cualquier parte aguas arriba del o de los residuos lisina en la posición 375 y/o 373 de SEQ ID NO: 2, de modo que al menos faltan lisina 375 y/o lisina 373 (o residuos lisina correspondientes en otras proteínas FAD3). Cuanto más truncada esté la proteína FAD3 mutante en comparación con la proteína FAD3 de tipo salvaje, más truncamiento puede resultar en una actividad significativamente reducida o ninguna *in vivo* de la proteína FAD3. También se describe una proteína truncada de menos de aproximadamente 299, 298 ó 295 aminoácidos (que carecen de las octava, séptima y o sexta histidinas conservadas de la tercera caja his), menos de aproximadamente 131, 130 ó 128 aminoácidos (que carecen de la quinta, cuarta y/o tercera sextas histidinas conservadas de la segunda caja his), menos de aproximadamente 96 ó 92 aminoácidos (que carecen de la segunda y/o primera sextas histidinas conservadas de la primera caja his) de SEQ ID NO: 2 o residuos homólogos de los mismos. También se describe una proteína truncada en el extremo N que carece de la putativa secuencia señal.

Se describen proteínas FAD3 mutantes que comprenden una o más mutaciones de sustitución, con lo que la o las sustituciones resultan en una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida o ninguna *in vivo*. Tales proteínas mutantes FAD3 son proteínas FAD3 en las que están sustituidos los residuos de aminoácidos conservados que tienen una función específica tal como la fijación del ER como objetivo o la retención o la unión del hierro. Se describe una proteína FAD3 mutante, en donde están sustituidos uno o más de los aminoácidos del motivo de retención del ER, es decir, los residuos 373-377, especialmente lisina 373 y/o 375 de SEQ ID NO: 2, o los residuos homólogos de los mismos. Tales mutaciones conducirán a una pérdida de la localización del ER. También se describen proteínas FAD3 mutantes con sustitución de uno o más de los ocho residuos histidina conservados, que resultará en una pérdida completa de la función de la proteína. Además, se describen proteínas FAD3 mutantes con una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia señal N-terminal. Es probable que estas sustituciones resulten en una proteína FAD3 no funcional, debido a la pérdida de la fijación inicial como objetivo del ER.

Se describen proteínas FAD3 mutantes que comprenden una o más mutaciones de inserción o delección, con lo que la o las inserciones y/o delecciones resultan en una proteína mutante que tiene una actividad significativamente reducida o ninguna *in vivo*. Tales proteínas FAD3 mutantes son proteínas FAD3 en las que se ha alterado el posicionamiento entre residuos aminoácidos conservados que tienen una función específica. Se describe una proteína FAD3 mutante en la que uno o más aminoácidos han sido insertados entre cualquiera de las ocho histidinas conservadas y los putativos dominios de transmembrana. Además, se describe una proteína FAD3 mutante en la que se han suprimido uno o más de los aminoácidos entre cualquiera de las ocho histidinas conservadas y los putativos dominios de transmembrana. Es probable que estas mutaciones resulten en una estructura alterada y posiblemente en una pérdida de la función de la proteína FAD3.

Métodos

Alelos *FAD3* mutantes se pueden generar (por ejemplo inducidos por mutagénesis) y/o identificar utilizando una gama de métodos, que son convencionales en la técnica, por ejemplo utilizando métodos basados en PCR para amplificar parte o la totalidad de la *FAD3* genómica o ADNc.

Después de la mutagénesis, las plantas se cultivan a partir de las semillas tratadas o se regeneran a partir de las células tratadas utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las semillas mutagenizadas pueden plantarse de acuerdo con procesos de cultivo convencionales, y después de la autopolinización se forman las semillas en las plantas. Alternativamente, se pueden extraer plántulas dobles haploides a partir de células de microsporas o polen tratadas para formar inmediatamente plantas homocigóticas, por ejemplo tal como se describe por Coventry *et al.* (1988, Manual for Microspore Culture Technique for *Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. Publicación OAC 0489. Univ. De Guelph, Guelph, Ontario, Canadá). Se puede recolectar semilla adicional que se forma como resultado de una auto-polinización de este tipo en la presente generación o en una posterior y se pueden rastrear en cuanto a la presencia de alelos *FAD3* mutantes, utilizando técnicas que son convencionales en la técnica, por ejemplo técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (amplificación de los alelos *FAD3*) o técnicas basadas en la hibridación, p. ej., análisis de transferencia Southern, rastreo del banco BAC, y similares, y/o mediante secuenciación directa de alelos *FAD3*. Para rastrear la presencia de mutaciones puntuales (los denominados polimorfismos de nucleótido único o SNPs) en los alelos *FAD3* mutantes, se pueden utilizar métodos de detección de SNP convencionales en la técnica, por ejemplo, técnicas basadas en oligogamamiento, técnicas basadas en la extensión de una sola base, tales como pirosecuenciación, o técnicas basadas en las diferencias en los sitios de restricción, tales como TILLING.

Tal como se describió anteriormente, la mutagenización (espontánea, así como inducida) de un alelo *FAD3* de tipo salvaje específico resulta en la presencia de uno o más nucleótidos eliminados, insertados o sustituidos (en lo que sigue denominada "región de mutación") en el alelo *FAD3* mutante resultante. El alelo *FAD3* mutante se puede caracterizar, por lo tanto, por la ubicación y la configuración de uno o más nucleótidos eliminados, insertados o sustituidos en el alelo *FAD3* de tipo salvaje. Al sitio en el alelo *FAD3* de tipo salvaje en el que se han insertado, eliminado o sustituido los uno o más nucleótidos, respectivamente, se alude en esta memoria también como la "región o secuencia de mutación". Una "región o secuencia flanqueante 5' ó 3' " tal como se utiliza en esta memoria se refiere a una región o secuencia de ADN en el alelo *FAD3* 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 diferentes del ADN que contiene el uno o más nucleótidos eliminados, insertados o sustituidos, preferiblemente ADN del alelo *FAD3* mutante (o el tipo salvaje correspondiente) que se encuentra inmediatamente aguas arriba de y contiguo con (región o secuencia flanqueante 5' ") o inmediatamente aguas abajo de y contiguo con (región o secuencia flanqueante 3' ") la región de la mutación en el alelo *FAD3* mutante (o en el correspondiente alelo *FAD3* de tipo salvaje). Una "región de unión", tal como se utiliza en esta memoria se refiere a una región de ADN en el alelo *FAD3* mutante (o el tipo salvaje correspondiente), en que la región de la mutación y la región flanqueante 5' ó 3' están enlazadas entre sí. Una "secuencia que abarca la región de unión entre la región de mutación y la región

flanqueante 5' ó 3' comprende, por lo tanto, una secuencia de mutación, así como la secuencia flanqueante contigua con la misma.

5 Las herramientas desarrolladas para identificar un alelo *FAD3* mutante específico o la planta o el material vegetal que comprende un alelo *FAD3* mutante específico, o productos que comprenden material vegetal que comprende un alelo *FAD3* mutante específico se basan en las características genómicas específicas del alelo *FAD3* mutante específico en comparación con las características genómicas del correspondiente alelo *FAD3* de tipo salvaje tales como un mapa específico de restricción de la región genómica que comprende la región de mutación, marcadores moleculares o la secuencia de las regiones flanqueantes y/o de mutación.

10 Una vez que un alelo *FAD3* mutante específico ha sido secuenciado, se pueden desarrollar cebadores y sondas que reconocen específicamente una secuencia dentro de las regiones flanqueante 5', flanqueante 3' y/o de mutación del alelo *FAD3* 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 *FAD3* mutante en muestras biológicas (tales como muestras de plantas, material vegetal o productos que comprenden material vegetal). Una PCR de este tipo se basa en al menos dos "cebadores" específicos: (1) uno que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' ó 3' del alelo *FAD3* mutante y el otro que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 3' ó 5' del alelo *FAD3* mutante, respectivamente; o (2) uno que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' ó 3' del alelo *FAD3* mutante y el otro que reconoce una secuencia dentro de la región de mutación del alelo *FAD3* mutante; o (3) uno que reconoce una secuencia dentro de la región flanqueante 5' ó 3' del alelo *FAD3* mutante y el otro que reconoce una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 3' ó 5' y la región de mutación del alelo *FAD3* mutante específico (tal como se describe más adelante), respectivamente.

25 Los cebadores tienen preferiblemente una secuencia de entre 15 y 35 nucleótidos que, en condiciones de PCR optimizadas, "reconoce específicamente" una secuencia dentro de la región flanqueante 5' ó 3', una secuencia dentro de la región de mutación, o una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 3' ó 5' y las regiones de mutación del alelo *FAD3* mutante específico, de modo que un fragmento específico ("fragmento específico para *FAD3* mutante" o amplicón discriminante) se amplifica a partir de una muestra de ácido nucleico que comprende el alelo *FAD3* mutante específico. Esto significa que sólo el alelo *FAD3* mutante específico, y no otra secuencia en el genoma de la planta, se amplifica bajo condiciones PCR optimizadas.

Cebadores de la PCR adecuados para la invención pueden ser los siguientes:

- 30 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos consecutivos seleccionada entre la secuencia flanqueante 5' ó 3' de un alelo *FAD3* mutante específico o el complemento del mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia 5' ó 3' que flanquea el uno o más nucleótidos eliminados, insertados o sustituidos en los alelos *FAD3* mutantes de la invención, tal como la secuencia 5' ó 3' que flanquea mutaciones sin sentido, de sentido erróneo, inserción, delección, de desplazamiento de marco o del sitio de corte y empalme descritas anteriormente o el complemento de las mismas) (reconociendo los cebadores secuencias flanqueantes 5'); o
- 35 - oligonucleótidos que oscilan en longitud desde 17 nt hasta aproximadamente 200 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 20 nucleótidos seleccionados de la secuencia de la región de mutación de un alelo *FAD3* mutante específico o el complemento del mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos insertada o sustituida en los genes *FAD3* de la invención o el complemento de la misma) (cebadores que reconocen secuencias de mutación).
- 40

45 Los cebadores pueden, por supuesto, ser más largos que los mencionados 17 nucleótidos consecutivos, y pueden ser, por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt de largo o incluso más. Los cebadores pueden consistir enteramente en secuencia de nucleótidos seleccionadas entre las secuencias de nucleótidos mencionadas de secuencias flanqueantes y de mutación. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de los cebadores en su extremo 5' (es decir, fuera de los 17 nucleótidos consecutivos 3'-localizados) es menos crítica. Por lo tanto, la secuencia 5' de los cebadores puede consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias flanqueantes o de mutación, según sea apropiado, pero puede contener varios (p. ej., 1, 2, 5, 10) apareamientos erróneos. La secuencia 5' de los cebadores puede incluso consistir por completo en una secuencia de nucleótidos que no guarda relación con las secuencias flanqueantes o de mutación tales como, p. ej., una secuencia de nucleótidos que representa sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Tales secuencias no relacionadas o que flanquean secuencias de ADN con apareamientos erróneos no deberían ser preferiblemente de más de 100, más preferiblemente de más de 50 o incluso de 25 nucleótidos.

55

Además de ello, cebadores adecuados pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos que abarca la región de unión entre las secuencias flanqueantes y de mutación (es decir, por ejemplo, la región de unión entre una secuencia 5' ó 3' que flanquea uno o más nucleótidos eliminados, insertados o sustituidos en los alelos *FAD3* mutantes de la invención y la secuencia del uno o más nucleótidos insertados o sustituidos, o la secuencia 3' ó 5', respectivamente, que flanquea el uno o más nucleótidos eliminados tal como la región de unión entre una secuencia 5' ó 3' que flanquea mutaciones sin sentido, de sentido erróneo, de inserción, de delección, de desplazamiento del marco de lectura o del sitio de corte y empalme en los genes *FAD3* de la invención descritas 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 5' ó 3' que flanquea una potencial mutación del codón de PARADA tal como se indica anteriormente o las mutaciones de sustitución indicadas anteriormente y la secuencia de la potencial mutación del codón de PARADA o las mutaciones de sustitución, respectivamente), siempre que la secuencia de nucleótidos no se derive exclusivamente de la región de mutación o de regiones flanqueantes.

También resultará inmediatamente evidente para el experto en la materia que pares de cebadores de PCR seleccionados adecuadamente tampoco deberían comprender secuencias complementarias entre sí.

Para el fin de la invención, el "complemento de una secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID No: X" es la secuencia de nucleótidos que se puede derivar de la secuencia de nucleótidos representada por el reemplazo de los nucleótidos a través de su nucleótido complementario de acuerdo con las reglas de Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) y la lectura de la secuencia en la dirección 5' a 3', es decir, en dirección opuesta a la secuencia de nucleótidos representada.

Ejemplos de cebadores adecuados para identificar alelos *FAD3* mutantes específicos se describen en los Ejemplos.

Tal como se utiliza en esta memoria, "la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. Z de la posición X a la posición Y" indica la secuencia de nucleótidos incluyendo los dos puntos extremos de los nucleótidos.

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 dentro de la región flanqueante 5' ó 3', a una secuencia dentro de la región de mutación, o a una secuencia que abarca las regiones flanqueante 5' ó 3' y de mutación del alelo *FAD3* mutante específico, siempre que los apareamientos erróneos permitan todavía la identificación específica del alelo *FAD3* mutante específico con estos cebadores bajo condiciones de PCR optimizadas. El intervalo de apareamientos erróneos permisibles, sin embargo, se puede determinar fácilmente de modo experimental y son conocidos para una persona experta en la técnica.

La detección y / o identificación de un "mutante fragmento específico *FAD3*" pueden ocurrir de varias maneras, por ejemplo, a través de la estimación del tamaño después de la electroforesis en gel o capilar o por medio de métodos de detección basados en fluorescencia. Los fragmentos específicos mutantes *FAD3* también se pueden secuenciar directamente. También se conocen otros métodos específicos de secuencia para la detección de fragmentos de ADN amplificados en la técnica.

Protocolos de la 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 especifican en un "protocolo de identificación de la PCR" para cada uno de los alelos *FAD3* mutantes específicos. Sin embargo, se entiende que se puede necesitar ajustar un cierto número de parámetros en el protocolo de identificación de la 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 $MgCl_2$ o condiciones de reasociación utilizadas. De manera similar, la selección de otros cebadores puede dictar otras condiciones óptimas para el protocolo de identificación de la PCR. Sin embargo, estos ajustes resultarán evidentes para una persona experta en la técnica, y están, además, detallados en los actuales manuales de aplicación de la PCR, tales como el antes citado.

Alternativamente, se pueden utilizar cebadores específicos para amplificar un fragmento específico *FAD3* mutante que puede utilizarse como una "sonda específica" para identificar un alelo *FAD3* mutante específico en muestras biológicas. La puesta en contacto del ácido nucleico de una muestra biológica con la sonda, bajo condiciones que permitan la hibridación de la sonda con su correspondiente fragmento en el ácido nucleico, resulta en la formación de un híbrido ácido nucleico/sonda. La formación de este híbrido puede detectarse (p. ej., marcando el ácido nucleico o la sonda), con lo que la formación de este híbrido indica la presencia del alelo *FAD3* mutante específico. Tales métodos de identificación basados en la hibridación con una sonda específica (ya sea en un soporte de fase

sólida o en disolución) han sido descritos en la técnica. La sonda específica es preferiblemente una secuencia que, bajo condiciones optimizadas, se hibrida específicamente a una región dentro de la región flanqueante 5' ó 3' y/o dentro de la región de mutación del alelo *FAD3* mutante específico (a la que se alude en lo sucesivo como "región específica de *FAD3* 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%, con especial preferencia entre 90 y 95%, lo más preferiblemente entre 95% y 100% idéntica (o complementaria) a la secuencia de nucleótidos de una región específica. Preferiblemente, la sonda específica comprenderá una secuencia de aproximadamente 13 a aproximadamente 100 nucleótidos contiguos idénticos (o complementarios) a una región específica del alelo *FAD3* mutante específico.

- 10 Sondas específicas adecuadas para la invención pueden ser las siguientes:
- oligonucleótidos que oscilan en longitud entre 13 nt y aproximadamente 1000 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia flanqueante 5' ó 3' de un alelo *FAD3* mutante específico o el complemento del mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia 5' ó 3' que flanquea el uno o más nucleótidos eliminados, insertados o sustituidos en los alelos *FAD3* mutantes de la invención, tal como la secuencia 5' ó 3' que flanquea las mutaciones sin sentido, de sentido erróneo, de inserción, de delección, de desplazamiento del marco o del sitio de corte y empalme descritas anteriormente, o la secuencia 5' ó 3' que flanquea las mutaciones sin sentido, de sentido erróneo, de inserción, de delección o de desplazamiento del marco), o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de la secuencia con la misma (sondas que reconocen secuencias flanqueantes 5' ó 3'); u
 - oligonucleótidos que oscilan en longitud entre 13 nt y aproximadamente 1000 nt, que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 13 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de mutación de un alelo *FAD3* mutante específico o el complemento del mismo (es decir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos insertados o sustituidos en los genes *FAD3* de la invención, o el complemento de la misma), o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la misma (sondas de reconocimiento de secuencias de mutación).

Las sondas pueden consistir enteramente en una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias de nucleótidos mencionadas de secuencias flanqueantes y de mutación. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de las sondas en sus extremos 5' ó 3' es menos crítica. Por lo tanto, las secuencias 5' ó 3' de las sondas pueden consistir en una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias flanqueantes o de mutación, según sea apropiado, pero pueden consistir en una secuencia de nucleótidos no relacionada con las secuencias flanqueantes o de mutación. Tales secuencias no relacionadas deben ser preferiblemente no más de 50, más preferiblemente no más de 25 o incluso no más de 20 ó 15 nucleótidos de largo.

Además de ello, sondas adecuadas pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos que abarca la región de unión entre las secuencias flanqueantes y de mutación (es decir, por ejemplo, la región de unión entre una secuencia 5' ó 3' que flanquea uno o más nucleótidos eliminados, insertados o sustituidos en los alelos *FAD3* mutantes de la invención y la secuencia del uno o más nucleótidos insertados o sustituidos, o la secuencia 3' ó 5', respectivamente, que flanquea el uno o más nucleótidos eliminados tal como la región de unión entre una secuencia 5' ó 3' que flanquea mutaciones sin sentido, de sentido erróneo, de inserción, de delección, de desplazamiento del marco o del sitio de corte y empalme en los genes *FAD3* de la invención arriba descritos y la secuencia de las mutaciones sin sentido, de sentido erróneo, de inserción, de delección, de desplazamiento del marco o del sitio de corte y empalme), siempre que la secuencia de nucleótidos mencionada no se derive exclusivamente de cualquiera de la región de mutación o regiones flanqueantes.

Ejemplos de sondas específicas adecuadas para identificar alelos *FAD3* mutantes específicos se describen en los Ejemplos.

- 45 La detección y/o identificación de una "región específica *FAD3* mutante" que se hibrida con una sonda específica puede producirse de varias maneras, p. ej., a través de la estimación del tamaño después de la electroforesis en gel o a través de métodos de detección basados en fluorescencia. También se conocen en la técnica otros métodos específicos para la secuencia para la detección de una "región específica *FAD3* mutante" que se hibrida con una sonda específica.
- 50 Alternativamente, las plantas o partes de plantas que comprenden uno o más alelos *FAD3* mutantes se pueden generar e identificar utilizando otros métodos, tales como el método "Delete-a-gene™", que utiliza la PCR para el rastreo de mutantes de delección generados por mutagénesis de neutrones rápidos (revisado por Li y Zhang, 2002 *Funct Integr Genomics* 2:254-258), por el método TILLING (lesiones locales dirigidas inducidas en genomas) que identifica mutaciones puntuales inducidas por EMS utilizando cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución (DHPLC) para detectar cambios de pares de bases por análisis heterodúplex (McCallum *et al.*, 2000, *Nat Biotech* 18:455, y McCallum *et al.* 2000, *Plant Physiol* 123, 439-442), etc. Como se ha mencionado, TILLING utiliza

un rastreo de mutaciones de alto rendimiento (p. ej., utilizando la escisión el 1 de heterodúplex de ADN mutantes-de tipo salvaje y la detección utilizando un sistema de gel de secuenciación). Por lo tanto, el uso de TILLING para identificar plantas o partes de plantas que comprenden uno o más alelos *FAD3* mutantes y métodos para generar e identificar tales plantas, órganos de plantas, tejidos y semillas queda abarcado en esta memoria. Así, el método de acuerdo con la invención puede comprender las etapas de mutagenizar semillas de plantas (p. ej., mutagénesis EMS), agrupar individuos de plantas o ADN, la amplificación por PCR de una región de interés, la formación de heterodúplex y la detección de alto rendimiento, la identificación de la planta mutante y la secuenciación del producto PCR mutante. Se entiende que igualmente se pueden utilizar otros métodos de mutagénesis y selección para generar tales plantas mutantes.

En lugar de inducir mutaciones en alelos *FAD3*, alelos mutantes naturales (espontáneos) pueden ser identificados por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar ECOTILLING (Henikoff *et al.* 2004, *Plant Physiology* 135 (2):630-6) para rastrear una pluralidad de plantas o partes de plantas en cuanto a la presencia de alelos *FAD3* mutantes naturales. En cuanto a las técnicas de mutagénesis anteriores, preferiblemente se rastrean especies de *Brassica* son seleccionados que comprenden un genoma A y/o un genoma C, de modo que el alelo *FAD3* identificado se puede introducir subsiguientemente en otras especies de *Brassica*, tales como *Brassica napus*, mediante cruce (cruces inter- o intra-específicos) y selección. En ECOTILLING polimorfismos naturales en líneas de fecundación o especies relacionadas son rastreados por la metodología TILLING descrita anteriormente, en la que se utilizan plantas individuales o agrupaciones de plantas para la amplificación por PCR de la diana *FAD3*, la formación de heterodúplex y el análisis de alto rendimiento. Esto puede ser seguido por la selección de plantas individuales que tienen una mutación requerida que se pueden utilizar subsiguientemente en un programa de fecundación para incorporar el alelo mutante deseado.

A continuación, los alelos mutantes identificados se pueden secuenciar y la secuencia se puede comparar con el alelo de tipo salvaje para identificar la o las mutaciones. Opcionalmente, la funcionalidad se puede testar tal como se indicó anteriormente. Utilizando este enfoque se puede identificar una pluralidad de alelos *FAD3* mutantes (y plantas de *Brassica* que comprenden uno o más de éstos). Los alelos mutantes deseados se pueden combinar con los alelos de tipo salvaje deseados por métodos de cruzamiento y selección tal como se describen más adelante. Finalmente se genera una única planta que comprende el número deseado de alelos *FAD3* mutantes y el número deseado alelos *FAD3* de tipo salvaje.

También se pueden utilizar oligonucleótidos adecuados como cebadores de PCR o sondas específicas para la detección de un alelo *FAD3* mutante específico para el desarrollo de métodos para determinar el estado de zigosidad del alelo *FAD3* mutante específico.

Para determinar el estado de zigosidad de un alelo *FAD3* mutante específico, se puede desarrollar un ensayo basado en PCR para determinar la presencia de un alelo específico *FAD3* mutante y/o de tipo salvaje correspondiente:

Para determinar el estado de zigosidad de un alelo *FAD3* mutante específico, se pueden diseñar dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *FAD3* de tipo salvaje de tal manera que estén dirigidos uno hacia el otro y tengan la región de mutación situada entre los cebadores. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente las secuencias 5' y 3' flanqueantes, respectivamente. Este conjunto de cebadores permite la amplificación por PCR diagnóstica simultánea del alelo mutante, así como del correspondiente alelo *FAD3* de tipo salvaje.

Alternativamente, para determinar el estado de zigosidad de un alelo *FAD3* mutante específico, se pueden diseñar dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *FAD3* de tipo salvaje de tal manera que estén dirigidos uno hacia el 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 5' ó 3' y la región de mutación del alelo *FAD3* 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 *FAD3* mutante, permite la amplificación por PCR diagnóstica simultánea del gen *FAD3* mutante, así como del gen *FAD3* de tipo salvaje.

Alternativamente, para determinar el estado de zigosidad de un alelo *FAD3* mutante específico, se pueden diseñar dos cebadores que reconocen específicamente el alelo *FAD3* de tipo salvaje de tal manera que estén dirigidos uno hacia el otro y que uno de ellos reconozca específicamente la región de unión entre la región flanqueante 5' ó 3' y la región de mutación. Estos cebadores pueden ser cebadores que reconocen específicamente la secuencia flanqueante 5' ó 3' y la región de unión entre la región de mutación y la región flanqueante 3' ó 5' del alelo *FAD3* 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 flanqueante 3' ó 5' del alelo *FAD3*

mutante, respectivamente, permite la amplificación por PCR diagnóstica simultánea del gen *FAD3* mutante, así como del gen *FAD3* de tipo salvaje.

Alternativamente, el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante específico se puede determinar utilizando conjuntos de cebadores alternativos que reconocen específicamente alelos *FAD3* mutantes y de tipo salvaje.

5 Si la planta es homocigótica para el alelo *FAD3* mutante o el correspondiente alelo *FAD3* de tipo salvaje, los ensayos de PCR diagnóstica descritos anteriormente darán lugar a un único producto de PCR típico, preferiblemente típico en longitud, ya sea para el alelo *FAD3* mutante o de tipo salvaje. Si la planta es heterocigótica para el alelo *FAD3* mutante, aparecerán dos productos de PCR específicos, reflejando tanto la amplificación del alelo *FAD3* mutante como del de tipo salvaje.

10 La identificación de los productos de PCR específicos para *FAD3* de tipo salvaje y mutantes se puede producir, p. ej., mediante la estimación del tamaño después electroforesis en gel o capilar (p. ej., para alelos *FAD3* mutantes que comprenden un cierto número de nucleótidos insertados o eliminados que resulta en una diferencia de tamaño entre los fragmentos amplificados a partir del alelo *FAD3* de tipo salvaje y el mutante, de manera que dichos fragmentos se pueden separar de forma visible en un gel); mediante la evaluación de la presencia o ausencia de los dos
15 fragmentos diferentes después de electroforesis en gel o capilar, con lo que la amplificación por PCR diagnóstica del alelo *FAD3* mutante puede, opcionalmente, llevarse a cabo por separado de la amplificación por PCR diagnóstica del alelo *FAD3* de tipo salvaje; por secuenciación directa de los fragmentos amplificados; o por métodos de detección basados en fluorescencia.

20 Ejemplos de cebadores adecuados para determinar la zigosis de alelos *FAD3* mutantes específicos se describen en los Ejemplos.

Alternativamente, para determinar el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante específico, se puede desarrollar un ensayo basado en la hibridación para determinar la presencia de un de un alelo *FAD3* específico mutante y/o de tipo salvaje correspondiente:

25 Para determinar el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante específico, se pueden diseñar dos sondas específicas que reconozcan el alelo *FAD3* de tipo salvaje de tal manera que cada una de las sondas reconozca específicamente una secuencia dentro del alelo de tipo salvaje *FAD3* y que la región de mutación esté situada entre las secuencias reconocidas por las sondas. Estas sondas pueden ser sondas que reconocen específicamente las secuencias flanqueantes 5' y 3', respectivamente. El uso de una o, preferiblemente, de ambas de estas sondas permite la hibridación diagnóstica simultánea del alelo mutante, así como del correspondiente alelo *FAD3* de tipo
30 salvaje.

Alternativamente, para determinar el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante específico, se pueden diseñar dos sondas específicas que reconozcan el alelo *FAD3* de tipo salvaje de tal manera que cada una de ellas reconozca específicamente una secuencia dentro del alelo de tipo salvaje *FAD3* aguas arriba o aguas abajo de la región de mutación, preferiblemente aguas arriba de la región de mutación, y que una de ellas reconozca
35 específicamente la región de mutación. Estas sondas pueden ser sondas que reconocen específicamente la secuencia de la región flanqueante 5' ó 3', preferiblemente la región flanqueante 5' y la región de mutación del alelo *FAD3* de tipo salvaje, respectivamente. El uso de una o, preferiblemente, de ambas de estas sondas, opcionalmente junto con una tercera sonda que específicamente reconoce la secuencia de la región de mutación en el alelo *FAD3* mutante, permite la hibridación diagnóstica del alelo mutante y del gen *FAD3* de tipo salvaje.

40 Alternativamente, para determinar el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante específico, se puede diseñar una sonda específica que reconozca el alelo *FAD3* de tipo salvaje de tal manera que la sonda reconozca específicamente la región de unión flanqueante 5' ó 3', preferiblemente la región flanqueante 5' y la región de mutación del alelo *FAD3* de tipo salvaje. La sonda, opcionalmente junto con una segunda sonda que específicamente reconoce la región de unión entre la región flanqueante 5' ó 3', preferiblemente la región
45 flanqueante 5', y la región de mutación del alelo *FAD3* mutante, permite la hibridación diagnóstica del alelo mutante y del gen *FAD3* mutante y de tipo salvaje.

Alternativamente, el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante específico se puede determinar utilizando conjuntos alternativos de sondas que reconocen específicamente alelos *FAD3* mutantes y de tipo salvaje.

50 Si la planta es homocigótica para el gen *FAD3* mutante o el correspondiente gen *FAD3* de tipo salvaje, los ensayos de hibridación diagnóstica descritos anteriormente darán lugar a un único producto de hibridación específico tales

como uno o más fragmentos de ADN de hibridación (restricción), típicos, preferiblemente típicos en longitud, ya sea para el alelo *FAD3* mutante o de tipo salvaje. Si la planta es heterocigótica para el alelo *FAD3* mutante, aparecerán dos productos de hibridación específicos, que reflejan tanto la hibridación del alelo *FAD3* mutante y de tipo salvaje.

5 La identificación de los productos de hibridación específicos para *FAD3* de tipo salvaje y mutante se puede producir, p. ej., mediante la estimación del tamaño después de electroforesis en gel o capilar (p. ej., para alelos *FAD3* mutantes que comprenden un cierto número de nucleótidos insertados o eliminados que resulta en una diferencia de tamaño entre los fragmentos de ADN hibridante (de restricción) del alelo *FAD3* de tipo salvaje y 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 después de electroforesis en gel o capilar, con lo que la hibridación diagnóstica del alelo *FAD3* mutante puede llevarse a cabo, opcionalmente, por separado de la hibridación diagnóstica del alelo *FAD3* de tipo salvaje; por secuenciación directa de los fragmentos de ADN hibridante (de restricción); o por métodos de detección basados en fluorescencia.

Ejemplos de sondas adecuadas para determinar la zigosis de alelos *FAD3* mutantes específicos se describen en los Ejemplos.

15 Además de ello, también se pueden desarrollar métodos de detección específicos para un alelo *FAD3* mutante específico que difieren de métodos de amplificación basados en PCR o en la hibridación utilizando la información específica de la secuencia específica de alelo *FAD3* mutante proporcionada en esta memoria. Tales métodos de detección alternativos incluyen métodos lineales de detección de la amplificación de la señal basados en la escisión invasiva de estructuras particulares de ácidos nucleicos, también conocida como tecnología Invader™, (tal como se describe, p. ej., en las patentes US. N°s. 5.985.557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6.001.567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage), los métodos de detección basados en RT-PCR, tal como Taqman, u otros métodos de detección, tal como SNplex. Brevemente, en la tecnología Invader™, la secuencia de mutación diana puede ser, p. ej., hibridada con un primer oligonucleótido de ácido nucleico marcado que comprende la secuencia de nucleótidos de la secuencia de mutación o una secuencia que abarca la región de unión entre la región flanqueante 5' y la región de mutación y con un segundo oligonucleótido de ácido nucleico que comprende la secuencia flanqueante 3' inmediatamente aguas abajo y adyacente a la secuencia de mutación, en donde el primer y segundo oligonucleótidos se solapan por al menos un nucleótido. La estructura dúplex o triplex que se produce por esta hibridación permite una escisión selectiva de la sonda con una enzima (Cleavase®), dejando intacta la secuencia diana. La sonda marcada escindida se detecta posteriormente, posiblemente a través de una etapa intermedia que resulta en una amplificación adicional de la señal.

Un "kit", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un conjunto de reactivos con el fin de realizar el método de la invención, más particularmente, la identificación de un alelo *FAD3* mutante específico en muestras biológicas o la determinación del estado de zigosis de material vegetal que comprende un alelo *FAD3* mutante específico. Más particularmente, el kit puede comprender al menos dos cebadores específicos, tal como se describe anteriormente, para la identificación de un alelo *FAD3* mutante específico, o al menos dos o tres cebadores específicos para la determinación del estado de zigosis. Opcionalmente, el kit puede comprender, además, cualquier otro reactivo descrito en esta memoria en el protocolo de identificación por PCR. Alternativamente, el kit puede comprender al menos una sonda específica que se hibrida específicamente con ácido nucleico de muestras biológicas para identificar la presencia de un alelo *FAD3* mutante específico en el mismo, tal como se describe anteriormente, para la identificación de un alelo *FAD3* mutante específico, o al menos dos o tres sondas específicas para la determinación del estado de zigosis. Opcionalmente, el kit puede comprender, además, cualquier otro reactivo (tal como, pero no limitado a tampón de hibridación, marcador) para la identificación de un alelo *FAD3* mutante específico en muestras biológicas, utilizando la sonda específica.

45 El kit de la invención puede utilizarse, y sus componentes se pueden ajustar específicamente, para fines de control de calidad (p. ej., pureza de lotes de semillas), detección de la presencia o ausencia de un alelo *FAD3* mutante específico en material vegetal o material que comprende o se deriva de material vegetal tal como, pero no limitado a productos alimenticios o piensos.

El término "cebador", tal como se utiliza en esta memoria, abarca cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar 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 de doble cadena, aunque se prefiere la forma de cadena sencilla. Las sondas se pueden utilizar como cebadores, pero están diseñados para unirse al ADN o ARN diana y no necesitan ser utilizados en un proceso de amplificación.

El término "reconocer", tal como se utiliza en esta memoria 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 *FAD3* mutante específico bajo las condiciones establecidas en el método (tales como las condiciones del protocolo de identificación por PCR), con lo que la especificidad es determinada por la presencia de controles positivos y negativos.

El término "hibridar", tal como se utiliza en esta memoria cuando se hace referencia 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 *FAD3* específico (mutante o de tipo salvaje) bajo condiciones de rigurosidad estándares. Condiciones de rigurosidad estándares, tal como se utiliza en esta memoria, se refieren a las condiciones de hibridación descritas en esta memoria o a las condiciones de hibridación convencionales tal como se describe por Sambrook *et al.*, 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY) que, por ejemplo, puede comprender las etapas siguientes: 1) inmovilizar fragmentos de ADN genómico de plantas o ADN de bancos BAC en un filtro, 2) prehibridar el filtro durante 1 a 2 horas a 65°C en 6 X SSC, reactivo de 5 X Denhardt, SDS al 0,5% y 20 µg/ml de ADN de soporte desnaturalizado, 3) añadir la sonda de hibridación que ha sido marcada, 4) incubar durante 16 a 24 horas, 5) lavar el filtro una vez durante 30 min. a 68°C en 6X SSC, SDS al 0,1%, 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, SDS al 0,1% y 7) exponer el filtro durante 4 a 48 horas a una película de rayos X a -70°C.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "muestra biológica" es una muestra de una planta, material vegetal o producto que comprende material vegetal. El término "planta" pretende abarcar tejidos vegetales, en cualquier etapa de madurez, así como cualesquiera células, tejidos u órganos tomados de o derivados de cualquier planta, incluyendo, sin limitación, cualesquiera semillas, hojas, tallos, flores, raíces, células individuales, gametos, cultivos celulares, cultivos de tejidos o protoplastos. "Material vegetal", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a material que se obtiene o se deriva de una planta. Productos que comprenden material vegetal se refieren a alimentos, piensos u otros productos que son producidos utilizando material vegetal o que pueden estar contaminados por material vegetal. Se entiende que, en el contexto de la presente invención, muestras biológicas de este tipo se testan para determinar la presencia de ácidos nucleicos específicos para un alelo *FAD3* mutante específico, implicando la presencia de ácidos nucleicos en las muestras. Así, los métodos a los que se alude en esta memoria para identificar un alelo *FAD3* mutante específico en muestras biológicas se refieren a la identificación en muestras biológicas de ácidos nucleicos que comprenden el alelo *FAD3* mutante específico.

La presente invención describe también la combinación de alelos *FAD3* específicos en una planta, a la transferencia de uno o mutante alelos *FAD3* mutantes específicos de una planta a otra planta, a las plantas que comprenden uno o más alelos *FAD3* mutantes específicos, a la progenie obtenida a partir de estas plantas y a células vegetales, partes de plantas y semillas de plantas derivadas de estas plantas.

Así, se describe un método para combinar dos o más alelos *FAD3* 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 *FAD3* mutantes seleccionados, tal como se describe anteriormente,
- b. cruzar una primera planta que comprende uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados con una segunda planta que comprende uno o más de otros alelos *FAD3* mutantes seleccionados, recoger semillas F1 del cruce y, opcionalmente, identificar una planta F1 que comprende uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados de la primera planta con uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados de la segunda planta, tal como se describió anteriormente,
- c. opcionalmente, repetir la etapa (b) hasta obtener una planta F1 que comprenda todos los alelos *FAD3* mutantes seleccionados,
- d. opcionalmente,
 - identificar una planta F1, que es homocigótica o heterocigótica para un alelo *FAD3* mutante seleccionado determinando el estado de zigosidad de los alelos *FAD3* mutantes, tal como se describió anteriormente, o
 - generar plantas que sean homocigóticas para uno o más de los alelos *FAD3* mutantes seleccionados realizando una de las siguientes etapas:
 - extraer plantas doble haploides a partir de células de microsporas o polen tratadas de plantas F1 que comprenden el uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados, tal como se describió anteriormente,
 - autofecundar las plantas F1 que comprende el uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados durante una o más generaciones (y), recoger semillas Sy de F1 de las autofecundaciones e identificar plantas Sy de F1, que son homocigóticas para el uno o más alelos *FAD3* mutantes, tal como se describió anteriormente.

También se describe un método para transferir uno o más alelos *FAD3* mutantes de una planta a otra planta, que comprende las etapas de:

- a. generar y/o identificar una primera planta que comprende uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados, tal como se describió anteriormente, o generar la primera planta combinando el uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados en una planta, tal como se describió anteriormente (en donde la primera planta es homocigótica o heterocigótica para el uno o más alelos *FAD3* mutantes)
- 5 b. cruzar la primera planta que comprende el uno o más alelos *FAD3* mutantes con una segunda planta que no comprende el uno o más alelos *FAD3* mutantes, recoger semillas F1 del cruce (en donde las semillas son heterocigóticas para un alelo *FAD3* mutante si la primera planta era homocigótica para ese alelo *FAD3* mutante, y en el que la mitad de las semillas son heterocigóticas y la mitad de las semillas son alogóticas para, es decir, no comprenden un alelo *FAD3* mutante, si la primera planta era heterocigótica para ese alelo *FAD3* mutante) y, opcionalmente, identificar plantas F1 que comprenden uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados, tal como se describió anteriormente,
- 10 c. retrocruzar plantas F1 que comprenden uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados con la segunda planta que no comprende el uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados durante 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 *FAD3* mutantes seleccionados, tal como se describió anteriormente,
- 15 d. opcionalmente, generar plantas BCx que sean homocigóticas para el uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados realizando una de las siguientes etapas:
 - extraer plantas doble haploides a partir de células de microsporas o polen tratadas de plantas BCx que comprenden el uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados, tal como se describió anteriormente,
 - 20 - autofecundar las plantas BCx que comprende el uno o más alelos *FAD3* mutantes seleccionados durante una o más generaciones (y), recoger semillas Sy de BCx de las autofecundaciones e identificar plantas Sy de BCx, que son homocigóticas para el uno o más alelos *FAD3* mutantes deseados, tal como se describió anteriormente.

25 La primera y la segunda planta son plantas *Brassicaceae*, particularmente plantas de *Brassica*, especialmente plantas de *Brassica napus* o plantas de otra especie de cultivo de *Brassica*. La primera planta es una planta *Brassicaceae*, particularmente una planta de *Brassica*, especialmente una plantas 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 cultivo de *Brassicaceae*, en particular de una línea de cultivo de *Brassica*, especialmente de una línea de cultivo de *Brassica napus* o de una línea de cultivo de especies de cultivo de *Brassica*. "Línea de cultivo", tal como se utiliza en esta memoria, es una línea de plantas preferiblemente homocigóticas distinguible de otras líneas de plantas por un genotipo y/o fenotipo preferido que se utiliza para producir descendencia híbrida.

35 También se describe un método para producir una planta, en particular una planta de cultivo de *Brassica*, tal como una planta de *Brassica napus*, de la cual el aceite de semillas tiene un contenido de C18:3 significativamente reducido, pero que mantiene preferiblemente un desarrollo agrónomicamente adecuado, que comprende combinar y/o transferir alelos *FAD3* mutantes de acuerdo con la invención en o a una planta de *Brassica*, tal como se describió anteriormente.

40 La planta puede ser una planta de *Brassica* que comprende al menos dos genes *FAD3* mutantes, en donde el aceite de semillas tiene un contenido de C18:3 significativamente reducido, pero que mantiene preferiblemente un desarrollo agrónomicamente adecuado, combinando y/o transfiriendo al menos dos alelos *FAD3* mutantes de acuerdo con la invención en o a la planta de *Brassica*, tal como se describió anteriormente.

También se describe el uso de una planta, en particular una planta de cultivo de *Brassica*, tal como una planta de *Brassica napus*, que comprende uno o más de los alelos *FAD3* mutantes de la invención para combinar y/o transferir alelos *FAD3* mutantes de acuerdo con la invención en o a una planta de *Brassica*, tal como se describió anteriormente.

45 En aún otra realización, la invención se refiere al uso de una combinación de alelos *FAD3* mutantes de la invención para reducir el contenido de C18:3 en el aceite de semillas de una planta de *Brassica*.

También se describe el uso de las plantas y semillas de la invención para producir aceite de semillas de colza.

50 En una realización adicional, la invención proporciona el uso de las plantas de la invención para producir semillas que comprenden alelos *FAD3* mutantes o para producir una cosecha de semillas de colza que comprende proteínas *FAD3* mutantes.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 ADN genómico del gen *FAD3-A1* de *Brassica napus*.

- SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de la proteína FAD3-A1 de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 3: ADN genómico del gen *FAD3-C1* de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína FAD3-A2 de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 5: ADN genómico del gen *FAD3-A2* de *Brassica napus*
 5 SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos de la proteína FAD3-A2 de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 7: ADN genómico del gen *FAD3-A3* de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de la proteína FAD3-A3 de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 9: ADN genómico del gen *FAD3-C2* de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de la proteína FAD3-C2 de *Brassica napus*
 10 SEQ ID NO: 11: Región codificante del gen *FAD3-A1* de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 12: Región codificante del gen *FAD3-C1* de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 13: Región codificante del gen *FAD3-A2* de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 14: Región codificante del gen *FAD3-A3* de *Brassica napus*
 SEQ ID NO: 15: Región codificante del gen *FAD3-C2* de *Brassica napus*
 15 SEQ ID NO: 16: Cebador de PCR directo de FAD3 de *Arabidopsis*
 SEQ ID NO: 17: Cebador de PCR inverso de FAD3 de *Arabidopsis*
 SEQ ID NO: 18: Sonda FAM de LOLI105
 SEQ ID NO: 19: Sonda VIC de LOLI105
 SEQ ID NO: 20: Cebador directo de LOLI105
 20 SEQ ID NO: 21: Cebador inverso de LOLI105
 SEQ ID NO: 22: Sonda FAM de LOLI103
 SEQ ID NO: 23: Sonda VIC de LOLI103
 SEQ ID NO: 24: Cebador directo de LOLI103
 SEQ ID NO: 25: Cebador inverso de LOLI103
 25 SEQ ID NO: 26: Sonda FAM de LOLI108
 SEQ ID NO: 27: Sonda VIC de LOLI108
 SEQ ID NO: 28: Cebador directo de LOLI108
 SEQ ID NO: 29: Cebador inverso de LOLI108
 SEQ ID NO: 30: Sonda FAM de LOLI111
 30 SEQ ID NO: 31: Sonda VIC de LOLI111
 SEQ ID NO: 32: Cebador directo de LOLI111
 SEQ ID NO: 33: Cebador inverso de LOLI111
 SEQ ID NO: 34: Sonda FAM de LOLI115
 SEQ ID NO: 35: Sonda VIC de LOLI115
 35 SEQ ID NO: 36: Cebador directo de LOLI115
 SEQ ID NO: 37: Cebador inverso de LOLI115

EJEMPLOS

Todos los ejemplos se llevaron a cabo esencialmente como se describe en el documento WO09/007091.

40 **Ejemplo 1 - Determinación del número de genes *FAD3* en *Brassica napus* y aislamiento de las secuencias de ADN de los genes *FAD3***

Un banco de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de una línea de investigación de primavera OSR se rastreó utilizando una sonda que fue amplificada a partir de ADN genómico de *Arabidopsis* con cebadores con SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 de acuerdo con técnicas estándares de biología molecular y se aislaron clones de BAC que se hibridan a la sonda (en adelante denominadas "colonias positivas").

- 45 El análisis de transferencia Southern se realizó utilizando la misma sonda que antes de acuerdo con técnicas estándares de biología molecular en ADN del clon BAC aislado de las colonias positivas y en ADN genómico aislado de *B. napus* (AC), *Brassica rapa* (AA) y *Brassica oleracea* (CC). Sobre la base de una comparación entre los patrones de hibridación obtenidos después de la digestión de ADN del clon BAC de las colonias positivas identificadas y de ADN genómico aislado de *B. napus*, *B. rapa* y *B. oleracea*, los clones de BAC se agruparon en 5
 50 grupos, de los cuales tres pudieron ser mapeados al genoma A y dos al genoma C. Para cada uno de los 5 grupos se seleccionó un clon de BAC.

Ejemplo 2 - Caracterización de secuencias de genes *FAD3* de *Brassica napus*

Las secuencias de ADN completas de los clones de BAC de las colonias positivas seleccionadas se determinaron por secuenciación 454, después de lo cual las secuencias *FAD3* se identificaron por análisis blast (Blast2seq)

utilizando el gen *FAD3* de *Arabidopsis thaliana* (número de acceso a GenBank D26508) como secuencia de consulta.

5 Las estructuras intrón-exón de las secuencias *FAD3* se determinaron con FgeneSH (Softberry, Inc. Mount Kisco, NY, EE.UU.) y mediante el alineamiento óptimo de la secuencia del gen con la secuencia codificante de de *A. thaliana* (número de acceso a GenBank NM_128552). Las regiones codificantes de proteínas de los genes *FAD3*, así como las secuencias de aminoácidos *FAD3* codificadas por estas secuencias de ácidos nucleicos están representadas en el Listado de secuencias. De los genes *FAD3* mapeados al genoma A, se encontró que la secuencia del gen *FAD3* de mapeo a N04 corresponde al gen *FAD3-A* (número de acceso a GenBank L22962) y se designó *FAD3-A1*, mientras que las secuencias de mapeo a N05 y N03 fueron designados *FAD3-A2* y *FAD3-A3*, respectivamente. De los genes *FAD3* de mapeo al genoma C, se encontró que una de las secuencias corresponde a un gen *FAD3-C* (descrito en el documento WO04/072259) y se designó *FAD3-C1*, mientras que el otro se encontró que era homólogo a *FAD3-A2* y se designó *FAD3-C2*. Estas designaciones se utilizan a lo largo de toda la memoria descriptiva. Las secuencias genómicas de los genes *FAD3* se representan en el Listado de secuencias.

Ejemplo 3 - Expresión de genes *FAD3* de *Brassica*

15 Los niveles de expresión relativos y absolutos de los diversos genes *FAD3* en el desarrollo de embriones de *B. napus* se determinaron mediante secuenciación del transcriptoma completo de ADNcs utilizando la tecnología Roche 454 GS FLX Titanium (<http://www.454.com/products-solutions/how-it-works/index.asp>). Para la producción de ADNc, ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen). Esto se realizó por triplicado para cada una de las etapas de desarrollo embrionario. Posteriormente, se agruparon las muestras de ARN total derivadas de embriones de la misma fase de desarrollo y el ARNm se purificó a partir de las muestras de ARN total con el kit de purificación de ARNm GE Healthcare. En la siguiente etapa, se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc de Doble Cadena SuperScript (Invitrogen). A continuación, el ADNc se fraccionó por tamaño utilizando columnas CHROMA Spin-400 de acuerdo con el protocolo descrito en el Kit de Construcción de Bancos de ADNc SMART (Clontech). Después del análisis de la secuencia de ADNc se realizó una cuantificación del transcrito mediante recuento de lectura de las secuencias diana. La expresión de cada uno de los genes *FAD3* se normalizó para el número de secuencias en el conjunto de datos de cada momento.

Tabla 1: Expresión de *FAD3* normalizada (norm) y porcentaje (%) de la expresión total de *FAD3* en embriones de *Brassica napus* a los 14-35 días post-floración (DAF)

| | 14-20 DAF | | 21-25 DAF | | 26-30 DAF | | 31-35 DAF | |
|---------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | norm | % | norm | % | norm | % | norm | % |
| FAD3-A1 | 210,0 | 38,9% | 213,9 | 39,8% | 150,5 | 42,6% | 22,8 | 26,9% |
| FAD3-C1 | 227,0 | 42,0% | 226,9 | 42,2% | 148,8 | 42,2% | 43,3 | 50,9% |
| FAD3-A2 | 35,0 | 6,5% | 36,7 | 6,8% | 11,6 | 3,3% | 6,3 | 7,4% |
| FAD3-A3 | 32,0 | 5,9% | 38,9 | 7,2% | 30,6 | 8,7% | 9,5 | 11,1% |
| FAD3-C2 | 36,0 | 6,7% | 21,6 | 4,0% | 11,6 | 3,3% | 3,2 | 3,7% |
| Tot | 540,0 | 100,0% | 538,0 | 100,0% | 353,0 | 100,0% | 85,1 | 100,0% |

30 De la tabla 1 es evidente que la expresión total de *FAD3* disminuye con el tiempo. *FAD3-A1* y *FAD3-C1* constituyen la mayor parte de la expresión del ARNm total de *FAD3*, ambas en torno al 40%. Esto es seguido por *FAD3-A3*, *FAD-A2* y *FAD-C2*, que comprende a lo sumo 11,1%, 7,4% y 6,7% de la expresión total de *FAD3*, respectivamente.

Ejemplo 4 - Generación y aislamiento de alelos *FAD3* mutantes de *Brassica*

Se generaron mutaciones en los genes *FAD3* identificados en el Ejemplo 1 y se identificaron como sigue:

- 35 - 30.000 semillas de una línea de cultivo de semillas de colza de primavera de élite (semillas M0) fueron pre-embreadas durante dos horas en un papel de filtro húmedo en agua desionizada o destilada. La mitad de las semillas se expuso a EMS al 0,8% y la mitad a EMS al 1% (Sigma: M0880) y se incubó durante 4 horas.
- Las semillas mutagenizadas (semillas M1) se aclararon 3 veces y se secaron en una campana de humos durante la noche. 30.000 plantas M1 se cultivaron en el suelo y se autofecundaron para generar semillas M2.
- 40 Semillas M2 fueron recolectadas para cada planta M1 individual.

- Plantas M2 dos veces 4800, derivadas de diferentes plantas M1, fueron cultivadas y se prepararon muestras de ADN a partir de muestras de hojas de cada planta M2 individual de acuerdo con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15).
- Las muestras de ADN fueron rastreadas en cuanto a la presencia de mutaciones puntuales en los genes *FAD3* que provocan la introducción de codones de PARADA en las regiones que codifican proteínas de los genes *FAD3* o la interrupción de los sitios de corte y empalme en el ARNm de *FAD3*, mediante secuenciación directa por técnicas de secuenciación estándares (Agowa) y análisis de las secuencias en cuanto a la presencia de las mutaciones puntuales utilizando el software NovoSNP (VIB Amberes)
- Los siguientes alelos *FAD3* mutantes fueron así identificados:

10 Tabla 2: Mutaciones en genes *FAD3*

| Alelo | Posición del nucleótido | | Codón de tipo salvaje | Codón mutante | Secuencia y posición del aminoácido | Tipo de mutación |
|--|-------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-------------------------------------|------------------|
| | Secuencia genómica | Secuencia codificante | | | | |
| <u>FAD3-A1</u> LOLI105 | SEQ ID: 1 2405 | SEQ ID: 11 732 | TGG | TGA | SEQ ID: 2 244 | Trp→Parada |
| <u>FAD3-C1</u> LOLI103 ⁽¹⁾ | SEQ ID: 3 2702 | SEQ ID: 12 543 | TGG | TGA | SEQ ID: 4 181 | Trp→ Parada |
| <u>FAD3-A2</u> LOLI108 ⁽²⁾ | SEQ ID: 5 3934 | SEQ ID: 13 749 | TGG | TAG | SEQ ID: 6 250 | Trp→ Parada |
| <u>FAD3-A3</u> LOLI111 ⁽³⁾ | SEQ ID: 7 2847 | SEQ ID: 14 552 | TGG | TGA | SEQ ID: 8 184 | Trp→ Parada |
| <u>FAD3-C2</u> LOLI115 ⁽²⁾ | SEQ ID: 9 3909 | SEQ ID: 15 551 | TGG | TAG | SEQ ID: 10 184 | Trp→ Parada |

- (1) Semillas que comprenden *FAD3-A1-LOLI105* y *FAD3-C1-LOLI103* (designadas 09MBBN001740) se han depositado en NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Escocia, AB21 9YA, Reino Unido) el 9 de octubre de 2009, bajo el número de acceso NCIMB 41655.
- (2) Semillas que comprenden *FAD3-A2-LOLI108* y *FAD3-C2-LOLI115* (designadas 09MBBN001742) se han depositado en NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Escocia, AB21 9YA, Reino Unido) el 9 de octubre de 2009, bajo el número de acceso NCIMB 41656.
- (3) Semillas que comprenden *FAD3-A3-LOLI111* (designadas 09MBBN000519) se han depositado en NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Escocia, AB21 9YA, Reino Unido) el 9 de octubre de 2009, con el número de acceso NCIMB 41657.

En conclusión, los ejemplos anteriores muestran cómo se pueden generar y aislar alelos *FAD3* mutantes. Además, material vegetal que comprende este tipo de alelos mutantes se puede utilizar para combinar un mutante seleccionado y/o alelos de tipo salvaje en una planta, tal como se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 5 - Identificación de una planta de *Brassica* que comprende un alelo *FAD3* mutante de *Brassica*

- 25 Plantas de *Brassica* que comprenden las mutaciones en los genes *FAD3* identificados en el Ejemplo 4 se identificaron como sigue:
 - Para cada uno de los alelos *FAD3* mutantes identificado en la muestra de ADN de una planta M2, se cultivaron al menos 48 plantas M2 derivadas de la misma planta M1 que la planta M2 que comprende la mutación *FAD3* y muestras de ADN se prepararon a partir de muestras de hojas de cada una de las plantas M2 individuales.
 - 30 - Las muestras de ADN fueron rastreadas en cuanto a la presencia de la mutación puntual de *FAD3* tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 4.
 - Plantas M2 heterocigóticas y homocigóticas (como se determina en base a los electroferogramas) que comprendían la misma mutación fueron autofecundadas y se recogieron las semillas M3.

35 **Ejemplo 6 - Análisis de la composición de ácidos grasos del aceite de semillas de plantas de *Brassica* que comprenden uno a tres genes *FAD3* mutantes de *Brassica* en líneas de élite de *Brassica***

- La correlación entre la presencia de alelos *FAD3* mutantes múltiples en una planta de *Brassica* que se cultiva en invernadero y la composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de la planta de *Brassica* se

determinaron como sigue. De las plantas de *Brassica* identificadas en el Ejemplo 5 (F1S2), plantas que comprenden un alelo mutante de cada uno de los genes *FAD3* (*LOLI105*, *LOLI103*, *LOLI108*, *LOLI115* y *LOLI111*) se cruzaron primero con una línea de cultivo masculina de élite y una femenina de élite de *Brassica*, y las plantas de la progenie que comprenden la mutación se autofecundaron posteriormente para obtener plantas homocigóticas. Para la comparación, se realizaron los mismos cruces con plantas que comprenden alelos *FAD-A1* y *FAD-C1* mutantes tal como se describe en los documento WO01/25453 y WO04/072259, respectivamente. Posteriormente, se determinó la composición de ácidos grasos del aceite de semilla de plantas de la progenie de *Brassica* individuales homocigóticas para el o los alelos *FAD3* mutantes extrayendo los acilos grasos de las semillas y analizando sus niveles relativos en el aceite de semilla por cromatografía capilar de gas-líquido tal como se describe en el documento WO09/007091. La Tabla 3 muestra el porcentaje de C18:3 del contenido de aceite total de al menos 0,2 g de semilla madura de los cruces F1S2 x élite d

Tabla 3: Desviación media (Av) y estándar (SD) de porcentaje (%) de contenido de C18:3 de aceite de semillas en cruces masculinos y femeninos. ND = no pudo ser determinado

| Alelo | Femenino | | Masculino | |
|---|----------|----------|-----------|----------|
| | Av C18:3 | SD C18:3 | Av C18:3 | SD C18:3 |
| FAD3A1/FAD3C1/FAD3A2/FAD3A3/FAD3C2 | | | | |
| LOLI103 | | | | |
| FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 3,59 | 0,32 | 3,97 | 0,38 |
| FAD3A1/LOLI103/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 3,90 | 0,30 | 3,97 | 0,63 |
| TIPO W/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 5,89 | 0,51 | 5,99 | 0,53 |
| TIPO W/LOLI103/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 6,37 | 0,74 | 6,15 | 0,67 |
| LOLI105 | | | | |
| FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 3,82 | 0,74 | 3,69 | 0,88 |
| LOLI105/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 3,68 | 0,42 | 4,35 | 1,54 |
| FAD3A1/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 5,81 | 0,46 | 5,78 | 0,85 |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 6,24 | 0,50 | 5,98 | 0,87 |
| LOLI108 | | | | |
| FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 3,42 | 0,11 | 2,84 | 0,12 |
| FAD3A1/FAD3C1/LOLI108/TIPO W/TIPO W | 2,62 | 0,08 | 2,96 | 0,31 |
| FAD3A1/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 5,89 | 0,83 | 5,55 | 0,67 |
| FAD3A1/TIPO W/LOLI108/TIPO W/TIPO W | 4,83 | 0,32 | 4,93 | 0,26 |
| TIPO W/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 5,48 | 0,32 | 5,04 | 0,23 |
| TIPO W/FAD3C1/LOLI108/TIPO W/TIPO W | 4,31 | 0,37 | 4,36 | 1,06 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 6,54 | 0,55 | 7,20 | 0,92 |
| TIPO W/TIPO W/LOLI108/TIPO W/TIPO W | 6,51 | 0,19 | 5,92 | 0,63 |
| LOLI111 | | | | |
| FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 3,77 | 0,23 | 3,42 | 0,78 |
| FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/LOLI111/TIPO W | 2,58 | 0,17 | 2,43 | 0,55 |
| FAD3A1/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 6,12 | 0,24 | 4,71 | 0,83 |
| FAD3A1/TIPO W/TIPO W/LOLI111/TIPO W | 4,43 | 0,18 | 3,53 | 0,62 |
| TIPO W/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 5,60 | 0,85 | 5,01 | 0,96 |
| TIPO W/FAD3C1/TIPO W/LOLI111/TIPO W | 4,59 | 0,24 | 4,17 | 0,16 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 6,90 | 2,02 | 7,43 | 0,63 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI111/TIPO W | 6,68 | 0,40 | 7,06 | 1,02 |

| | | | | |
|--|------|------|------|------|
| LOLI115 | | | | |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 4.02 | 0.24 | 3.44 | 0.49 |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/LOLI115</i> | - | - | 3.20 | 0.13 |
| <i>FAD3A1/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 5.17 | ND | - | - |
| <i>FAD3A1/TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI115</i> | 6.06 | 0.55 | 4.33 | 0.08 |
| <i>TIPO W/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 4.35 | 0.58 | 4.71 | 1.22 |
| <i>TIPO W/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/LOLI115</i> | 3.29 | ND | - | - |
| <i>TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 5.93 | 0.69 | 5.86 | 0.79 |
| <i>TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI115</i> | 6.49 | 0.99 | - | - |

En primer lugar, las plantas que comprenden los alelos *FAD3-A1* y *FAD3-C1* mutantes tal como se describe en los documentos WO01/25453 y WO04/072259 se compararon con plantas que comprenden los alelos mutantes *LOLI105* (*FAD3-A1*) y *LOLI103* (*FAD3-C1*), respectivamente, en cuanto a su composición de aceite de semillas.

5 Plantas homocigóticas para el alelo *LOLI103* exhibían una reducción similar en el contenido de C18:3 del aceite de semillas en comparación con plantas de tipo salvaje (es decir, que no comprenden ningún alelo *FAD3* mutante) como las plantas homocigóticas para el alelo *FAD3-A1*. Del mismo modo, las plantas homocigóticas para el alelo *LOLI105* exhibían una reducción similar en el contenido de C18:3 del aceite de semillas en comparación con plantas de tipo salvaje como las plantas homocigóticas para el alelo *FAD3-C1*.

10 A continuación, la composición de aceite de semillas de plantas que comprenden los alelos *FAD3* mutantes *LOLI108* (*FAD3-A2*), *LOLI111* (*FAD3-A3*) o *LOLI115* (*FAD3-C2*) se comparó con la de las plantas de tipo salvaje y plantas que comprenden los alelos mutantes *FAD3-A1* y/o *FAD3-C1* de los documentos WO01/25453 y WO04/072259. Las plantas de tipo salvaje (es decir, no comprenden alelo *FAD3* mutante alguno) exhibían un contenido de C18:3 de aceite de semillas de aproximadamente 7%. En el aceite de semillas de plantas que comprenden los alelos mutantes

15 *FAD3-A1* o *FAD3-C1* en estado homocigótico, se observó una reducción del contenido de C18:3 de aceite de semilla de aproximadamente 1-2%. Las plantas que comprenden los alelos mutantes tanto *FAD3-A1* como *FAD3-C1* de los documentos WO01/25453 y WO04/072259 en estado homocigótico exhibían una reducción del contenido de C18:3 de semillas de aceite de a lo sumo 4%. Plantas que comprenden alelos mutantes *LOLI108*, *LOLI111* o *LOLI115* en estado homocigoto no mostraron una reducción significativa en C18:3 en el aceite de semillas cuando se compara

20 con el aceite de semillas de plantas de tipo salvaje. Sorprendentemente sin embargo, los alelos *LOLI108* y *LOLI111* tenían un efecto adicional sobre la reducción de C18:3 en el aceite de semilla por parte de los alelos mutantes *FAD3-A1* y/o *FAD3-C1*. En particular, en plantas de la progenie de cruces con la línea de élite, se encontró que la homocigosidad para el alelo *LOLI108* reducía adicionalmente el contenido de C18:3 de aceite de semillas de plantas homocigóticas para el alelo mutante *FAD3-C1* solo o de plantas homocigóticas para los alelos mutantes tanto *FAD3-A1* como *FAD3-C1*, conduciendo a un contenido total de C18:3 de aceite de semillas en el mutante triple homocigótico de menos de 3%. Se observó un efecto similar para el alelo *LOLI111* en combinación con el alelo mutante *FAD3-A1* solo o en combinación con los alelos mutantes tanto *FAD3-A1* como *FAD3-C1*, resultando de nuevo en una reducción del contenido de C18:3 de aceite de semillas en el mutante triple homocigótico de menos de 3%. En la línea de élite masculina se observó una tendencia similar. Al igual que en *LOLI108* y *LOLI111*, la homocigosidad para el alelo *LOLI115* solo no tenía un efecto de C18:3 del contenido de aceite de semillas en comparación con las plantas de tipo salvaje, pero a veces podría reducir aún más el contenido de C18:3 de aceite de semillas de plantas que ya comprenden los alelos mutantes *FAD3-A1* y/o *FAD3-C1*.

En conclusión, estos datos demuestran que, aunque los genes *FAD3-A2*, *FAD3-A3* y *FAD3-C2* sólo contribuyen a una pequeña fracción de la expresión total de *FAD3* en la semilla en desarrollo y las mutaciones en estos genes por

35 sí solas no alteraban el contenido de C18:3 en el aceite de semillas en cruces de élite, en combinación con mutaciones en los genes *FAD3-A1* y *FAD3-C1* se podría lograr una reducción de C18:3 a aproximadamente menos de 3% cuando las plantas se cultivaron en invernadero.

En un experimento similar, la composición de aceite de las plantas que comprenden los alelos *FAD3* mutantes *LOLI108* (*FAD3-A2*), *LOLI111* (*FAD3-A3*) o *LOLI115* (*FAD3-C2*) en un fondo que comprende los alelos mutantes *FAD3-A1* y/o *FAD3-C1* de los documentos WO01/25453 y WO04/072259 se determinó después de dos retrocruzamientos con líneas de cultivo masculinas o femeninas de élite. Las plantas de la progenie que comprenden la mutación se autofecundaron subsiguientemente para obtener plantas homocigóticas, y la composición de aceite en las semillas de estas plantas tras una segunda autofecundación (BC2S2) se analizaron como se ha descrito anteriormente. La Tabla 4 muestra el porcentaje de C18:3 del contenido total de aceite.

Tabla 4: Desviación media (Av) y estándar (SD) de porcentaje (%) de contenido de C18:3 de aceite de semillas en cruces masculinos y femeninos de élite

| Alelo | Femenino | | Masculino | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Av | SD | Av | SD |
| FAD3A1/FRD3C1/FAD3A2/FAD3A3/FAD3C2 | C18:3 | C18:3 | C18:3 | C18:3 |
| LOLI108 FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W FAD3A1/FAD3C1/LOLI108/TIPO W/TIPO W | 3,76 2,99 | 0,13 0,07 | 3,68 3,89 | 0,09 0,03 |
| LOLI111 FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/LOLI111/TIPO W | 3,88 2,70 | 0,09 0,04 | 3,79 2,33 | 0,08 0,05 |
| LOLI115 FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 3,86 2,98 | 0,10 0,05 | 3,09 4,26 | 0,06 0,09 |

- 5 Estos datos confirman que, aunque los genes *FAD3-A2*, *FAD3-A3* y *FAD3-C2* sólo contribuyen a una pequeña fracción de la expresión total de *FAD3* en la semilla en desarrollo y las mutaciones en estos genes por sí solas no alteraban el contenido de C18:3 en el aceite de semillas en cruces de élite, en combinación con mutaciones en los genes *FAD3-A1* y *FAD3-C1* se podría lograr una reducción de C18:3 a aproximadamente menos de 3% cuando las plantas se cultivaron en invernadero.

Ejemplo 7 - Análisis de la composición de ácidos grasos del aceite de semillas de plantas de Brassica que comprenden de uno a cuatro genes FAD3 mutantes de Brassica en líneas de élite de Brassica cultivadas en invernadero

- 10 El efecto de más de tres alelos *FAD3* mutantes sobre la composición de ácidos grasos del aceite de semilla de plantas de *Brassica* se determinó en el invernadero. De las plantas de *Brassica* identificadas en el Ejemplo 5 (F1S2), plantas que comprenden un alelo mutante de cada uno de los genes *FAD3* (*LOLI105*, *LOLI103*, *LOLI108*, *LOLI115* y *LOLI111*) fueron autofecundadas para obtener plantas homocigóticas. Se hicieron cruces adicionales entre las líneas que contienen los alelos *FAD3* mutantes para obtener plantas con más de un gen *FAD3* mutante. Posteriormente, se
- 15 determinó la composición de ácidos grasos del aceite de semillas de plantas de la progenie de *Brassica* individuales (noBC) homocigóticas para el o los alelos *FAD3* mutantes tal como se describió anteriormente. La Tabla 5 muestra el porcentaje de C18:3 del aceite total de las plantas de *Brassica* en el invernadero.

Tabla 5: Desviación media (Av) y estándar (SD) de porcentaje (%) de contenido de C18:3 de aceite de semillas de plantas de *Brassica* cultivadas en el invernadero

| Alelo | Av | SD |
|---|-------|-------|
| FAD3A1/FAD3A2/FAD3A3/FAD3C1/FAD3C2 | C18:3 | C18:3 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 9,08 | 0,11 |
| Mutantes sencillos | | |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 7,33 | 0,20 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/TIPO W | 9,10 | 0,09 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 7,67 | 0,15 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 9,25 | 0,30 |
| Mutantes dobles | | |
| LOLI105/LOLI108/TIPO W/TIPO W | 6,45 | 0,09 |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 4,57 | 0,05 |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 6,17 | 0,06 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 6,92 | 0,08 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/LOLI115 | 8,26 | 0,10 |

| | | |
|---|------|------|
| Mutantes triples | | |
| <i>LOLI105/LOLI108/TIPO W/LOLI103/TIPO W</i> | 3,39 | 0,05 |
| <i>LOLI105/LOLI108/TIPO W/TIPO W/LOLI115</i> | 5,52 | 0,09 |
| <i>TIPO W/LOLI108/TIPO W/LOLI103/LOLI115</i> | 5,27 | 0,03 |
| Mutante cuádruple | | |
| <i>LOLI105/LOLI108/TIPO W/LOLI103/LOLI115</i> | 2,36 | 0,07 |

A partir del experimento con los mutantes sencillos se puede concluir que sólo los alelos mutantes *FAD3A1* y *FAD3C1* provocan una reducción significativa del contenido de C18:3 del aceite de semillas. Como también se observa en el experimento anterior, los mutantes *FAD3A2*, *FAD3A3* y *FAD3C2* reducen adicionalmente el contenido de C18:3 del aceite de semillas en un fondo genético que ya contiene *FAD3A1* mutante, o *FAD3C1* mutante, o ambos. Además, se observó consistentemente que, en los mutantes dobles y triples, las líneas que comprenden los alelos mutantes tanto *FAD3A1* como *FAD3C1* contienen un contenido de C18:3 significativamente menor de aceite de semillas que las otras líneas que contienen el mismo número de genes *FAD3* mutantes. Además de ello, parece que hay una tendencia hacia los alelos *FAD3* más mutantes presentes cuanto menor sea el contenido de C18:3 en el aceite de semillas.

Ejemplo 8 - Análisis del efecto de apilar múltiples genes *FAD3* mutantes en composiciones de ácidos grasos en plantas de *Brassica* cultivadas en el invernadero

A continuación, se investigó en qué medida el apilamiento de alelos mutantes de genes *FAD3* diferentes, en la parte superior de los alelos mutantes *FAD3A1* y *FAD3C1*, tenía un efecto sobre la composición de ácidos grasos en *Brassica* cultivada en el invernadero. Con este fin, las líneas que contienen las mutaciones *LOLI108*, *LOLI111* y *LOLI115* se retrocruzaron dos veces o tres veces con líneas masculinas y femeninas de élite que comprenden los alelos mutantes *FAD3-A1* y/o *FAD3-C1* de los documentos WO01/25453 y WO04/072259. Las plantas de la progenie que comprenden los alelos mutantes se autofecundaron subsiguientemente para obtener plantas homocigóticas. Se hicieron cruces adicionales entre las líneas que contenían los alelos mutantes de genes *FAD3* que habían sido retrocruzadas dos veces para obtener plantas con alelos mutantes de múltiples genes *FAD3*. Se analizó la composición de aceite en semillas de estas plantas tras una segunda autofecundación (BC2S2 para los mutantes cuádruples y BC3S2 para los triples mutantes) tal como se describe anteriormente. La Tabla 6 muestra el porcentaje de C18:3 del contenido total de aceite.

Tabla 6: Desviación media (Av) y estándar (SD) de porcentaje (%) de contenido de C18:3 de aceite de semillas en cruces masculinos y femeninos de élite tras apilamiento de los diferentes alelos mutantes *FAD3* en la parte superior de los alelos mutantes *FAD3A1* y/o *FAD3C1*.

| Alelo | Femenino | | Masculino | |
|--|----------|----------|-----------|----------|
| | Av C18:3 | SD C18:3 | Av C18:3 | SD C18:3 |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/FAD3A2/FAD3A3/FAD3C2</i> | | | | |
| <i>LOLI108</i> | | | | |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 2,56 | 0,07 | 2,18 | 0,05 |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/LOLI108/TIPO W/TIPO W</i> | 2,02 | 0,04 | 2,09 | 0,03 |
| <i>LOLI111</i> | | | | |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 2,70 | 0,08 | 2,29 | 0,03 |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/LOLI111/TIPO W</i> | 2,24 | 0,04 | 1,56 | 0,02 |
| <i>LOLI115</i> | | | | |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 2,49 | 0,06 | 2,47 | 0,07 |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/LOLI115</i> | 2,05 | 0,08 | 1,92 | 0,04 |
| <i>LOLI108/LOLI111</i> | | | | |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/TIPO W/TIPO W</i> | 2,44 | 0,07 | 2,21 | 0,06 |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/LOLI108/LOLI111/TIPO W/TIPO W</i> | 2,02 | 0,05 | 2,50 | 0,03 |
| <i>FAD3A1/FAD3C1/TIPO W/LOLI111/TIPO W</i> | 2,22 | 0,03 | 1,51 | 0,14 |

Estos resultados demuestran que, en consonancia con los resultados anteriores, los alelos mutantes *FAD3A2*, *FAD3A3* y *FAD3C2* reducen adicionalmente el contenido de C18:3 en líneas que contienen alelos mutantes *FAD3A1* y *FAD3C1*. Además de ello, especialmente en la línea femenina, el apilamiento de los mutantes *FAD3A2* y *FAD3A3* en un fondo con mutantes *FAD3A1* y *FAD3C1* incluso reduce adicionalmente el contenido de C18:3 a niveles claramente por debajo del 2%.

Para investigar con mayor detalle el efecto de mutantes de apilamiento de genes *FAD3* diferentes en la parte superior de los mutantes *FAD3A1* y *FAD3C1* *LOLI105* y *LOLI108*, la composición de ácidos grasos se determinó en líneas que contenían dos, tres, cuatro o cinco genes *FAD3* mutantes. Con este fin, las líneas que contenían los alelos *LOLI105*, *LOLI103*, *LOLI108*, *LOLI111* y *LOLI115* se retrocruzaron tres veces en líneas de élite de *Brassica*. Las plantas de la progenie que comprenden la mutación se autofecundaron posteriormente para obtener plantas homocigóticas y se cruzaron adicionalmente con líneas que contenían otros alelos *FAD3* mutantes con el fin de obtener combinaciones de diferentes mutantes. Se analizó la composición de aceite en las semillas de estas plantas tras una segunda autofecundación (BC3S2) tal como se describe anteriormente. La Tabla 7 muestra el porcentaje de C18:3 del contenido total de aceite.

Tabla 7: Desviación media (Av) y estándar (SD) de porcentaje (%) de contenido de C18:3 de aceite de semillas en cruces masculinos y femeninos de élite tras apilamiento de los diferentes alelos mutantes *FAD3* en la parte superior de los alelos mutantes *FAD3A1* y/o *FAD3C1*.

| Alelo | Av | SD |
|---|-------|-------|
| FAD3A1/FAD3C1/FAD3A2/FAD3A3/FAD3C2 | C18:3 | C18:3 |
| <i>TIPO W</i> / <i>TIPO W</i> / <i>TIPO W</i> / <i>TIPO W</i> / <i>TIPO W</i> | 4,84 | 0,10 |
| Mutante doble | | |
| <i>LOLI105/LOLI103</i> / <i>TIPO W</i> / <i>TIPO W</i> / <i>TIPO W</i> | 2,95 | 0,05 |
| Mutantes triples | | |
| <i>LOLI105/LOLI103/LOLI108</i> / <i>TIPO W</i> / <i>TIPO W</i> | 2,39 | 0,11 |
| <i>LOLI105/LOLI103/LOLI108</i> / <i>TIPO W</i> / <i>LOLI111</i> / <i>TIPO W</i> | 2,23 | 0,04 |
| <i>LOLI105/LOLI103/LOLI108</i> / <i>TIPO W</i> / <i>LOLI115</i> | 2,42 | 0,04 |
| Mutantes cuádruples | | |
| <i>LOLI105/LOLI103/LOLI108/LOLI111</i> / <i>TIPO W</i> | 1,48 | 0,01 |
| <i>LOLI105/LOLI103/LOLI108/LOLI111</i> / <i>LOLI115</i> | 1,62 | 0,05 |
| <i>LOLI105/LOLI103/LOLI108/LOLI111</i> / <i>LOLI115</i> | 1,50 | 0,01 |
| Mutante quíntuple | | |
| <i>LOLI105/LOLI103/LOLI108/LOLI111/LOLI115</i> | 0,80 | 0,02 |

De la Tabla 7 se puede observar que cuantos más alelos mutantes de otros genes *FAD* en la parte superior de los alelos mutantes de *FAD3A1* y *FAD3C1*, menor será el contenido de C18:3. En los mutantes cuádruples que comprenden alelos mutantes tanto *FAD3A1* como *FAD3C1*, así como alelos mutantes de otros dos genes *FAD3*, el contenido de C18:3 se puede reducir hacia aproximadamente 1,5%, y en los mutantes quíntuples que comprenden alelos mutantes de *FAD3A1*, *FAD3C1*, *FAD3A2*, *FAD3A2* y *FAD3C2*, el contenido de C18:3 en el aceite pueden reducirse adicionalmente hasta el 0,8%.

Se cree que en un fondo con un contenido de C18:3 en el aceite de semillas superior a estas líneas de élite masculina y femeninas, la introducción del alelo *LOLI103* también tendrá un efecto adicional sobre la reducción de C18:3 en el aceite de semilla por los alelos mutantes *FAD3-A1* y/o *FAD3-C1*. Se cree, además, que cuantos más alelos *FAD3* mutantes se combinen en una planta, mayor será la reducción en el contenido de C18:3 del aceite de semillas.

Ejemplo 9 - Análisis del efecto de genes *FAD3* mutantes sobre la composición de ácidos grasos en plantas de *Brassica* cultivadas en el campo

Se establecieron y se llevaron a cabo ensayos para analizar adicionalmente la correlación entre la presencia de genes *FAD3* mutantes en plantas de *Brassica* y el contenido de C18:3 de aceite de semillas de plantas de *Brassica* en el campo. De las plantas de *Brassica* identificadas en el Ejemplo 5 (F1S2), plantas que comprenden un alelo mutante de cada uno de los genes *FAD3* (*LOLI105*, *LOLI103*, *LOLI108*, *LOLI115* y *LOLI111*) fue autofecundado para

- 5 obtener plantas homocigóticas. Se hicieron cruces adicionales entre las líneas que contenían los genes *FAD3* mutantes para obtener plantas con más de un gen *FAD3* mutante. Las plantas fueron cultivadas en el campo en Bélgica (un lugar) y en Canadá (dos lugares). Se determinó la composición de ácidos grasos de la semilla de aceite de estas plantas (noBC) tal como se describe arriba. La Tabla 8 muestra el porcentaje de C18:3 del aceite total de las plantas de *Brassica* cultivadas en el campo en Bélgica, y la Tabla 9 muestra el porcentaje de C18:3 del aceite total de las plantas de *Brassica* cultivadas en dos lugares en el campo en Canadá.

Tabla 8: Desviación media (Av) y estándar (SD) de porcentaje (%) de contenido de C18:3 de aceite de semillas en plantas de *Brassica* con diferentes genes *FAD3* mutantes cultivados en el campo en Bélgica.

| alelo FAD3A1/FAD3A2/FAD3A3/FAD3C1/FAD3C2 | Av C18:3 | SD C18:3 |
|---|-------------|-------------|
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 10,0 | 0,38 |
| Mutantes sencillos | | |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 7,05 | 0,28 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 9,33 | 0,22 |
| TIPO W/TIPO W/LOLI111/TIPO W/TIPO W | 8,76 | 0,43 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 7,69 | 0,15 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 9,71 | 0,25 |
| Mutantes dobles | | |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 4,10 | 0,10 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 6,95 | 0,29 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 9,20 | 0,28 |
| TIPOW/TIPOW/LOLI111/LOLI103/TIPO W | 6,76 | 0,41 |

- 10 Tabla 9: Porcentaje (%) medio de contenido de C18:3 de aceite de semillas en plantas de *Brassica* con diferentes genes *FAD3* mutantes cultivados en dos lugares el campo en Canadá.

| alelo FAD3A1/FAD3A2/FAD3A3/FAD3C1/FAD3C2 | C18 : 3 |
|---|---------|
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 12,26 |
| Mutantes sencillos | |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 9,58 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 11,84 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 9,00 |
| TIPO W/TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 11,98 |
| Mutantes dobles | |
| LOLI105/LOLI108/TIPO W/TIPO W/TIPO W | 8,07 |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 5,73 |
| LOLI105/TIPO W/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 7,68 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 8,23 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 10,62 |
| Mutantes triples | |
| LOLI105/LOLI108/TIPO W/LOLI103/TIPO W | 4,49 |
| LOLI105/LOLI108/TIPO W/TIPO W/LOLI115 | 7,08 |
| TIPO W/LOLI108/TIPO W/LOLI103/LOLI115 | 8,12 |
| Mutante cuádruple | |
| LOLI105/LOLI108/TIPO W/LOLI103/LOLI115 | 3,54 |
| LSD | 0,62 |

Las Tablas 8 y 9 demuestran que, también en el campo, el aceite de semillas de plantas que comprenden los alelos mutantes *FAD3-A1* o *FAD3-C1* en estado homocigótico, el contenido de C18:3 del aceite de semillas se redujo en comparación con las plantas de tipo salvaje. Las plantas que comprenden alelos mutantes *LOLI108*, *LOLI111* o *LOLI115* en estado homocigótico muestran solamente una pequeña reducción en C18:3 en el aceite de semillas cuando se compara con aceite de semillas de plantas de tipo salvaje. Sin embargo, similar a en el invernadero, los alelos *LOLI108*, *LOLI111* y *LOLI115* tienen un efecto adicional sobre la reducción de C18:3 en el aceite de semillas por los alelos mutantes *FAD3-A1* y/o *FAD3-C1*. Además, se observa de forma consistente que, para los mutantes dobles y triples, líneas que comprenden tanto el mutante *FAD3A1* como el *FAD3C1* contienen un contenido de C18:3 del aceite de semillas significativamente menor que otras líneas que contienen el mismo número de alelos *FAD3* mutantes. Para los mutantes triples y cuádruples, se puede observar también, en particular cuando están presentes los alelos mutantes tanto de *FAD3A1* como de *FAD3C1*, que cuantos más alelos *FAD3* mutantes se apilen en el genoma, mayor será la reducción en el contenido de C18:3.

Se establecen ensayos adicionales para analizar la correlación entre la presencia de genes *FAD3* mutantes en plantas de *Brassica* y el contenido de C18:3 de aceite de semillas de plantas de *Brassica* en el campo tras retrocruzamiento adicional con líneas de élite de *Brassica*.

Ejemplo 10 - Detección y/o transferencia de alelos *FAD3* mutantes líneas (de élite) de *Brassica*

Los genes *FAD3* mutantes son transferidos a líneas de cultivo (de élite) de *Brassica* mediante el siguiente método: una planta que contiene un gen *FAD3* mutante (planta donante) se cruza con una línea de cultivo (de élite) (parental de élite/parental recurrente) o la variedad que carece del gen *FAD3* mutante. Se utiliza el esquema de introgresión siguiente (el alelo *FAD3* mutante se abrevia como *fad3*, mientras que el tipo salvaje se representa como *FAD3*):

Cruce inicial: *fad3 / fad3* (planta donante) X *FAD3 / FAD3* (parental de élite)

Planta F1: *FAD3 / fad3*

Cruce BC1: *FAD3 / fad3* X *FAD3 / FAD3* (parental recurrente)

Plantas BC1: 50% de *FAD3 / fad3* y 50% de *FAD3 / FAD3*

El 50% de *FAD3 / fad3* se seleccionan utilizando marcadores moleculares (p. ej., AFLP, PCR, Invader™, TaqMan® y similares; véase también más adelante) para el alelo *FAD3* mutante (*fad3*).

Cruce BC2: *FAD3 / fad3* (planta BC1) X *FAD3 / FAD3* (parental recurrente)

Plantas BC2: 50% de *FAD3 / fad3* y 50% de *FAD3 / FAD3*

El 50% *FAD3 / fad3* se seleccionan utilizando marcadores moleculares para el alelo *FAD3* (*fad3*) mutante.

El retrocruzamiento se repite hasta BC3 a BC6

Plantas BC3-6: 50% de *FAD3 / fad3* y 50% de *FAD3 / FAD3*

El 50% de *FAD3 / fad3* se seleccionan utilizando marcadores moleculares para el alelo *FAD3* (*fad3*) mutante. Para reducir el número de retrocruzamientos (p. ej., hasta BC3 en lugar de BC6), se pueden utilizar marcadores moleculares específicos para el fondo genético del parental de élite.

Cruce BC3-6 S1: *FAD3 / fad3* X *FAD3 / fad3*

Plantas BC3-6 S1: 25% de *FAD3 / FAD3* y 50% de *FAD3 / fad3* y 25% de *fad3 / fad3*

Se seleccionan plantas que contienen *fad3* utilizando marcadores moleculares para el alelo *FAD3* (*fad3*) mutante.

Plantas BC3-6 S1 o BC3-6 S2 individuales que son homocigóticas para el alelo *FAD3* mutante (*fad3 / fad3*) se seleccionan utilizando marcadores moleculares para los alelos *FAD3* mutantes y de tipo salvaje. Estas plantas se utilizan entonces para la producción de semillas.

Para seleccionar plantas que comprendan una mutación puntual en un alelo *FAD3*, se puede utilizar una secuenciación directa por técnicas de secuenciación estándares conocidos en la técnica, tales como las descritas en el Ejemplo 4.

Alternativamente, se puede utilizar la tecnología Invader™ (Third Wave Agbio) para discriminar plantas que comprenden una mutación puntual específica en un alelo *FAD3* de plantas que no comprenden esa mutación puntual específica. La discriminación de sondas mediante Invader™ fue por lo tanto desarrollada para detectar la presencia o ausencia y el estado de zigosis de alelos mutantes identificados en el Ejemplo 4, en particular *LOLI103*, *LOLI105*, *LOLI108*, *LOLI111* y *LOLI115*, basado en la diferencia de un solo nucleótido entre el alelo mutante y el de tipo salvaje. Brevemente, se desarrollaron sondas específicas para el gen *FAD3* diana mutante o de tipo salvaje correspondiente (indicado en lo sucesivo como "5' flap1-x1" y "5' flap2-x2", respectivamente, en donde x1 y x2 representan secuencias específicas para el alelo de tipo salvaje y mutante) y sondas "invasoras" que se pueden utilizar en combinación con ellos. Generalmente, cada una de las sondas consiste en una sonda específica para el mutante o el gen diana de tipo salvaje del cual el primer nucleótido después de la secuencia 5' flap coincide con la diferencia de nucleótido (la denominada "sonda primaria") y una sonda específica para los nucleótidos aguas arriba de la diferencia de nucleótidos (el denominado "oligo invader®"). El último nucleótido de este último cebador puede coincidir con la diferencia de nucleótidos en el mutante, pero también se pueden utilizar otros nucleótidos para este último nucleótido, siempre y cuando la sonda primaria y el oligo Invader® sean todavía capaces de formar

5 un solapamiento de una sola base cuando se hibrida con el ADN diana para generar la estructura invasiva específica reconocida por las enzimas Cleavase® (Third Wave Agbio). El proceso de ensayo Invader™ y la interpretación de los datos se realizan según las indicaciones del fabricante (Third Wave Agbio). Brevemente, las secuencias de nucleótidos indicadas como "flap 1" y "flap2" representan las secuencias de las 5' "flaps", que se escinden de las sondas primarias en la fase primaria del ensayo Invader™ y que son complementarias a secuencias en las casetes FRET™ 1 y 2, respectivamente, y que no son complementarias a las secuencias mutante diana o de tipo salvaje. Si las sondas primarias se escinden en la fase primaria y el la sonda flap1 y/o la sonda flap2 se hibridan a las casetes FRET™ 1 y 2, respectivamente, en la fase secundaria, se genera una señal indicativa de la presencia en la muestra del gen *FAD3* diana mutante o de tipo salvaje correspondiente, respectivamente. Los siguientes ensayos Invader™ 10 discriminatorios fueron por lo tanto desarrollados para detectar la presencia o ausencia y el estado de la zigosis de los alelos mutantes identificados en el Ejemplo 4 (véase la Tabla 2):

Tabla 10: Sondas Invader, cebadores directos (Fw) e inversos (Rv). La posición de la mutación está subrayada, sonda FAM: alelo mutante, sonda VIC: alelo de tipo salvaje.

15

| alelo | sonda | | cebador | |
|----------|-----------|---|---------|--|
| | colorante | secuencia (5'-3') | Fw/Rv | secuencia (5'-3') |
| LOLI 105 | FAM | TCTTTGTAATGTG <u>ATT</u> GGA SEQ ID NO: 18 | Fw | CAGTCACAGTTCTCAAAGTCTATGGAG SEQ ID NO: 20 |
| | VIC | CTTTGTAATGTG <u>GTT</u> GGAC SEQ ID NO: 19 | Rv | TGCCTCTGTACCAAGGCAACTTAT SEQ ID NO: 21 |
| LOLI 103 | FAM | GGATGACTACAGTG <u>A</u> TACA SEQ ID NO: 22 | Fw | CCTCTCTATCTGGTAAATCCTAATTCCTAA SEQ ID NO: 24 |
| | VIC | GATGACTACAGTG <u>G</u> TACAGA SEQ ID NO: 23 | Rv | GTATGGGTTATAATGTGACCCTTCTTTAC SEQ ID NO: 25 |
| LOLI 108 | FAM | ATCTTTGTAATGT <u>A</u> GTTGGA SEQ ID NO: 26 | Fw | GGTGTTCCCTTACATTGTAAGTTTCACA SEQ ID NO: 28 |
| | VIC | ATCTTTGTAATGTG <u>G</u> TGTTGGA SEQ ID NO: 27 | Rv | GCCTCTGTACCAAGGCAACTTCT SEQ ID NO: 29 |
| LOLI 111 | FAM | TTACTGCAGTG <u>A</u> TACAGAA SEQ ID NO: 30 | Fw | CGCTTACCCGATCTATCTGGTATTT SEQ ID NO: 32 |
| | VIC | TTACTGCAGTG <u>G</u> TACAGA SEQ ID NO: 31 | Rv | GGGTAAAATGTGACCCTTCTTTTC SEQ ID NO: 33 |
| LOLI 115 | FAM | GACCTTAACTACAGT <u>A</u> GTAC SEQ ID NO: 34 | Fw | ATGCTCGCTTACCCGATCTATTT SEQ ID NO: 36 |
| | VIC | ACCTTAACTACAGT <u>G</u> TACA SEQ ID NO: 35 | Rv | CTCTCGCTTGGAGCAAATAAACTA SEQ ID NO: 37 |

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Bioscience N.v.
 Laga, Benjamin
 Denolf, Peter
 5
 <120> Plantas de Brassica que comprenden alelos FAD3 mutantes
 <130> BCS09-2011
 10 <150> EP09075513.3
 <151> 23-11-2009
 <150> US 61/263,042
 <151> 20-11-2009
 15 <160> 37
 <170> PatentIn version 3.3
 20 <210> 1
 <211> 2985
 <212> ADN
 <213> Brassica napus
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(281)
 <220>
 30 <221> CDS
 <222> (838)..(927)
 <220>
 <221> CDS
 35 <222> (1463)..(1529)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1931)..(2023)
 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (2128)..(2313)
 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (2391)..(2471)
 <220>
 50 <221> CDS
 <222> (2559)..(2696)
 <220>
 <221> CDS
 55 <222> (2791)..(2985)
 <400> 1

ES 2 575 539 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | ggt | gtc | gct | atg | gac | cag | cgt | agc | aat | gcg | aac | gga | gac | gaa | agg | 48 |
| Met | Val | Val | Ala | Met | Asp | Gln | Arg | Ser | Asn | Ala | Asn | Gly | Asp | Glu | Arg | |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ttt | gat | ccg | agc | gca | caa | cca | ccg | ttc | aag | atc | gga | gat | ata | agg | gcg | 96 |
| Phe | Asp | Pro | Ser | Ala | Gln | Pro | Pro | Phe | Lys | Ile | Gly | Asp | Ile | Arg | Ala | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gcc | att | cct | aag | cat | tgt | tgg | gta | aag | agt | cct | ttg | aga | tcc | atg | agc | 144 |

ES 2 575 539 T3

| | |
|---|------|
| Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser Pro Leu Arg Ser Met Ser | |
| 35 40 45 | |
| tat gtc gcc aga gac att ttc gcc gtc gtg gct ctt gcc gtc gcc gcc | 192 |
| Tyr Val Ala Arg Asp Ile Phe Ala Val Val Ala Leu Ala Val Ala Ala | |
| 50 55 60 | |
| gtg tat ttt gat agc tgg ttc ttt tgg cct ctt tat tgg gcc gcc caa | 240 |
| Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Phe Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Ala Gln | |
| 65 70 75 80 | |
| gga acc ctg ttc tgg gct atc ttc gta ctc ggc cac gac tg | 281 |
| Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu Gly His Asp Cys | |
| 85 90 | |
| gtaatttaaat ttttctttca acttcttaat tttgatatgt ttatatgttt ttttcgtttt | 341 |
| ttgcattgtc tttgatttct tgaccgtacg ttcgatatga gattttcact gacttcaaga | 401 |
| tttgattctc ttcaggttta cttttttcaa ttttaattat tatgttcacc caatttgcc | 461 |
| tattttaaaa gcaaaagggg atctaagatt ttttaattctt ttgttttttt ttgttctttt | 521 |
| tcattagtcg taacactcct aactaaacat ctttttcttt cctataatta ctgttgtttc | 581 |
| cgcattttat ggatctacgt ttgaaatttt caataaacac acattttatt gttttctgta | 641 |
| acaatttaaat tactgtatat tggttctttt aattattgtg tgttgttcca atctattttc | 701 |
| gaaatatagt catgtgacac gtcataattct atttttgtta ccttgttgaa acgtttgaat | 761 |
| tgagtaaagt tcagttaaca ttgtgcaata aatgataaat gtgtttatga tgtaaaattt | 821 |
| aatttgaata atacag t gga cat ggg agc ttc tca gac att cct ctt ctg | 871 |
| Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro Leu Leu | |
| 95 100 105 | |
| aat act gcg gtt ggt cat att ctt cat tcc ttc att ctc gtt cca tac | 919 |
| Asn Thr Ala Val Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu Val Pro Tyr | |
| 110 115 120 | |
| cat ggt tg gtaagtcatt tattttaact tcttttttca tgcaaattta | 967 |
| His Gly Trp | |
| ttcttgtttt cgtatttctt acattttcct tgtcattctt ggtgcatggt agcaaacagt | 1027 |
| aatctgataa ctgaaaatat attaattttt catagtaaaa taatgcatgt gactaaaagt | 1087 |
| ctaaaagcat caaaatcttt agcatccatg aaaaaagaac aaaactttta tttaatgcta | 1147 |
| tgggcctatt tatggtccaa tttagctatta tcatatgaca tgtccttgaa taaattaatg | 1207 |
| tataagttta ataataattta tataatttttg ttttaatggc ttattttatt gttaaatgga | 1267 |
| tacatcagct tgaaatatct atgaacatgc atcattttcc taagatacat ttgtttgttg | 1327 |
| ctcaaaaaat aaataactag ttaaacgagt gagattctta gcatctgct cgaaaacgat | 1387 |
| atgttattga caattccaat ttcattttta tgaaaataaa ataatagttt attttataat | 1447 |
| tggggttggt tgcag g aga ata agc cat cgg aca cac cac cag aac cat | 1496 |
| Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His | |
| 125 130 135 | |
| ggc cat gtt gaa aac gac gag tct tgg gtt ccg gtaatctttc cctctctcat | 1549 |
| Gly His Val Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val Pro | |
| 140 145 | |

His Leu Val Asp Ala
 310

attaaagggt gattaattac taaattagtg atcttaatta atgatatgcg acag acg 2793
 Thr

aaa gca gct aaa cat gtg ttg gga aga tac tac aga gaa cca aag acg 2841
 Lys Ala Ala Lys His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr
 315 320 325

tca gga gca ata ccg atc cac ttg gtg gaa agt ttg gtg gca agt att 2889
 Ser Gly Ala Ile Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile
 330 335 340 345

aag aaa gat cat tac gtc agt gac act ggt gat att gtc ttc tac gag 2937
 Lys Lys Asp His Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu
 350 355 360

aca gat cca gat ctc tac gtt tat gct tct gac aaa tcc aaa atc aac 2985
 Thr Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ser Lys Ile Asn
 365 370 375

<210> 2
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Brassica napus

5

<400> 2

Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Ser Asn Ala Asn Gly Asp Glu Arg
 1 5 10 15

Phe Asp Pro Ser Ala Gln Pro Pro Phe Lys Ile Gly Asp Ile Arg Ala
 20 25 30

Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser Pro Leu Arg Ser Met Ser
 35 40 45

Tyr Val Ala Arg Asp Ile Phe Ala Val Val Ala Leu Ala Val Ala Ala
 50 55 60

Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Phe Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Ala Gln
 65 70 75 80

Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu Gly His Asp Cys Gly His
 85 90 95

Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro Leu Leu Asn Thr Ala Val Gly His Ile
 100 105 110

Leu His Ser Phe Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp Arg Ile Ser His
 115 120 125

Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val Glu Asn Asp Glu Ser Trp
 130 135 140

Val Pro Leu Pro Glu Lys Leu Tyr Lys Asn Leu Ser His Ser Thr Arg

10

<222> (1)..(290)
<220>
<221> CDS
5 <222> (882)..(971)

<220>
<221> CDS
<222> (2032)..(2098)
10

<220>
<221> CDS
<222> (2499)..(2591)

15 <220>
<221> CDS
<222> (2700)..(2885)

<220>
20 <221> CDS
<222> (2964)..(3044)

<220>
<221> CDS
25 <222> (3130)..(3267)

<220>
<221> CDS
<222> (3361)..(3555)
30
<400> 3

ES 2 575 539 T3

| | |
|---|-----|
| atg gtt gtc gct atg gac cag cgt agc aat gtg aac gga gat tcc aag | 48 |
| Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Ser Asn Val Asn Gly Asp Ser Lys | |
| 1 5 10 15 | |
| gac gaa agg ttt gat ccg agc gca caa cca ccg ttt aag atc gga gat | 96 |
| Asp Glu Arg Phe Asp Pro Ser Ala Gln Pro Pro Phe Lys Ile Gly Asp | |
| 20 25 30 | |
| ata agg gct gcg att cct aag cat tgt tgg gtc aag agt cct ttg aga | 144 |
| Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser Pro Leu Arg | |
| 35 40 45 | |
| tcc atg agc tac gtc gcg aga gac att ttc tcc gtc gtg gct ctg gcc | 192 |
| Ser Met Ser Tyr Val Ala Arg Asp Ile Phe Ser Val Val Ala Leu Ala | |
| 50 55 60 | |
| gtc gcc gcc gtg tat ttt gat agc tgg ttc ttc tgg cct ctt tat tgg | 240 |
| Val Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Phe Trp Pro Leu Tyr Trp | |
| 65 70 75 80 | |
| gcc gcc caa gga acc ctt ttc tgg gcc atc ttc gta ctc ggc cac gac | 288 |
| Ala Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu Gly His Asp | |
| 85 90 95 | |
| tg gtaatttaaat tttcaattta ttttttcttc aacttcttaa ttttgatag | 340 |
| Cys | |
| tttatatggtt tttttcgttt tttgcatcgt ctttgatttc ttgaacgcac gttcgatag | 400 |
| agattttcac tgacttcaag atttgattct cttcaggttt acttttaaaa aaaaaatta | 460 |
| ttatgttcac ccaaattggc ctattttaaa agcaaaaagg gatctaagat ttttaattct | 520 |
| tctctttttc agtcgtaaca ctgctaactt ttttttttga tcaaatcgta acactcataa | 580 |
| gtcctaacta aacatctttt tctttcctat aattattggt ggttccgcac tttatggatc | 640 |

ES 2 575 539 T3

tacgtttgaa agtttcaata aaacacattt tattgtttga aagtaacaat ataattactg 700
tataattgatt cttttaatta ttgtgtgttg ttccaatcta ctttcgaaat atagtcatgt 760
gacacgtcat attctatfff tgttaccttg ttggaacggt tgaattgagt aaagtttaat 820
taacattgtg caataaatga taaacatggt tatgatgtaa aattcaattt gaataataca 880
g t gga cat ggg agc ttc tca gac att cct ctt ctg aat act gcg gtt 927
Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro Leu Leu Asn Thr Ala Val
100 105 110
ggt cat att ctt cat tcc ttc att ctc gtt cca tac cat ggt tg 971
Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp
115 120 125
gtaagtcatt tatttaaaca tctttttcat gcaaatttat tcttgttttc gtatttctta 1031
cattttcctt gtcattcttg gtgcatgta gcaaactgta atctgataac tgaaaatata 1091
ttaattttcc atagtaaaat aatgcatgtg actaaaagca tcaaaatctt tagcatcgaa 1151
gaaaaagaa ccaaactttt atttaatgct atgggcctat ttatgggtcca attagctatt 1211
atcatatgac atgtccttga ataaattaat gtagcttcat atgtgagttt aataatattt 1271
atatattttt gttttaatgg cttattttat tgttaaatgg atacatcagc ttgaaatgct 1331
tacgaacatg catcattttc ctagatacac ttgtttgttg ctcaaaaatg aataacttag 1391
ttaaacgagt gagcatgttc tatgggggtt cttagagcat gattattgag aagttcctag 1451
agtgagggtt ttaccggaat ataagaatct atctcttaac tttaactaa aaaaattaag 1511
aaccggcttt taaaactcgt atttaagaac cgtttttttag ttttttagtt aaaaatcaag 1571
agacgagttc ttatattccg ctaagaactc caccctgaga acttctcaat aatcatgctc 1631
ttagtgtctt aagaagggtc cttaacaaaa tattaataat aagatatagt gtgggcccac 1691
aaaaaaacaa aaaaccgggt acaaaagtcg cgaaagaagg atcgattttg gtcttttact 1751
tgtactgttt gtggatccca ctggtggtgg tccgcgattg gtttctttt taatttaatt 1811
tattttttta atcgagaaaa aaaattaaga aacccaaaaac agttttaatc atggcctcat 1871
gttgggggtg agttttatat tctgataaga atcccatctt aaaaaccccg ttaaactgac 1931
tcttaccatc tgcttcgaaa atgatatggt attgacaatt ccaatttcat ttttatgaaa 1991
ataaaataat agtttatttt ataactgagg gtggttgacag g aga ata agc cat cgg 2047
Arg Ile Ser His Arg
130
aca cac cac cag aac cat ggc cat gtt gaa aac gac gag tct tgg gtt 2095
Thr His His Gln Asn His Gly His Val Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val
135 140 145
ccg gtaatctttc cctctctcat atttttttc ttttttttga aattctttca 2148
Pro
ttttaatttt cttaggattc tatgtattta ttttaatcaa tcctttttcc agtttgaggc 2208
taggacgacc acttgtcaga tttgtcgttt agctgtagta aacaactgat ttaaattggt 2268
tatagtactg tagttaactt taacaacgga ccacttatat tcgagccatt ggcataaaat 2328

ES 2 575 539 T3

gattcttctc gaaattcggt tacttttctt agtatttttc aattttggag tttacgtaga 2388
 actaataaaa agaaaaactt ataaacacac cacatgcaat gaataaattc gaatatataa 2448
 ccatactggt aaatattaat ttacatttta atcttaattt tgcattccag ttg cca 2504
 Leu Pro
 150
 gaa aaa tta tac aag aat ttg tcc cac agt aca cgg atg ctc aga tac 2552
 Glu Lys Leu Tyr Lys Asn Leu Ser His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr
 155 160 165
 act gtc cct ctc ccc atg ctc gct tac cct ctc tat ctg gtaaactcta 2601
 Thr Val Pro Leu Pro Met Leu Ala Tyr Pro Leu Tyr Leu
 170 175 180
 attcctaatt tttcttctcg attataatta caattttgaa ttttttagatt ttgagtatta 2661
 actaaatata aattaaattt gtttggggat gactacag tgg tac aga agt cct ggt 2717
 Trp Tyr Arg Ser Pro Gly
 185
 aaa gaa ggg tca cat tat aac cca tac agt agt tta ttt gcc cca agc 2765
 Lys Glu Gly Ser His Tyr Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Pro Ser
 190 195 200
 gag aga aag ctt att gca act tca act act tgc tgg tcg atc gtg ttg 2813
 Glu Arg Lys Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Val Leu
 205 210 215
 gcc act ctt gtt tat cta tca ttc ctc gtt ggt cca gtc aca gtt cta 2861
 Ala Thr Leu Val Tyr Leu Ser Phe Leu Val Gly Pro Val Thr Val Leu
 220 225 230
 aaa gtc tat ggt gtt cct tac att gtaagtttca tatatttctt tattatatca 2915
 Lys Val Tyr Gly Val Pro Tyr Ile
 235 240
 ttgctaatat aatttgtttt tgacataaaa gttttgaaa aatttcag atc ttt gta 2972
 Ile Phe Val
 245
 atg tgg ttg gac gct gtc acg tac ttg cat cat cat ggt cac gat gat 3020
 Met Trp Leu Asp Ala Val Thr Tyr Leu His His His Gly His Asp Asp
 250 255 260
 aag ctg cct tgg tac aga ggc aag gtaagtagat caacattatt tataagaagc 3074
 Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
 265
 aataatgatt agtagttgaa taatctgaat ttttgatggt tttgtacaat aatag gaa 3132
 Glu
 270
 tgg agt tat tta cgt gga gga tta aca act gtt gat aga gat tac ggg 3180
 Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly
 275 280 285
 atc ttc aac aac att cat cac gat att gga act cac gtg atc cat cat 3228
 Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His His
 290 295 300
 ctt ttc cca caa atc cct cac tat cac ttg gtc gat gcc gtgagtgatc 3277
 Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp Ala
 305 310 315
 tcgctctctc tctagtttca tttgattata ttaaagggtg attaattact aaattagtga 3337

ES 2 575 539 T3

tcttaattaa tgacatgcga cag acg aaa gca gct aaa cat gtg ttg gga aga 3390
 Thr Lys Ala Ala Lys His Val Leu Gly Arg 325

tac tac aga gaa cca aag acg tca gga gca ata ccg atc cac tta gtg 3438
 Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser Gly Ala Ile Pro Ile His Leu Val 340

gaa agt ttg gtg gca agt att aag aaa gat cat tac gtc agt gac act 3486
 Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys Lys Asp His Tyr Val Ser Asp Thr 355

ggg gat att gtc ttc tac gag aca gat cca gat ctc tac gtt tat gct 3534
 Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr Ala 370

tct gac aaa tcc aaa atc aat 3555
 Ser Asp Lys Ser Lys Ile Asn 380

<210> 4
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Brassica napus

<400> 4

Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Ser Asn Val Asn Gly Asp Ser Lys
 1 5 10 15

Asp Glu Arg Phe Asp Pro Ser Ala Gln Pro Pro Phe Lys Ile Gly Asp
 20 25 30

Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser Pro Leu Arg
 35 40 45

Ser Met Ser Tyr Val Ala Arg Asp Ile Phe Ser Val Val Ala Leu Ala
 50 55 60

Val Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Phe Trp Pro Leu Tyr Trp
 65 70 75 80

Ala Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu Gly His Asp
 85 90 95

Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro Leu Leu Asn Thr Ala Val
 100 105 110

Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp Arg
 115 120 125

Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val Glu Asn Asp
 130 135 140

Glu Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Lys Leu Tyr Lys Asn Leu Ser His
 145 150 155 160

ES 2 575 539 T3

Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val Pro Leu Pro Met Leu Ala Tyr
 165 170 175

Pro Leu Tyr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Glu Gly Ser His Tyr
 180 185 190

Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Pro Ser Glu Arg Lys Leu Ile Ala
 195 200 205

Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Val Leu Ala Thr Leu Val Tyr Leu
 210 215 220

Ser Phe Leu Val Gly Pro Val Thr Val Leu Lys Val Tyr Gly Val Pro
 225 230 235 240

Tyr Ile Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Ala Val Thr Tyr Leu His His
 245 250 255

His Gly His Asp Asp Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys Glu Trp Ser
 260 265 270

Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Phe
 275 280 285

Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His His Leu Phe
 290 295 300

Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp Ala Thr Lys Ala Ala Lys
 305 310 315 320

His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser Gly Ala Ile
 325 330 335

Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys Lys Asp His
 340 345 350

Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr Asp Pro Asp
 355 360 365

Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ser Lys Ile Asn
 370 375 380

<210> 5
 <211> 4512
 5 <212> ADN
 <213> Brassica napus

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(299)

<220>
 <221> CDS

<222> (923)..(1012)
<220>
<221> CDS
5 <222> (1683)..(1749)

<220>
<221> CDS
10 <222> (3451)..(3543)

<220>
<221> CDS
<222> (3650)..(3835)

15 <220>
<221> CDS
<222> (3921)..(4001)

<220>
20 <221> CDS
<222> (4096)..(4233)

<220>
<221> CDS
25 <222> (4318)..(4512)

<400> 5

ES 2 575 539 T3

| | |
|---|-----|
| atg gtt gtt gct atg gac cag cgc agc aat gtt aac gga gat tcc ggt Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Ser Asn Val Asn Gly Asp Ser Gly 1 5 10 15 | 48 |
| gcc cgg aag gaa gaa ggg ttt gat cca agc gaa caa cca ccg ttt aag Ala Arg Lys Glu Glu Gly Phe Asp Pro Ser Glu Gln Pro Pro Phe Lys 20 25 30 | 96 |
| atc gga gat atc agg gcg gcg att cct aag cat tgt tgg gtg aag agt Ile Gly Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser 35 40 45 | 144 |
| cct ttg aga tct atg agc tac gtc gcc aga gac att ttc gcc gtc gcg Pro Leu Arg Ser Met Ser Tyr Val Ala Arg Asp Ile Phe Ala Val Ala 50 55 60 | 192 |
| gct ctg gcc atg gcc gcc gtg tat ttt gat agc tgg ttc ctc tgg cca Ala Leu Ala Met Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Leu Trp Pro 65 70 75 80 | 240 |
| ctc tac tgg gtt gcc caa gga acc ctt ttc tgg gcc atc ttc gtt ctt Leu Tyr Trp Val Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu 85 90 95 | 288 |
| ggc cac gac tg gtaaattaa ttttctgttt taattatatt gactcttttt Gly His Asp Cys | 339 |
| gttcaattta ttaatttctt gaatgcacgt tcgatgagta tcgtcgtcac tgacttcaag | 399 |
| atttaattct tttgaggtta ccttttcatg ttcaattatt aaaaaataa aataaaatat | 459 |
| aggatctaag atttttttct tcatcagttc aagcatcatc actcatcagt cgtaagactc | 519 |
| gtaacaaaat atcttctttt ctataattaa tattatttcc gcatttaatg gatctacggt | 579 |
| ttgatgttct caaattttgt ttctctttct ctagatcccc ggaactttta attataatta | 639 |
| tagtatagta taatatcaag aaaatatact gtttattttt tttggcaaca aatatattac | 699 |
| tcttgtttct ttgacaagaa aaaatatatt gtttttttct tctttttgtg ttccaatcta | 759 |

ES 2 575 539 T3

| | |
|--|-----------------|
| ttttcgagat ttagacaagt gacacgtcat ataccggatt tgttaccttg ttaaagagtt | 819 |
| tgggttaaaa caaatgtaga aaagttaaaa taaattgtgc aataaatgat aaatacgttt | 879 |
| ttatgttaaa caatgatgtg aaaataaaat tgaataatgg cag t gga cat ggg agt | 935 |
| | Gly His Gly Ser |
| ttt tca gac att cct ctg ctg aac agt gtg gtt ggt cac att ctt cat | 983 |
| Phe Ser Asp Ile Pro Leu Leu Asn Ser Val Val Gly His Ile Leu His | |
| 105 110 115 120 | |
| tca ttc atc ctc gtt cct tac cat ggt tg gtaagtcatt tattaactat | 1032 |
| Ser Phe Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp | |
| | 125 |
| ttccatgtaa actattagta cttgttttcg tatttcttac attttcgttt gtcattcttc | 1092 |
| ttgggtgcat gctagcaaac tgtaatcagt attaactggg aactaccaac tgtttttttt | 1152 |
| tgctagagta gcaattttat aattaaataa gaatcctatt aaacaatgca tgtgacaata | 1212 |
| tgaggttgct tttctgttca aaacaaatct ttagaagcca atgaaaaaga atccaaaact | 1272 |
| ttttttaaat gatatgcgcc tatctattgg tcctgactcc tgagttttct tactttctta | 1332 |
| agtataatta gattttgatt tttttatag gttttcacta ttgttatttg tttacatcag | 1392 |
| cttcagatat cttcgaaaaa gatttacatg catcaatttc atgaggattt atagtttttc | 1452 |
| ttttacttat ttccgacaca atgttttagta gtaaaaagca ttaaatgttt ttttgctcaa | 1512 |
| aaaaaaagaa tgggattggt agagcactct attgttagtt gttcaataaa tataccaact | 1572 |
| aaaaaaacaa aataaatata aatgagtga gattgttaaa tcattataga gacaatttca | 1632 |
| ttttcacaaa aataaataaa tacataactt tttataattg gggtttgcag g aga ata | 1689 |
| | Arg Ile |
| agc cat cgg aca cac cac cag aac cat ggc cat gtt gaa aac gac gag | 1737 |
| Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val Glu Asn Asp Glu | |
| | 135 140 145 |
| tct tgg gtt ccg gtaatctttc ctactctcgt agtttctctt gtcttttatt | 1789 |
| Ser Trp Val Pro | |
| | 150 |
| tatttgtttg tttttcggaa tttattctta tgtctatggt cttaggattc tatatgttta | 1849 |
| ttttattagt ttatgttttc agtctgaggt cagaccgacc acttgtcaga tctgttttct | 1909 |
| agctgtagta aaaaacaatt tgcaagtgta atagttcagc ataattgatc ttgttagagc | 1969 |
| atttccaaaa caaactttat aattttaaat atacagtttt ttgttctcta aaaaagaatt | 2029 |
| taaaaatttt aaagtttgag ggacgaaact tcaaatttga actttcacta ctcaacttca | 2089 |
| aatttgaaat ttcatctttt ttatttacat tttgatcatt ataattaatt atacattaca | 2149 |
| tttatgattc ttaagtattt tctcatttat tgttttaatt cttaaatttt ttatacatca | 2209 |
| taaatatttc caatttgttt ttataaattc aaattttaca caaaaaagta ataaaaattt | 2269 |
| taaataagat ttataatatt ttaaaactat aattaggcaa aaaaaatatt acaaaaaaat | 2329 |
| gtaataaaaa ctttaaataa agatatatca agacataatt attagaaatt ttaaatatta | 2389 |

ES 2 575 539 T3

| | |
|--|--|
| taacaatatt aataatctgg taaatttgct ccaaacctc aaaaatttct aaattattgt | 2449 |
| ccaaacaaat ttgtttaacc gaatatggag cattacaaaa ataattttat ggaatagtgt | 2509 |
| ggtattttgc ttgtagttaa tatttaatta tgtattttcta tttataattt tatatattta | 2569 |
| atgtaagatt tttttaatta atattactgt aatattttta tatatgtact agttattttat | 2629 |
| aaaagtttta tagatttgta ttagttataa caaaaataag gatcattgtg taaaatacaa | 2689 |
| ataattttga aattacgttt aaagttttgg ttatgaaaaa aatactttga aactttaaat | 2749 |
| ttagagtttt gcaaacttta aaatgttaga tagatagttt ttttgagat gcatttagtg | 2809 |
| gttatggtag taactcagaa aatgaaaaat ctatactttt atactccctc cgttttttaa | 2869 |
| tataagtcgt tttacagtta tacacgtaga ttaagaaaac cattaatttc ttatattttc | 2929 |
| tagacaaaaa catcattaat tatttaccta accacaattc aaccaatata aaaatagaag | 2989 |
| atatattacc attggtcata caacattaat tattaataaa ttttcatag aaaaccgaaa | 3049 |
| acgacatata atttgaaca aaaaaatttc tctaaaacga cttatattaa aaaacggagg | 3109 |
| gagtagtacc taactttaac gatggaccac ttatattcga gtccttagca taaaatgatt | 3169 |
| ctcctcgaaa tccgtttact ttcttcatta ttttttcctt ttcagttttg gcgttttcgt | 3229 |
| aatacttttg tcttcaatct tgaagctat tagtataaaa acttataaac acatcacatg | 3289 |
| caatgaatta atacgaatac ataaccagaa tgacaaattt tcaatgaata tttaatacca | 3349 |
| gtaagtacta ctccgtaata gtaatagtaa tagtcatatt aatttttttt tgatcatcaa | 3409 |
| caaacagtaa tagtaatatt aattataatt atgtatttca g ttg cca gaa aag ttg | 3465 |
| | Leu Pro Glu Lys Leu 155 |
| tac aag aac ttg ccc cat agt act cgg atg ctc aga tac act gtt cct | 3513 |
| Tyr Lys Asn Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val Pro | 160 165 170 |
| ctg ccc atg ctc gct tac ccg atc tat ctg gtaaaaaaaaa atacaatttc | 3563 |
| Leu Pro Met Leu Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu | 175 180 |
| aatttttttc ttaaaattac aaatggtttt atattttgag ttttaagcca atatataaat | 3623 |
| taattttgat tggattttta ctacag tgg tac aga agt cct gga aaa gaa ggg | 3676 |
| | Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Glu Gly 185 190 |
| tca cat ttt aac cca tac agt agt tta ttt gct cca agc gag agg aag | 3724 |
| Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Pro Ser Glu Arg Lys | 195 200 205 |
| ctt att gca act tca aca act tgc tgg tcc ata atg ttg gcc act ctt | 3772 |
| Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Met Leu Ala Thr Leu | 210 215 220 |
| ggt tat cta tcg ttc ctc gtt ggt cca gtc aca gtt ctc aaa gtc tat | 3820 |
| Val Tyr Leu Ser Phe Leu Val Gly Pro Val Thr Val Leu Lys Val Tyr | 225 230 235 240 |
| ggt gtt cct tac att gtaagtttca catattatta caagagattt atatattatt | 3875 |
| Gly Val Pro Tyr Ile | 245 |

ES 2 575 539 T3

aataataaat ttgttttttg acataaagtt ttggaaaatt ttcag atc ttt gta atg 3932
 Ile Phe Val Met

tgg ttg gac gct gtc acg tac ttg cat cat cat ggt cac gat gag aag 3980
 Trp Leu Asp Ala Val Thr Tyr Leu His His His Gly His Asp Glu Lys
 250 255 260 265

ttg cct tgg tac aga ggc aag gtaaataaat caatttttaa aaagaaatgt 4031
 Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
 270

acagaaagca ataatgggta gtattgatta atcttaattt ttgatgtttt gcatacaata 4091

atag gaa tgg agt tat tta cgt gga gga tta aca act att gat aga gat 4140
 Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp
 275 280 285

tac gga atc ttc aac aac atc cat cac gac att gga act cac gtg atc 4188
 Tyr Gly Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile
 290 295 300

cat cat ctt ttc cca caa atc cct cac tat cac ttg gtc gat gcg 4233
 His His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp Ala
 305 310 315

gtgagtgatc tagctttctc tctctctagt ttcatttgat taaatgggta ttaattacta 4293

atttaattaa tgaattgtgg acag acg aga gca gct aaa cat gtg tta gga 4344
 Thr Arg Ala Ala Lys His Val Leu Gly
 320 325

aga tac tac aga gag ccg aag acg tca gga gca ata ccg att cac ttg 4392
 Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser Gly Ala Ile Pro Ile His Leu
 330 335 340

gtg gag agt ttg gtc gca agt att aaa aaa gat cat tac gtc agt gac 4440
 Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys Lys Asp His Tyr Val Ser Asp
 345 350 355

act ggt gat att gtc ttc tac gag aca gat cca gat ctc tac gtt tat 4488
 Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr
 360 365 370 375

gct tcg gac aaa tct aaa atc aat 4512
 Ala Ser Asp Lys Ser Lys Ile Asn
 380

<210> 6
 <211> 383
 5 <212> PRT
 <213> Brassica napus

<400> 6

Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Ser Asn Val Asn Gly Asp Ser Gly
 1 5 10 15

Ala Arg Lys Glu Glu Gly Phe Asp Pro Ser Glu Gln Pro Pro Phe Lys
 20 25 30

Ile Gly Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser
 35 40 45

10

ES 2 575 539 T3

Pro Leu Arg Ser Met Ser Tyr Val Ala Arg Asp Ile Phe Ala Val Ala
 50 55 60
 Ala Leu Ala Met Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Leu Trp Pro
 65 70 75 80
 Leu Tyr Trp Val Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu
 85 90 95
 Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro Leu Leu Asn
 100 105 110
 Ser Val Val Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu Val Pro Tyr His
 115 120 125
 Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val
 130 135 140
 Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Lys Leu Tyr Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val Pro Leu Pro Met
 165 170 175
 Leu Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Glu Gly
 180 185 190
 Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe Ala Pro Ser Glu Arg Lys
 195 200 205
 Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Met Leu Ala Thr Leu
 210 215 220
 Val Tyr Leu Ser Phe Leu Val Gly Pro Val Thr Val Leu Lys Val Tyr
 225 230 235 240
 Gly Val Pro Tyr Ile Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Ala Val Thr Tyr
 245 250 255
 Leu His His His Gly His Asp Glu Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
 260 265 270
 Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr
 275 280 285
 Gly Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His
 290 295 300
 His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp Ala Thr Arg
 305 310 315 320

ES 2 575 539 T3

Ala Ala Lys His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser
 325 330 335

Gly Ala Ile Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys
 340 345 350

Lys Asp His Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr
 355 360 365

Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ser Lys Ile Asn
 370 375 380

- <210> 7
- <211> 3729
- 5 <212> ADN
- <213> Brassica napus
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(299)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (782)..(871)
- 15 <220>
- <221> CDS
- <222> (1687)..(1753)
- 20 <220>
- <221> CDS
- <222> (2665)..(2757)
- 25 <220>
- <221> CDS
- <222> (2845)..(3030)
- 30 <220>
- <221> CDS
- <222> (3125)..(3205)
- 35 <220>
- <221> CDS
- <222> (3300)..(3437)
- 40 <220>
- <221> CDS
- <222> (3535)..(3729)
- <400> 7

| | | |
|--|---|-----|
| | atg gtt gtt gct atg gac caa cgc acc aat gtg aac gga gat gcc ggt | 48 |
| | Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Thr Asn Val Asn Gly Asp Ala Gly | |
| | 1 5 10 15 | |
| | gcc cgg aag gaa gaa ggg ttt gat ccg agc gca caa ccg ccg ttt aag | 96 |
| | Ala Arg Lys Glu Glu Gly Phe Asp Pro Ser Ala Gln Pro Pro Phe Lys | |
| | 20 25 30 | |
| | atc ggg gac ata agg gct gcg att cct aag cat tgt tgg gtg aaa agt | 144 |
| | Ile Gly Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser | |
| | 35 40 45 | |

ES 2 575 539 T3

cct ttg aga tct atg agc tac gta gcc aga gac att tgt gcc gtc gcg 192
 Pro Leu Arg Ser Met Ser Tyr Val Ala Arg Asp Ile Cys Ala Val Ala
 50 55 60

gct ttg gcc att gcc gcc gtg tat ttt gat agc tgg ttc ctc tgt cct 240
 Ala Leu Ala Ile Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Leu Cys Pro
 65 70 75 80

ctc tat tgg gtc gcc caa gga acc ctt ttc tgg gcc atc ttc gtc ctc 288
 Leu Tyr Trp Val Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu
 85 90 95

ggc cac gac tg gtaaagtttc ttccattttg cattgcatcg atttattgaa 339
 Gly His Asp Cys

tgcacgttct acgagtattg tttgtcagtt acttcgtaaa atgattcttt tgatgttcat 399

tttttgaaga tctaagattt tttttttaga ttttcttttt aatcattgt tccaccacca 459

cctttcatcg gtcgtacgac tcgttacaac accacatctt tattttctat aattactact 519

gcttccgcat tttatggatc tctcaactta taattaaagt ataatatcaa gaatatctat 579

tatttttctt aaacaagaaa gataatattg tttctttggt attttggtgt atttccaatc 639

tatttcgaga tttagaaatg tgacacgtca ttaccttgggt gaagtgttta aaacaaacat 699

ggaaagttta aataaatagt gcaataaatg atatatatgt atatgatgaa taatgatgtg 759

aaatataatt gaataatggc ag t gga cat ggg agt ttc tca gac att cct 809
 Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro
 105

ctg ctg aat agt gtg gtt ggc cat att ctt cat tcc ttc atc ctc gtt 857
 Leu Leu Asn Ser Val Val Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu Val
 110 115 120 125

cct tac cat ggt tg gtaagtcagc ttatcaacc tttttactat attattaatt 911
 Pro Tyr His Gly Trp

attaaacttg catttgtata cttgggtgcaa gttggtaaat gtaatctgat aactgaaaat 971

ctattcattg ctcgttctat ttttttttgg ctagagacaa ttttataatt aaataatgca 1031

tgtagagaata tgactattta tgtgaggtag cttttcttat tcctgtcgaa aagcatcaaa 1091

tcttttagcaa cgaaggaaaa aggaatcaaa ttttttatta aatgcaatgg gtctatgtct 1151

tggtcattag ttttttgcac ataatttatt tatatttttt tcttaacagc agctaattta 1211

attataatta aatattcatt ttataaataa tattagacca attattaag gttagatatt 1271

ttaagaatta ttcattgactt tgtttattgg aactcctttt atcttttaat cttttctatt 1331

tctccatttt taataatgag aaactgactt caaatctcca ataaagatgg tcttatgtag 1391

taacagtata attttttgggt tggtaaatgt aacatcatct tcaaataatct ttgaaaatag 1451

acttacatgc attattttgc tgcgacatta ttgtcactta ttcctggcaa taaattagtt 1511

tattactgaa ctttttttgg tcaatttatt actagtaact ttaaacttaa aagagtgaga 1571

ttgtttgatc aaaaaaata aaaatagagt gagatagtta gaatctgcca tgaaagcaac 1631

actatataga caatttaatt tttatgaaaa cacatttaat aatttgaggc tgcag g 1687

ES 2 575 539 T3

aga ata agc cat cgg aca cac cac cag aac cat ggc cat gtt gaa aac 1735
 Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val Glu Asn
 135 140 145

gac gag tct tgg gtt ccg gtaacatttc cctctttaat aatttctatt 1783
 Asp Glu Ser Trp Val Pro
 150

tttctgtcaa aataattagt ttttcgaaat ttgaggccag aacgaccact tgtcaaattt 1843

gatttttagc tgtagtaaaa acagtttgct agtgtcacag ttaaccggta attgattcct 1903

tttaacgatt tatagaagta acatttttgt aaaataaaat atacattatg gtatgtgaca 1963

acggaccacg cttatttgta ttggtgaatc ttttaattac tccctccaat ttattttagt 2023

tgcaagattta gatttatgca catagattaa taaaaatatt ttgcacattt tcaaaaataa 2083

aacaccatta cttatacaac taaccatatt tcaaccaata aaaataaatt agaaaaatatt 2143

atttataaat tttgtattga aattataaaa taatacttat tttaaaacga aattaattta 2203

caacgacaat taaactgaaa cggaaagaaa ttattaatac ttaattaaag agtttttaga 2263

aaaattgaaa gacatgttta tgcgaaactc atgtgaaagt ctttgaaata atagattttg 2323

gtataaatat ttcaaatttt cttaaaataa taattatata ttaatataat ttgtgataaa 2383

atctcgtcaa aaactcacta atgcaaatgc ttttattttg aatttcttac tcctctaaat 2443

gcatttactt ttatactaatt attattttct ttctctaatt tggcgtttcg taatagtttg 2503

tctgtatttt gaaaactaac aaaaaataat aaaaacaaa gcttataaac acatagcatg 2563

caatgaatat gtacgaatat atataccaat acatatctaa gtactatttt tccaagtact 2623

taatcttgat tactaaaatt cattttaatt gttcctttca g tta cca gaa agg tta 2679
 Leu Pro Glu Arg Leu
 155

tac aag aat tta ccc cac agt act cgg atg ctc aga tac act gtc cct 2727
 Tyr Lys Asn Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val Pro
 160 165 170

ctg ccc atg ctc gct tac ccg atc tat ctg gtatttttta attcctaaaa 2777
 Leu Pro Met Leu Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu
 175 180

tttactacaa gtcatttttag actgtgtttt aaaacaatat aattattttt gtttggtttt 2837

actgcag tgg tac aga agt cct gga aaa gaa ggg tca cat ttt aac cca 2886
 Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Glu Gly Ser His Phe Asn Pro
 185 190 195

tac agt ggt tta ttt gct cca agc gag aga aag ctt att gca act tcg 2934
 Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Pro Ser Glu Arg Lys Leu Ile Ala Thr Ser
 200 205 210

act act tgc tgg tcc ata atg ttg gca att ctt atc tgt ctt tcc ttc 2982
 Thr Thr Cys Trp Ser Ile Met Leu Ala Ile Leu Ile Cys Leu Ser Phe
 215 220 225

ctc gtt ggt cca gtc aca gtt ctc aaa gta tac ggt gtt cct tac att 3030
 Leu Val Gly Pro Val Thr Val Leu Lys Val Tyr Gly Val Pro Tyr Ile
 230 235 240 245

gtaagtttct tagtatatca taaagggtat atatttatta ttcaatatat atactatag 3090

ES 2 575 539 T3

atttgTTTT gTcAtAtatt tttgAAAtat tCag atC ttt gTg atg tGg ttg gAc 3145
 Ile Phe Val Met Trp Leu Asp
 250

gct gTc act tAc ttg cAt cAc cAt ggt cAt gat gAg aAg ttg cct tGg 3193
 Ala Val Thr Tyr Leu His His His Gly His Asp Glu Lys Leu Pro Trp
 255 260 265

tAc aGa gGc aAg gTaatTaat taactattac aAgTatttttA caaaaaactA 3245
 Tyr Arg Gly Lys
 270

atgattagta tatttgatta atcttaattc ttgatgTTTT gTgattaata atag gaa 3302
 Glu

tGg agt tAc tta cgt gGa gGa tta aCa act att gat aGa gat tAc gGa 3350
 Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly
 275 280 285

att tTc aAc aAc att cAt cAc gAc att gGa act cAc gTg atC cAt cAt 3398
 Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His His
 290 295 300 305

cTt tTc cCa caa atC cct cAc tat cAc ttg gTc gat gct gTgagTcAtc 3447
 Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp Ala
 310 315

tCactctctg gctacttttca tcaaaacCat ttgattaaag ggtgattaat tactaatgta 3507

gtgatttttaA caaatggaat gTgacag aCa aaa gCa gct aaa cAt gTg ttg gGa 3561
 Thr Lys Ala Ala Lys His Val Leu Gly
 320 325

aGa tAc tAc aGa gaa cCa aAg acg tCa gGa gCa ata cGg atC cAc ttg 3609
 Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser Gly Ala Ile Pro Ile His Leu
 330 335 340

gTg gAg agt ttg gTa gCa agt att aAg aaa gat cAt tAc gTc agt gAc 3657
 Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys Lys Asp His Tyr Val Ser Asp
 345 350 355

act ggt gAc att gTc tTc tAc gag act gat cCa gat cTc tAc gTt tat 3705
 Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr
 360 365 370 375

gct tct gTc aaa tCg aaa atC aat 3729
 Ala Ser Val Lys Ser Lys Ile Asn
 380

<210> 8
 <211> 383
 5 <212> PRT
 <213> Brassica napus

<400> 8

Met Val Val Ala Met Asp Gln Arg Thr Asn Val Asn Gly Asp Ala Gly
 1 5 10 15

Ala Arg Lys Glu Glu Gly Phe Asp Pro Ser Ala Gln Pro Pro Phe Lys
 20 25 30

Ile Gly Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser
 35 40 45

10

ES 2 575 539 T3

Pro Leu Arg Ser Met Ser Tyr Val Ala Arg Asp Ile Cys Ala Val Ala
 50 55 60
 Ala Leu Ala Ile Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Leu Cys Pro
 65 70 75 80
 Leu Tyr Trp Val Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu
 85 90 95
 Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Asp Ile Pro Leu Leu Asn
 100 105 110
 Ser Val Val Gly His Ile Leu His Ser Phe Ile Leu Val Pro Tyr His
 115 120 125
 Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Gln Asn His Gly His Val
 130 135 140
 Glu Asn Asp Glu Ser Trp Val Pro Leu Pro Glu Arg Leu Tyr Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu Arg Tyr Thr Val Pro Leu Pro Met
 165 170 175
 Leu Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Gly Lys Glu Gly
 180 185 190
 Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Gly Leu Phe Ala Pro Ser Glu Arg Lys
 195 200 205
 Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser Ile Met Leu Ala Ile Leu
 210 215 220
 Ile Cys Leu Ser Phe Leu Val Gly Pro Val Thr Val Leu Lys Val Tyr
 225 230 235 240
 Gly Val Pro Tyr Ile Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Ala Val Thr Tyr
 245 250 255
 Leu His His His Gly His Asp Glu Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
 260 265 270
 Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr
 275 280 285
 Gly Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp Ile Gly Thr His Val Ile His
 290 295 300
 His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr His Leu Val Asp Ala Thr Lys
 305 310 315 320

ES 2 575 539 T3

Ala Ala Lys His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser
 325 330 335
 Gly Ala Ile Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys
 340 345 350
 Lys Asp His Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr
 355 360 365
 Asp Pro Asp Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Val Lys Ser Lys Ile Asn
 370 375 380

5 <210> 9
 <211> 4770
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(299)

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (913)..(1002)

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1665)..(1731)

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (3709)..(3801)

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (3908)..(4093)

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (4179)..(4259)

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (4354)..(4491)

<220>
 <221> CDS
 <222> (4576)..(4770)

40 <400> 9
 atg gtt gtt gct atg tac cag cgc agc aat gtt aac gga gat tcc ggt 48
 Met Val Val Ala Met Tyr Gln Arg Ser Asn Val Asn Gly Asp Ser Gly
 1 5 10
 gcc cgg aag gaa gaa ggg ttt gat cca agc gca caa cca ccg ttt aag 96
 Ala Arg Lys Glu Glu Gly Phe Asp Pro Ser Ala Gln Pro Pro Phe Lys
 20 25 30
 atc gga gat ata agg gcg gcg att cct aag cat tgc tgg gtg aag agt 144
 Ile Gly Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Trp Val Lys Ser
 35 40 45

ES 2 575 539 T3

| | |
|---|------|
| cct ttg aga tct atg agc tac gtc gcc aga gac att ttc gcc gtc gcg Pro Leu Arg Ser Met Ser Tyr Val Ala Arg Asp Ile Phe Ala Val Ala 50 55 60 | 192 |
| gct ctg gcc atg gcc gcc gtg tat ttt gat agc tgg ttc ctc tgg cca Ala Leu Ala Met Ala Ala Val Tyr Phe Asp Ser Trp Phe Leu Trp Pro 65 70 75 80 | 240 |
| ctc tac tgg gtt gcc caa gga acc ctt ttc tgg gcc atc ttc gtt ctt Leu Tyr Trp Val Ala Gln Gly Thr Leu Phe Trp Ala Ile Phe Val Leu 85 90 95 | 288 |
| ggc cac gac tg gtaaattaa ttttcagttt taattatttt gtctcttttt Gly His Asp Cys | 339 |
| gttcaattta ttaatttctt gaatgcacgt tcgatgagta tcgtcactga cttcaagatt | 399 |
| taattctttt gaggttactt tttcatgttt aattattaa aaaataaaag aaaatatagg | 459 |
| atctaagatt ttttttcttc atcaatgttc aagcatcatc actcatcagt cgtaagactc | 519 |
| gtaacaaaat atcttctttt ctataattaa tattatttcc gcattttatg gatctacgtt | 579 |
| ttgatgttct caatttttgt ttctctttct ctagatcccc ggaactttta attataatta | 639 |
| tagtatagta taatatcaag aaaatatact gtttattttt ttggcaacaa atatattggt | 699 |
| ttttgacaag aaaaatatat atattttttc ttctttttgt gttccaatct attttgtgat | 759 |
| ttagacaagt gacacgtcat ataccggatt tgttaccttg ttaaagagct tgagttaaaa | 819 |
| caaatgtaga aaagttaaaa taaattgtgc aataaatgat aaatacgttt ttatgttaaa | 879 |
| taatgatgtg aaaataaaat tgaataatgg cag t gga cat ggg agt ttc tca Gly His Gly Ser Phe Ser 105 | 931 |
| gac att cct ctg ctg aac agt gtg gtt ggt cac att ctt cat tca ttc Asp Ile Pro Leu Leu Asn Ser Val Val Gly His Ile Leu His Ser Phe 110 115 120 | 979 |
| atc ctc gtt cct tac cat ggt tg gtaagtcatt tattaactat ttccatgtaa Ile Leu Val Pro Tyr His Gly Trp 125 | 1032 |
| attattagta cttgttttcg tatttcttac attttcgttt gttattcttg ggtgcaatgc | 1092 |
| taggaaactg taatcagtat taactggaat ctaccgactg tttttttggt gctagagtag | 1152 |
| caattttata attaaataag aatcctatta aacaatgcat gtgactatat gaggttgctt | 1212 |
| tttctgttca aaagcatcaa atcttttagca gccaatgaaa aagaatccaa accttttctt | 1272 |
| aaatgatatg cgcttatcta tggctctgag ttttcttagt ttcttaagta tatttagatt | 1332 |
| ttgatttttt ttttaggtttt cacttattgt tattttgttta catcagcttc aaatatcttc | 1392 |
| gaaaaagact tacatgcatc aatttctga ggatttatag ttttttttac ttatttctga | 1452 |
| cacaatgttt attagtaaaa agcatcaaat gtttttttgc tcaaaaaaaaa gaatgggatt | 1512 |
| gtagagcac tctattgtta gttgttcaat aaatatatca actaaaaaaaa caaaataaat | 1572 |
| ataaaatgag tgagattggt aaatcattat agagacaatt tcattttcac aaaaataaat | 1632 |
| aaatacataa cttttgtaat tggggtttgc ag g aga ata agc cat cgg aca cac | 1686 |

ES 2 575 539 T3

| | | | | | | | | | | | | | Arg | Ile | Ser | His | Arg | Thr | His | |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|--|
| | | | | | | | | | | | | | | | | 135 | | | | |
| cac | cag | aac | cat | ggc | cat | ggt | gaa | aac | gac | gag | tct | tgg | gtt | ccg | | | | 1731 | | |
| His | Gln | Asn | His | Gly | His | Val | Glu | Asn | Asp | Glu | Ser | Trp | Val | Pro | | | | | | |
| | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 | | | | | | | | |
| gtaatctttc | ctactctcat | agtttctctt | gtcttttatt | gatttggtct | ttttggggaa | | | | | | | | | | | | | 1791 | | |
| ttcattctta | tgtctaagtt | cttatgatta | ttggggttct | aaggtagaaa | ttctatctta | | | | | | | | | | | | | 1851 | | |
| gaatataaaa | acatgtctct | taatttttaa | ctaaaaagt | aagaaccagc | ttttaataa | | | | | | | | | | | | | 1911 | | |
| gaattttaaa | aactgggttt | ttaaattttt | tagttaaag | ttaaaaaacg | aattattata | | | | | | | | | | | | | 1971 | | |
| tttctctaaa | aacctcgtca | taagaaccct | cattgatcat | gctatgttta | ttttattagt | | | | | | | | | | | | | 2031 | | |
| ttatgttttc | agtctgaggt | cagaccggcc | acttgtcaga | tctgttttct | agctgtagta | | | | | | | | | | | | | 2091 | | |
| aaaaacaatt | tgccagtgt | atagttcagc | ggtaattaat | gttctggaat | ctatctcaaa | | | | | | | | | | | | | 2151 | | |
| tttttttttt | ataacttcag | atataaagt | ttttgttctt | aaaaataaa | tttcaaaatt | | | | | | | | | | | | | 2211 | | |
| tcaaatttga | agtttttttt | atttgcattt | tgatcgttat | aattaattac | acgttacatt | | | | | | | | | | | | | 2271 | | |
| tataattctg | aagtattttt | tcatttatcg | ttttaattct | taaatttttt | atatattata | | | | | | | | | | | | | 2331 | | |
| aatatttcca | gtttgttttt | ataaattcaa | attttacaca | taaaagtaat | aaaaaaactt | | | | | | | | | | | | | 2391 | | |
| taaaataaga | tacatgaaga | cataactatt | agaaaatttt | aatattata | actatactaa | | | | | | | | | | | | | 2451 | | |
| taatctggta | aatttgctct | ggaacctcca | aaattattgt | ctaaacaaat | tttatataac | | | | | | | | | | | | | 2511 | | |
| cgaagatgga | acattacgaa | aataatttta | tgaataata | tgttattttg | cttctaattt | | | | | | | | | | | | | 2571 | | |
| aatatttaat | tatatatttc | tatttataat | tttatatatt | taatgtaatt | ttttattaat | | | | | | | | | | | | | 2631 | | |
| taatattact | gtaatatttt | tatatatgtg | ctagttattt | ataatttttt | ttatggattt | | | | | | | | | | | | | 2691 | | |
| atatttggtta | taacaaataa | agatcattgt | gtaaaataca | aataattttg | aaattacgtt | | | | | | | | | | | | | 2751 | | |
| tgaaagttgt | ttttgaagaa | aaccactttg | aaactttaaa | tttagagttt | cgtgaactct | | | | | | | | | | | | | 2811 | | |
| aaaatagaga | gtttttttta | gaggttacgc | agtaactcag | aaaatgaaaa | atctatactt | | | | | | | | | | | | | 2871 | | |
| ttatagtacc | gaactttaac | gatggaccac | ttagagcatc | attaacgggg | gttcttagga | | | | | | | | | | | | | 2931 | | |
| cggggttctt | agcggaatat | aagaacctga | ctcttaattt | ttaactgaaa | atgctaagag | | | | | | | | | | | | | 2991 | | |
| tcggctctta | actttaatga | tgctaagagt | cggctcttaa | ctttaaggac | ggggttctta | | | | | | | | | | | | | 3051 | | |
| agagccgact | cttaactttt | tcagttaaaa | taactttttc | agttaaaagt | taagagtcgg | | | | | | | | | | | | | 3111 | | |
| gttcttatat | tctgttaaga | accatgtact | aagaacctg | tgtaatgat | ggtgttatat | | | | | | | | | | | | | 3171 | | |
| tcgagtcctt | agcgtaaaat | gattctcttc | gaaatccgtt | tactttcttc | gttatttttt | | | | | | | | | | | | | 3231 | | |
| ccttttcagt | ttggcggttt | tcgtaatact | tttctctgca | atcttgaaag | ctattagtat | | | | | | | | | | | | | 3291 | | |
| aaaacttata | aacacatgaa | ttaatacga | tacataacca | gaatgacaaa | tttcaatga | | | | | | | | | | | | | 3351 | | |
| atatttaata | ctagtaagta | ctactccgta | atactccctc | tgttttttaa | agatgaatgt | | | | | | | | | | | | | 3411 | | |
| tctagagaaa | tattttgttt | ccaaatgatg | tatttttcat | gttttcaaag | tatattttgt | | | | | | | | | | | | | 3471 | | |
| caactaataa | tgaaaaattg | tgtatttcaa | aaatattaat | tacatttctt | ttaatccaat | | | | | | | | | | | | | 3531 | | |
| tggttttaaaa | atataaaaaa | tataaagtta | caaaaaacta | tgcatataata | actaaatttt | | | | | | | | | | | | | 3591 | | |

ES 2 575 539 T3

aatatgattt cttaataaat gtgaaaatcc tagaacattc atctttaaaa aacagagggga 3651
gtagtaatta gtaatagtaa tagtaatagt catattaatt ataattatgt atttcag 3708
ttg cca gaa aag ttg tac aag aac ttg ccc cat agt act cgg atg ctc 3756
Leu Pro Glu Lys Leu Tyr Lys Asn Leu Pro His Ser Thr Arg Met Leu
155 160 165
aga tac act gtc cct ctg ccc atg ctc gct tac ccg atc tat ctg 3801
Arg Tyr Thr Val Pro Leu Pro Met Leu Ala Tyr Pro Ile Tyr Leu
170 175 180
gtaaaaaaaa aatacaattt ctatcttttc ttaaaattac aaatgatttt atatctttgag 3861
ttttaagcca atatataaat taatctttgat tggaccttaa ctacag tgg tac aga 3916
Trp Tyr Arg
185
agt cct gga aaa gaa ggg tca cat ttt aac cca tac agt agt tta ttt 3964
Ser Pro Gly Lys Glu Gly Ser His Phe Asn Pro Tyr Ser Ser Leu Phe
190 195 200
gct cca agc gag agg aag ctt att gca act tca act act tgc tgg tcc 4012
Ala Pro Ser Glu Arg Lys Leu Ile Ala Thr Ser Thr Thr Cys Trp Ser
205 210 215
ata atg ttg gcc act ctt gtt tat cta tcg ttc ctc gtt gat cca gtc 4060
Ile Met Leu Ala Thr Leu Val Tyr Leu Ser Phe Leu Val Asp Pro Val
220 225 230
aca gtt ctc aaa gtc tat ggc gtt cct tac att gtaagtttca catattatta 4113
Thr Val Leu Lys Val Tyr Gly Val Pro Tyr Ile
235 240 245
caagaaattt atatattatt aataataaat ttgtcttttg acataaagtt ttggaaaatt 4173
ttcag atc ttt gtg atg tgg ttg gac gct gtc acg tac ttg cat cat cat 4223
Ile Phe Val Met Trp Leu Asp Ala Val Thr Tyr Leu His His His
250 255 260
ggc cac gat gag aag ttg cct tgg tac aga ggc aag gtaattaaat 4269
Gly His Asp Glu Lys Leu Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
265 270
caatctttta aaagaaatgt acagaaagca ataatgggta gtattgatta atcttaattt 4329
ttgatgtttt gcatacaata atag gaa tgg agt tat tta cgt gga gga tta 4380
Glu Trp Ser Tyr Leu Arg Gly Gly Leu
275 280
aca act att gat aga gat tac gga atc ttc aac aac atc cat cac gac 4428
Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Phe Asn Asn Ile His His Asp
285 290 295
att gga act cac gtg atc cat cat ctt ttc cca caa atc cct cac tat 4476
Ile Gly Thr His Val Ile His His Leu Phe Pro Gln Ile Pro His Tyr
300 305 310
cac ttg gtc gat gcc gtgagtgatc tagcttcttc tctctctagt ttcatttgat 4531
His Leu Val Asp Ala
315
taaaggtgga ttaattacta atttaattaa tgaattgtgg acag acg aga gca gct 4587
Thr Arg Ala Ala
320
aaa cat gtg tta gga aga tac tac aga gag ccg aag acg tca gga gca 4635

ES 2 575 539 T3

```

Lys His Val Leu Gly Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Lys Thr Ser Gly Ala
      325                               330                               335
ata ccg att cac ttg gtg gag agt ttg gtc gca agt att aaa aaa gat      4683
Ile Pro Ile His Leu Val Glu Ser Leu Val Ala Ser Ile Lys Lys Asp
      340                               345                               350
cat tac gtc agt gac act ggt gat att gtc ttc tac gag aca gat cca      4731
His Tyr Val Ser Asp Thr Gly Asp Ile Val Phe Tyr Glu Thr Asp Pro
      355                               360                               365                               370
gat ctc tac gtt tat gct tct gac aaa tct aaa atc aat      4770
Asp Leu Tyr Val Tyr Ala Ser Asp Lys Ser Lys Ile Asn
      375                               380

```

5 <210> 10
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Brassica napus
 <400> 10

```

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

```

10

ES 2 575 539 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | 190 | | | |
| Ser | His | Phe | Asn | Pro | Tyr | Ser | Ser | Leu | Phe | Ala | Pro | Ser | Glu | Arg | Lys |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Leu | Ile | Ala | Thr | Ser | Thr | Thr | Cys | Trp | Ser | Ile | Met | Leu | Ala | Thr | Leu |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Val | Tyr | Leu | Ser | Phe | Leu | Val | Asp | Pro | Val | Thr | Val | Leu | Lys | Val | Tyr |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Gly | Val | Pro | Tyr | Ile | Ile | Phe | Val | Met | Trp | Leu | Asp | Ala | Val | Thr | Tyr |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Leu | His | His | His | Gly | His | Asp | Glu | Lys | Leu | Pro | Trp | Tyr | Arg | Gly | Lys |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Glu | Trp | Ser | Tyr | Leu | Arg | Gly | Gly | Leu | Thr | Thr | Ile | Asp | Arg | Asp | Tyr |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Gly | Ile | Phe | Asn | Asn | Ile | His | His | Asp | Ile | Gly | Thr | His | Val | Ile | His |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| His | Leu | Phe | Pro | Gln | Ile | Pro | His | Tyr | His | Leu | Val | Asp | Ala | Thr | Arg |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Ala | Ala | Lys | His | Val | Leu | Gly | Arg | Tyr | Tyr | Arg | Glu | Pro | Lys | Thr | Ser |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Gly | Ala | Ile | Pro | Ile | His | Leu | Val | Glu | Ser | Leu | Val | Ala | Ser | Ile | Lys |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Lys | Asp | His | Tyr | Val | Ser | Asp | Thr | Gly | Asp | Ile | Val | Phe | Tyr | Glu | Thr |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Asp | Pro | Asp | Leu | Tyr | Val | Tyr | Ala | Ser | Asp | Lys | Ser | Lys | Ile | Asn | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |

<210> 11
 <211> 1131
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

<400> 11

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atggttgtcg | ctatggacca | gcgtagcaat | gcgaacggag | acgaaagggt | tgatccgagc | 60 |
| gcacaaccac | cgttcaagat | cggagatata | agggcggcca | ttcctaagca | ttgttgggta | 120 |
| aagagtcctt | tgagatccat | gagctatgtc | gccagagaca | tttcgccgt | cgtggctctt | 180 |
| gccgtcgccg | ccgtgtat | tgatagctgg | ttcttttggc | ctctttattg | ggccgcccaa | 240 |
| ggaaccctgt | tctgggctat | cttcgtactc | ggccacgact | gtggacatgg | gagcttctca | 300 |
| gacattcctc | ttctgaatac | tgcggttggg | catattcttc | attccttcat | tctcgttcca | 360 |

10

ES 2 575 539 T3

taccatgggtt ggagaataag ccatcggaca caccaccaga accatggcca tgttgaaaac 420
gacgagtctt gggttccggt gccagaaaaa ttatacaaga atttgtcca cagtacacgg 480
atgctcagat acaactgtccc tctccccatg ctcgcttacc ctctctatct gtggtacaga 540
agtcctggta aagaagggtc acattataac ccatacagta gtttatttgc tccaagcgag 600
agaaagctta ttgcaacttc aactacttgc tggtcgatca tgttggccac tcttgtttat 660
ctatcattcc tcgttgggcc agtcacagtt ctcaaagtct atggagtcc ttacattatc 720
tttghtaatgt ggttggacgc tgtcacgtac ttgcatcatc atggtcacga tgataagttg 780
ccttggtaga gaggcaagga atggagtatt ttacgtggag gattaacaac tattgataga 840
gattacggga tcttcaacaa cattcatcac gatattggaa ctcacgtgat ccatcatctt 900
ttcccacaaa tccctcacta tcacttgggc gatgccacga aagcagctaa acatgtgttg 960
ggaaagatac acagagaacc aaagacgtca ggagcaatac cgatccactt ggtggaaagt 1020
ttggtggcaa gtattaagaa agatcattac gtcagtgaca ctggtgatat tgtcttctac 1080
gagacagatc cagatctcta cgtttatgct tctgacaaat ccaaaatcaa c 1131

<210> 12
<211> 1140
5 <212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 12

atggttgctg ctatggacca gcgtagcaat gtgaacggag attccaagga cgaaaggttt 60
gatccgagcg cacaaccacc gtttaagatc ggagatataa gggctgcatc tcctaagcat 120
tgttgggtca agagtccttt gagatccatg agctacgtcg cgagagacat tttctccgctc 180
gtggctctgg ccgctgcccgc cgtgtatfff gatagctggt tcttctggcc tctttattgg 240
gccgcccaag gaaccctfff ctgggccatc ttcgtactcg gccacgactg tggacatggg 300
agcttctcag acattcctct tctgaatact gcggttggtc atattcttca ttccttcatt 360
ctcgttccat accatggttg gagaataagc catcggacac accaccagaa ccatggccat 420
gttgaaaacg acgagtcttg ggttccggtg ccagaaaaat tatacaagaa tttgtcccac 480
agtacacgga tgctcagata cactgtccct ctccccatgc tcgcttacc tctctatctg 540
tggtacagaa gtccctggtaa agaagggtca cattataacc catacagtag tttatttggc 600
ccaagcgaga gaaagcttat tgcaacttca actacttgct ggtcgcgctg gttggccact 660
cttgtttatc tatcattcct cgtttggcca gtcacagttc taaaagtcta tgggttctct 720
tacattatct ttghtaatgt gttggacgct gtcacgtact tgcacatca tggtcacgat 780
gataagctgc cttggtagag aggcaaggaa tggagtatt tacgtggagg attaacaact 840
gttgatagag attacgggat cttcaacaac attcatcacg atattggaac tcacgtgatc 900
catcatcttt tcccacaaat ccctcactat cacttggctg atgccacgaa agcagctaaa 960
10 catgtgttgg gaagatacta cagagaacca aagacgtcag gagcaatacc gatccactta 1020
gtggaaagt tgggtggcaag tattaagaaa gatcattacg tcagtgcac tgggtgatatt 1080
gtcttctacg agacagatcc agatctctac gtttatgctt ctgacaaatc caaaatcaat 1140

15 <210> 13
<211> 1149

ES 2 575 539 T3

<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 13

5

```

atggttggtg ctatggacca gcgcagcaat gttaacggag attccggtgc ccggaaggaa      60
gaagggtttg atccaagcga acaaccaccg ttttaagatcg gagatatcag ggcggcgatt      120
cctaagcatt gttgggtgaa gagtcctttg agatctatga gctacgtcgc cagagacatt      180
ttcgcgctcg cggctctggc catggccgcc gtgtattttg atagctggtt cctctggcca      240
ctctactggg ttgcccaagg aacccttttc tgggccatct tcgttcttgg ccacgactgt      300
ggacatggga gtttttcaga cattcctctg ctgaacagtg tggttggtca cattcttcat      360
tcattcatcc tcgttcctta ccatggttgg agaataagcc atcggacaca ccaccagaac      420
catggccatg ttgaaaacga cgagtcttgg gttccgttgc cagaaaagtt gtacaagaac      480
ttgccccata gtactcggat gctcagatac actgttcttc tgcccatgct cgcttaccgg      540
atctatctgt ggtacagaag tcctggaaaa gaagggtcac attttaacc atacagtagt      600
ttatttgctc caagcgagag gaagcttatt gcaacttcaa caacttgctg gtccataatg      660
ttggcactc ttgtttatct atcgttcttc gttggtccag tcacagttct caaagtctat      720
ggtgttcctt acattatctt tgtaatgtgg ttggacgctg tcacgtactt gcatcatcat      780
ggtcacgatg agaagttgcc ttggtacaga ggcaaggaat ggagttattt acgtggagga      840
ttaacaacta ttgatagaga ttacggaatc ttcaacaaca tccatcacga cattggaact      900
cacgtgatcc atcatctttt cccacaaatc cctcactatc acttggtcga tgcgacgaga      960
gcagctaaac atgtgttagg aagatactac agagagccga agacgtcagg agcaataccg     1020
attcacttgg tggagagttt ggtcgcaagt attaaaaaag atcattacgt cagtgacact     1080
ggtgatattg tcttctacga gacagatcca gatctctacg tttatgcttc ggacaaatct     1140
aaaatcaat                                     1149
    
```

<210> 14
<211> 1149
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 14

10

```

atggttggtg ctatggacca acgcaccaat gtgaacggag atgccggtgc ccggaaggaa      60
gaagggtttg atccgagcgc acaaccgccg ttttaagatcg gggacataag ggctgcgatt      120
cctaagcatt gttgggtgaa aagtcctttg agatctatga gctacgtagc cagagacatt      180
tgtgccgctc cggctttggc cattgccgcc gtgtattttg atagctggtt cctctgtcct      240
ctctattggg tcgcccaagg aacccttttc tgggccatct tcgtcctcgg ccacgactgt      300
    
```

15

ES 2 575 539 T3

ggacatggga gtttctcaga cttcctctg ctgaatagtg tggttggcca tattcttcat 360
 tccttcatcc tcgttcctta ccatggttgg agaataagcc atcggacaca ccaccagaac 420
 catggccatg ttgaaaacga cgagtcttgg gttccgttac cagaaaggtt atacaagaat 480
 ttaccccaca gtactcggat gctcagatac actgtccctc tgcccatgct cgcttaccg 540
 atctatctgt ggtacagaag tcctggaaaa gaagggtcac attttaacc atacagtgg 600
 ttatttgctc caagcgagag aaagcttatt gcaacttca ctacttgctg gtccataatg 660
 ttggcaattc ttatctgtct ttccttctc gttggtccag tcacagttct caaagtatac 720
 ggtgttctt acattatctt tgtgatgtgg ttggacgctg tcacttactt gcatcaccat 780
 ggtcatgatg agaagttgcc ttggtacaga ggcaaggaat ggagttactt acgtggagga 840
 ttaacaacta ttgatagaga ttacggaatt ttcaacaaca ttcacacga cattggaact 900
 cacgtgatcc atcatctttt cccacaaatc cctcactatc acttggtcga tgctacaaaa 960
 gcagctaac atgtgttggg aagatactac agagaaccaa agacgtcagg agcaataccg 1020
 atccacttgg tggagagttt ggtagcaagt attaagaaag atcattacgt cagtgacact 1080
 ggtgacattg tcttctacga gactgatcca gatctctacg tttatgctt tgctcaaatcg 1140
 aaaatcaat 1149

- 5 <210> 15
- <211> 1149
- <212> ADN
- <213> Brassica napus

10 <400> 15

atggttggtg ctatgtacca ggcgagcaat gttaacggag attccgggtg ccggaaggaa 60
 gaagggtttg atccaagcgc acaaccaccg ttttaagatcg gagatataag ggcggcgatt 120
 cctaagcatt gctgggtgaa gagtcctttg agatctatga gctacgtcgc cagagacatt 180
 ttcgccgctg cggctctggc catggccgcc gtgtattttg atagctggtt cctctggcca 240
 ctctactggg ttgcccaagg aaccctttt tgggccatct tcgttcttgg ccacgactgt 300
 ggacatggga gtttctcaga cttcctctg ctgaacagtg tggttggtca cattcttcat 360
 tcattcatcc tcgttcctta ccatggttgg agaataagcc atcggacaca ccaccagaac 420
 catggccatg ttgaaaacga cgagtcttgg gttccgttgc cagaaaaggtt gtacaagaac 480
 ttgccccata gtactcggat gctcagatac actgtccctc tgcccatgct cgcttaccg 540
 atctatctgt ggtacagaag tcctggaaaa gaagggtcac attttaacc atacagtagt 600
 ttatttgctc caagcgagag gaagcttatt gcaacttcaa ctacttgctg gtccataatg 660
 ttggccactc ttgtttatct atcgttctc gttgatccag tcacagttct caaagtctat 720
 ggcgttctt acattatctt tgtgatgtgg ttggacgctg tcacgtactt gcatcatcat 780
 ggtcacgatg agaagttgcc ttggtacaga ggcaaggaat ggagttattt acgtggagga 840
 ttaacaacta ttgatagaga ttacggaatc ttcaacaaca ttcacacga cattggaact 900
 cacgtgatcc atcatctttt cccacaaatc cctcactatc acttggtcga tgccacgaga 960

ES 2 575 539 T3

gcagctaaac atgtgttagg aagatactac agagagccga agacgtcagg agcaataccg 1020
 attcacttgg tggagagttt ggctcgcaagt attaaaaaag atcattacgt cagtgacact 1080
 ggtgatattg tcttctacga gacagatcca gatctctacg tttatgcttc tgacaaatct 1140
 aaaatcaat 1149

- 5 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 10 <220>
 <223> cebador de PCR

- 15 <400> 16
 tggagtatc tacgtggagg 20

- 20 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 25 <220>
 <223> cebador de PCR

- 30 <400> 17
 gcgtaaactg agagatctgg 20

- 35 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 40 <220>
 <223> sonda

- 45 <400> 18
 tctttgtaat gtgattgga 19

- 50 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 55 <220>
 <223> sonda

- 60 <400> 19
 ctttgtaatg tggttggac 19

- 65 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

- 70 <220>
 <223> cebador

- 75 <400> 20
 cagtcacagt tctcaaagtc tatggag 27

- 80 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN

ES 2 575 539 T3

<213> Artificial
<220>
<223> cebador
5
<400> 21
tgcctctgta ccaaggcaac ttat 24
10
<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
15
<220>
<223> sonda
<400> 22
ggatgactac agtgataca 19
20
<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
25
<220>
<223> sonda
<400> 23
gatgactaca gtggtacaga 20
30
<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
35
<220>
<223> cebador
<400> 24
cctctctatc tggtaaacc taattcctaa 30
40
<210> 25
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
45
<220>
<223> cebador
50
<400> 25
gtatgggta taatgtgacc cttctttac 29
55
<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
60
<220>
<223> sonda
<400> 26
atctttgtaa tgtagttgga 20
<210> 27

ES 2 575 539 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> sonda

<400> 27
atctttgtaa tgtggtgga 20

10 <210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 28
20 ggtgttcctt acattgtaag tttcaca 27

<210> 29
<211> 23
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

30 <400> 29
gcctctgtac caaggcaact tct 23

<210> 30
<211> 19
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> sonda

40 <400> 30
ttactgcagt gatacagaa 19

<210> 31
45 <211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> sonda

<400> 31
ttactgcagt ggtacaga 18

55 <210> 32
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> cebador

<400> 32
cgcttaccgg atctatctgg tattt 25

ES 2 575 539 T3

<210> 33
<211> 25
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 33
gggtaaaat gtgacccttc ttttc 25

<210> 34
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> sonda

20 <400> 34
gaccttaact acagtagtac 20

<210> 35
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
30 <223> sonda

<400> 35
accttaacta cagtggtaca 20

35 <210> 36
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> cebador

<400> 36
45 atgctcgctt acccgatcta ttt 23

<210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> cebador
<400> 37
ctctcgcttg gagcaaataa acta 24

55

REIVINDICACIONES

1. Una planta de *Brassica* que comprende al menos dos alelos *FAD3* mutantes, totalmente inactivados, en donde

i. el primer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado es un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que

5 a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3; o

10 b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o

15 c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4;

en donde dicho primer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que

20 a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3; o

25 b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o

30 c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4; y

ii. el segundo alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado es un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que

35 a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o

40 b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o

45 c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10;

en donde dicho segundo alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que

- 5 a. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- 10 b. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- 15 c. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10; y

20 en donde dichos al menos dos alelos *FAD3* mutantes totalmente inactivados comprenden una mutación del grupo de:

- i. una delección, mutación de desplazamiento de marco o de codón de parada que conduce a una delección completa de la proteína;
- 25 ii. una mutación de codón de parada, desplazamiento de marco o sitio de corte y empalme que conduce a un truncamiento de la proteína *FAD3* que incluye el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;
- iii. una mutación de sentido erróneo, por inserción o delección en la secuencia que codifica el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;
- 30 iv. una mutación de sentido erróneo en el codón que codifica cualquiera de las histidinas conservadas en una posición correspondiente a la posición 92, 96, 128, 131, 132, 295, 298 ó 299 de SEQ ID NO: 2; y
- v. una mutación sin sentido que resulta del uso de un ATG alternativo como codón de inicio y la síntesis de una proteína truncada en el extremo N que carece de la secuencia señal putativa.

35 2. La planta de la reivindicación 1, que comprende, además, un tercer, o un tercer y un cuarto, o un tercer, un cuarto y un quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado, en donde

- a. dicho tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado es un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que
 - 40 i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3; o
 - 45 ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o
 - iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con

SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4;

en donde dicho tercer alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que

- 5 i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 3; o
- 10 ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 12; o
- 15 iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 4; y

b. dicho cuarto y dicho quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado es en cada caso un alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que

- 20 i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- 25 ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- 30 iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10;
- 35

en donde dicho cuarto y dicho quinto alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende cada uno una secuencia de nucleótidos que

- 40 i. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o
- 45 ii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o
- 50 iii. se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos

que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10;

5 y en donde dichos alelos *FAD3* mutantes totalmente inactivados son alelos mutantes de diferentes genes *FAD3*.

10 3. La planta de la reivindicación 1 ó 2, en donde dichos alelos *FAD3* totalmente inactivados se seleccionan del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, en donde la G en la posición 2405 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, en donde la G en la posición 2702 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en donde la G en la posición 3934 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, en donde la G en la posición 2847 está sustituida con A; y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, en donde la G en la posición 3909 está sustituida con A.

15 4. Un alelo mutante totalmente inactivado de un gen *FAD3*, comprendiendo dicho gen *FAD3* una secuencia de nucleótidos que

20 (a) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o

25 (b) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o

30 (c) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10,

en donde dicho alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una secuencia de nucleótidos que

35 (a) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 5, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 7 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 90% con SEQ ID NO: 9; o

40 (b) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 13, una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 14 y una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 95% con SEQ ID NO: 15; o

45 (c) se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 6, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 8 y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 98% con SEQ ID NO: 10,

50 y en donde dicho alelo *FAD3* mutante totalmente inactivado comprende una mutación del grupo que consiste en:

- 5
- i. una deleción, mutación de desplazamiento de marco o de codón de parada que conduce a una deleción completa de la proteína;
 - ii. una mutación de codón de parada, desplazamiento de marco o sitio de corte y empalme que conduce a una truncación de la proteína FAD3 que incluye el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;
 - iii. una mutación de sentido erróneo, por inserción o deleción en la secuencia que codifica el motivo de retención ER en una posición correspondiente a la posición 373-377 de SEQ ID NO: 2;
 - iv. una mutación de sentido erróneo en el codón que codifica cualquiera de las histidinas conservadas en una posición correspondiente a la posición 92, 96, 128, 131, 132, 295, 298 ó 299 de SEQ ID NO: 2; y
 - v. una mutación sin sentido que resulta del uso de un ATG alternativo como codón de inicio y la síntesis de una proteína truncada en el extremo N que carece de la secuencia señal putativa.
- 10
- 15 5. Un alelo mutante totalmente inactivado de un gen FAD3 , que se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, en donde la G en la posición 2405 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, en donde la G en la posición 2702 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en donde la G en la posición 3934 está sustituida con A; una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, en donde la G en la posición 2847 está sustituida con A; y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, en donde la G en la posición 3909 está sustituida con A.
- 20
- 25 6. Una célula vegetal, semilla o progenie de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha célula vegetal, semilla o progenie comprende al menos dos alelos *FAD3* mutantes, totalmente inactivados según se describe en la reivindicación 1.
- 30 7. Un método para producir un aceite de semillas, que comprende machacar las semillas de las plantas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dichas semillas al menos dos alelos *FAD3* mutantes, totalmente inactivados según se describe en la reivindicación 1.
- 35 8. Una planta de *Brassica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una célula, tejido, órgano, semilla o progenie de la misma que comprende al menos dos alelos *FAD3* mutantes, totalmente inactivados según se describe en la reivindicación 1, obtenible de una semilla seleccionada del grupo que consiste en:
- semilla de *Brassica* que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, en donde la G en la posición 2405 está sustituida con A, y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, en donde la G en la posición 2702 está sustituida con A, habiendo sido depositada dicha semilla en NCIMB Limited el 9 de octubre de 2009 bajo el número de acceso NCIMB 41655;
 - semilla de *Brassica* que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en donde la G en la posición 3934 está sustituida con A, y una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, en donde la G en la posición 3909 está sustituida con A, habiendo sido depositada dicha semilla en NCIMB Limited el 9 de octubre de 2009 bajo el número de acceso NCIMB 41656;
- 40
- y
- semilla de *Brassica* que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, en donde la G en la posición 2847 está sustituida con A, habiendo sido depositada dicha semilla en NCIMB Limited el 9 de octubre de 2009 bajo el número de acceso NCIMB 41657.
- 45
9. Un método para determinar el estado de zigosis de un alelo *FAD3* mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5 en una planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma, que comprende determinar la presencia de un mutante y/o una correspondiente región específica para *FAD3* de tipo salvaje en el ADN genómico de dicha planta, o una célula, parte, semilla o progenie de la misma.

10. Uso de una combinación de alelos *FAD3* mutantes según se describe en la reivindicación 1 ó 2, para reducir el contenido en C18:3 en el aceite de semillas de una planta de *Brassica*.

11. Uso de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la semilla de la reivindicación 6 u 8, para producir aceite de semilla de colza o una torta de aceite de semilla de colza.